DNA-Tests an Holzproben am Thünen-Institut

Eine Zwischenbilanz nach vier Jahren – Zukünftig sollen auch Span- und Sperrholzplatten genetisch untersucht werden

Von Dr. Bernd Degen*, Großhansdorf

Seit März 2013 – seitdem die EU-Holzhandelsverordnung (EUTR) in Kraft ist – werden am Thünen-Institut für Forstgenetik in Großhansdorf Holzproben genetisch auf die Richtigkeit der Angaben zur Holzart und Holzherkunft untersucht. Hierbei gibt es am Kompetenzzentrum für Holzherkünfte eine enge Zusammenarbeit zwischen den Thünen-Instituten für Forstgenetik und Holzforschung. Die Kollegen von der Holzforschung untersuchen die Holzproben zunächst mit Lupe und Mikroskop und können so zumeist anhand von Struktur und Aufbau des Holzes die Gattung und auch in vielen Fällen die Art bestimmen. Aussagen zur geografischen Herkunft oder zur Unterscheidung holzanatomisch sehr ähnlicher Arten gelingen hiermit jedoch nicht. In solchen Fällen hilft ein Gentest weiter, denn mit genetischen Analysen können für verschiedene Gattungen die Arten weiter unterschieden und Angaben zur Holzherkunft in Naturwäldern überprüft werden.

Zwischen 160 und 430 Holzproben pro Jahr untersuchte das Genetiklabor in Großhansdorf seit 2013 (vgl. Abbildung 1). Die Holzproben wurden dem Institut hauptsächlich von Holzhändlern, Behörden und Umweltverbänden geschickt.

In den meisten Fällen sollte der DNA-Test klären, ob Vorgaben aus Gesetzen eingehalten wurden. Der größte Teil der Proben stammt aus Überprüfungen im Rahmen des Holzhandelssicherungsgesetzes. Hierbei ist auffällig, dass der relative Anteil der Proben aus dem Holzhandel stetig zugenommen hat. Schwerpunkte bildeten dabei Hölzer der Gattungen *Quercus* und *Larix*, aber auch verschiedene tropische Baumarten. In 10 % bis 20 % der Fälle konnten die Untersuchungsergebnisse die Deklarationen zur Art und Herkunft nicht bestätigen.

Bei einem anderen Teil der Proben ging es darum zu klären, ob es sich um Holz geschützter Arten handelt (Washingtoner Artenschutzabkommen – Cites). Andere Proben waren wiederum Beweismaterial im Rahmen von Zivilprozessen, etwa um zu belegen, dass Wurzeln, welche Rohrleitungen und Dränagen beschädigt hatten, von einem bestimmten Baum stammen. Der Eigentümer dieses Baumes müsste in diesem Fall für den Schaden aufkommen. Oder es war die Frage, von welchem Baum ein Ast stammt, der die Scheibe eines fahrenden Autos beschädigt hat. Eventuell ist der Eigentümer des Baumes seiner Verkehrssicherungspflicht nicht nachgegangen und deshalb haftbar.

Doch bevor das Holzlabor erstmalig Angaben zur botanischen Art und geografischen Herkunft eines Holzstückes genetisch bestimmen konnte, mussten einige wichtige Vorarbeiten geleistet werden: Zunächst musste es überhaupt gelingen, DNA in ausreichender Menge und Qualität aus dem Holz zu extrahieren. Die DNA im Holz ist stark degradiert und hat viele Inhaltstoffe, die eine spätere Analyse erschweren. Hierfür

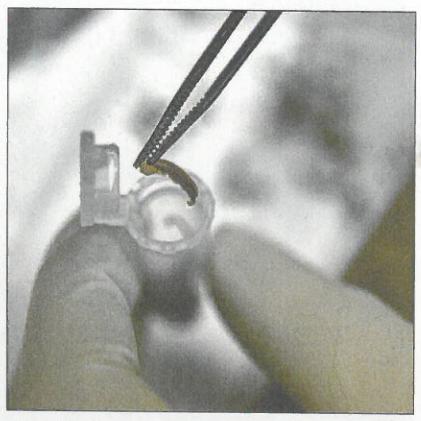

Abbildung 2 Vorbereitung einer Holzprobe für die DNA-Extraktion im Labor

haben inzwischen Wissenschaftler des Thünen-Instituts und der Universitäten Adelaide (Australien) und Harvard (USA) ein optimiertes Verfahren zur DNA-Extraktion entwickelt und patentiert (Lowe et al. 2015). Trotzdem gelingt dieser erste Schritt je nach Art und Verarbeitung nur bei 20 % bis 80 % der Holzproben.

Generell gilt – je frischer und weniger verarbeitet das Holz ist umso höher ist die Erfolgsrate. Bei Schnittholz liegt diese inzwischen bei über 60 %, jedoch bei dünnem Furnier nur bei 20 % bis 40 %. Es ist für DNA-Tests am Holz daher sinnvoll, immer mehrere verschiedene Proben je Untersuchungsobjekt (z. B. Container Eichenparkett) zu ziehen und in die Analyse zu geben.

Das Genom der Bäume ist mit bis zu 20 Gigabasenpaaren (20×10^3 Basenpaaren) sehr groß. Also muss genau bekannt sein, wo in der Gensequenz Art- und Herkunftsunterschiede zu finden sind. Hierzu setzt das Institut inzwischen moderne Sequenziertechnik und Bioinformatik ein. Einmal gefunden werden die Sequenzunterschiede in Genmarker überführt. Die Genmarker sind „Lupen", mit denen gezielt nur die relevanten Genbereiche analysiert werden.

Gemeinsam mit verschiedenen Partnerinstituten hat das Thünen-Institut für etwa 50 Baumarten Genmarker zur Artbestimmung und für etwa 20 Arten

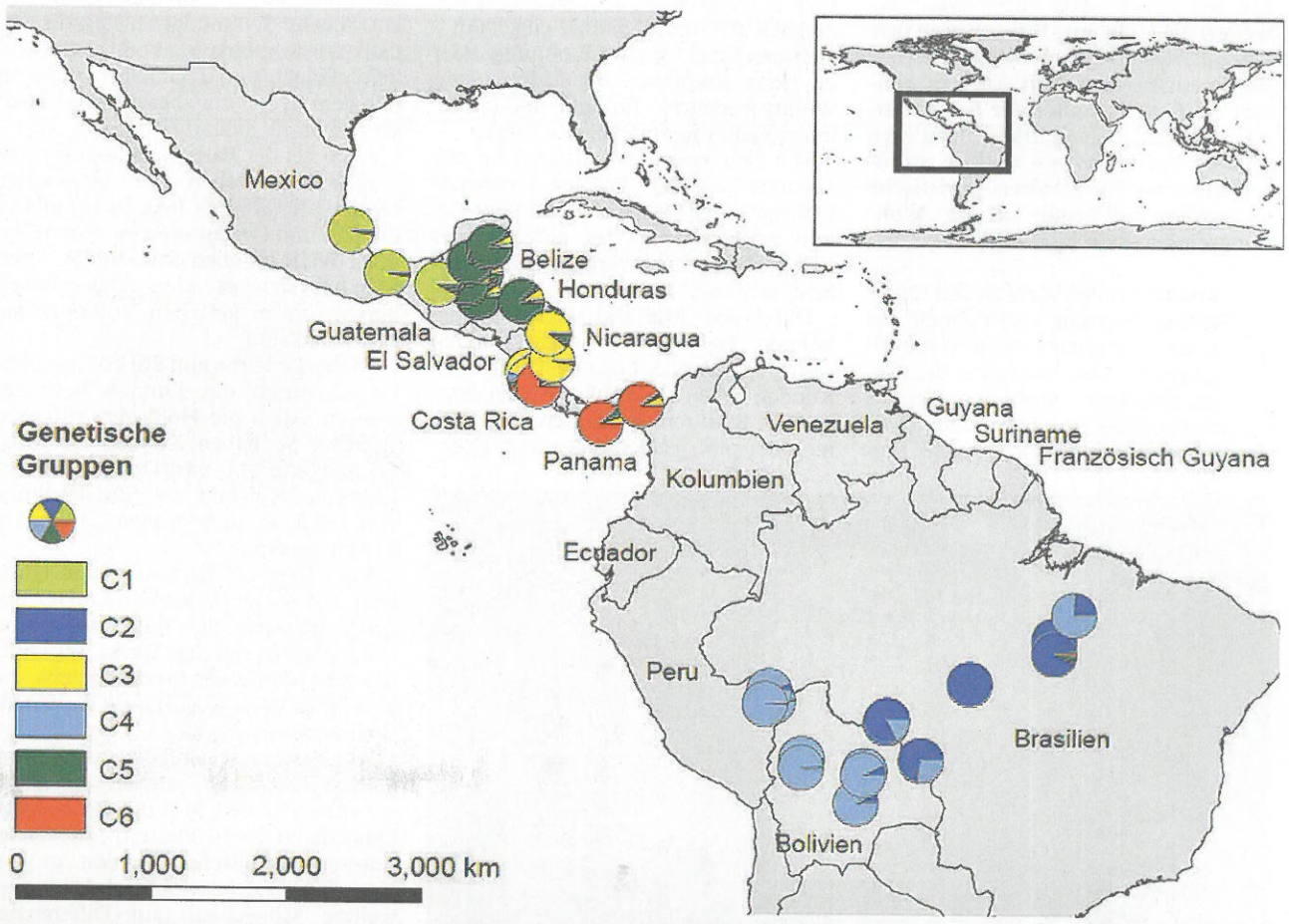

Abbildung 3 Beispiel für eine genetische Referenzkarte zur Herkunftsbestimmung beim Echten Mahagoni (*Swietenia macrophylla*). Die Farben kennzeichnen verschiedene genetische Gruppen. Wenn z. B. Mahagoni-Holz aus Brasilien stammen soll, jedoch im Holz nicht die blaue sondern die grüne genetische Gruppe nachgewiesen werden kann, dann handelt es sich um eine Fehldeklaration.

Abbildung 4 Langfristige Einlagerung von Referenzproben zur genetischen Art und Herkunftsbestimmung in Truhen bei Temperaturen von unter –70 °C

solche zur Herkunftskontrolle entwickelt (vgl. Abbildung 3). Die neu entwickelten Genmarker werden eingehend getestet und in von Fachwissenschaftlern begutachteten, internationalen Zeitschriften publiziert, z. B. Blanc-Jolivet et al. (2017), Pakull et al. (2016) und Schröder et al. (2016).

Weltweit spielen ungefähr 500 Baumarten eine Rolle im Holzhandel. Daher gilt es hier, in enger Abstimmung mit Partnern im Ausland, die richtigen Prioritäten für die Entwicklung der nächsten Genmarker zu setzen.

Ob die Genmarker wirklich sauber Art und Herkunft unterscheiden, muss zudem an genügend authentischem Referenzmaterial überprüft werden. Kambium- und Blattproben werden hierfür von Bäumen möglichst aus dem gesamten Verbreitungsgebiet eingesammelt (10 bis 50 Proben zur Artbestimmung, 200 bis 2500 Proben für die Herkunftsbestimmung). Doch viele relevante Regionen insbesondere für tropische Baumarten sind schwer zugänglich und gefährlich. Die Beschaffung der Proben bleibt trotz großer Fortschritte eine Herausforderung: Logistik, Ausbildung und Kontrolle örtlicher Kräfte, rechtliche Vorgaben für den Probentransfer und nicht zuletzt Korruption spielen eine wichtige Rolle.

Die DNA-Tests am Holz sind im Vergleich zu den seit Jahrzenten bewährten Bestimmungsverfahren der Holzanatomie erst seit wenigen Jahren verfügbar und noch deutlich verbesserungsfähig. Die Auftraggeber möchten eine schnelle, zuverlässige und natürlich kostengünstige Laboranalyse. Das Thünen-Institut für Forstgenetik hat daher in den letzten vier Jahren viel Mühe und Geld in das Holzgenlabor investiert. Die Arbeitsabläufe wurden optimiert, Geräte zur Probenaufbereitung und kontaminationsfreien DNA-Extraktion beschafft oder selbst entwickelt.

Die Proben werden in einer eigens entwickelten Datenbank registriert, mit ausgedruckten Barcodes gekennzeichnet und dauerhaft in –70°-Truhen eingelagert (vgl. Abbildung 4). Als nächstes soll das Holzlabor nach ISO (Internationale Organisation für die Standardisierung) zertifiziert werden.

Zukünftig möchte das Institut auch „gemischtes Material", wie z. B. Span- und Sperrholzplatten mit mehreren Arten unterschiedlicher Herkunft genetisch untersuchen können. Die Qualität der Referenzdaten zur Art- und Herkunftsbestimmung soll noch besser eingeschätzt und an den richtigen Stellen verbessert werden, etwa durch zusätzliche Proben, weitere Genmarker und neue statistische Auswerteverfahren. Auch ist geplant, weitere Baumarten in das Portfolio aufzunehmen.

Die Technik im DNA-Bereich entwickelt sich rasend schnell. Hier denkt das Labor schon über die Entwicklung und Anwendung sogenannter DNA-Chips nach. Mit diesem Verfahren könnte man auf wenigen cm² tausende von Genmarkern zur simultanen Art- und Herkunftsbestimmung zum Einsatz bringen. Im Rahmen des „Global Timber Tracking Networks", GTTN) wirkt das Institut an der Erstellung international anerkannter Standards für die genetische Holzprüfung mit. Nicht zuletzt gilt es, die Vor- und Nachteile und damit die richtigen Anwendungsgebiete von DNA-Tests im Verbund verschiedener alternativer Methoden (Holzanatomie, Isotopen, chemische Fingerabdrücke) weiter zu analysieren und klarer herauszuarbeiten.

* Direktor und Professor Dr. Bernd Degen ist Leiter des Thünen-Instituts für Forstgenetik in Großhansdorf.

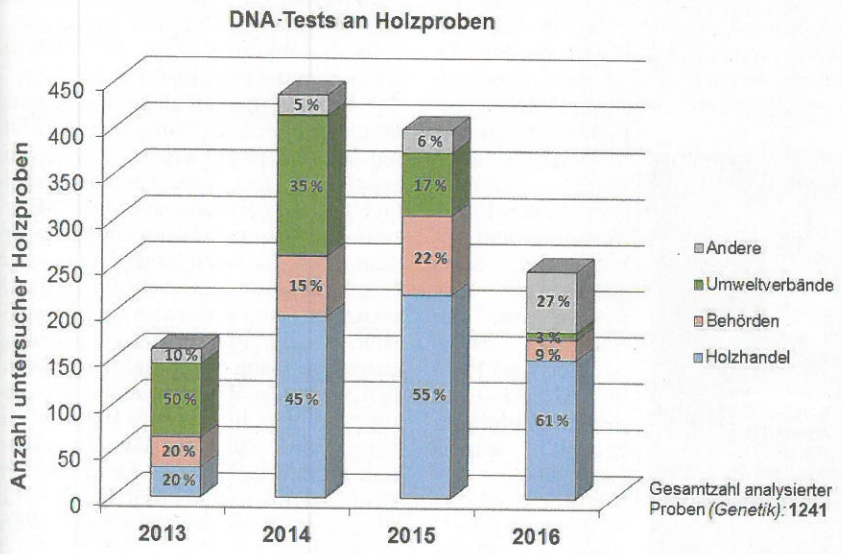

Abbildung 1 Übersicht zu Anzahl und Einsendern von Holzproben für DNA-Tests am Thünen-Institut für Forstgenetik

Literatur

Blanc-Jolivet, C.; Kersten, B.; Daïnou, K.; Hardy, O.; Guichoux, E.; Delcamp, A.; Degen, B. (2017) Development of nuclear SNP markers for genetic tracking of Iroko, Milicia excelsa and Milicia regia. Conserv Genet Resour, 10.1007/s12686-017-0716-2

Lowe, A.J.; J. D.; Cross, H.B.; Degen, B.; Schindler, L.; Höltken, A.M. (2015). A method of extracting plant nucleic acids from lignified plant tissue. International Patent Number WO/2015/070279

Pakull, B.; Mader, M.; Kersten, B.; Ekué; M.R.; Dipelet, U.G.B.; Paulini, M.; Bouda, Z.H.-N.: Degen, B. (2016) Development of nuclear, chloroplast and mitochondrial SNP markers for Khaya sp. Conserv Genet Resour, 8, 283-297.

Schröder, H.; Cronn, R.; Yanbaev, Y.; Jennings, T.; Mader, M.; Degen, B.; Kersten, B. (2016) Development of molecular markers for determining continental origin of wood from white oaks (Quercus L. sect. Quercus). PloS One, 11, e0158221.