

SCHLUSSBERICHT

**Johann Heinrich von Thünen-Institut,
Institut für Forstgenetik**

Dr. Bernd Degen, Dr. Céline Blanc-Jolivet, Jana Köhne und Malte Mader

Vorhabensbezeichnung:	<i>Großflächiger Aufbau von genetischen Referenzdaten zur Holzherkunftsbestimmung (LargeScale)</i>
Förderkennzeichen:	28I-001-01
Laufzeit des Vorhabens:	01.10.2014 – 31.12.2020

Gliederung

1	<i>Kurze Darstellung</i>	3
1.1	Aufgabenstellung	3
1.2	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	3
1.3	Planung und Ablauf des Vorhabens	4
1.4	Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Vorhabens	9
1.5	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	9
2	<i>Eingehende Darstellung</i>	11
2.1	Ergebnisse, Verwendung der Zuwendung und Vergleich mit den Zielen	11
2.1.1	Generelle Methodenbeschreibung	11
2.1.2	Datenauswertung der genetischen Referenzdaten	16
2.1.3	Eignung der genetischen Referenzdaten zur Herkunftsidentifizierung	33
2.1.4	Genetische Unterschiede zwischen Arten derselben Gattung	37
2.1.5	Stabile Isotopenanalyse - LargeScale	38
2.1.6	Small Scale – Genetik	50
2.1.7	Small Scale – Stabile Isotopen	53
2.1.8	Blindtest mit genetischen Referenzdaten	56
2.1.9	Zusätzliche Genmarker /Sequenzierungen zur Artunterscheidung	58
2.1.10	Technologietransfer	61
2.2	Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	64
2.3	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	64
2.4	Voraussichtlicher Nutzen der Ergebnisse	65
2.5	Fortschritt anderer Stellen auf dem Gebiet während des Projekts	65
2.6	Erfolgte und geplante Veröffentlichungen	66
3	<i>Erfolgskontrollbericht</i>	68
3.1	Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen	68
3.2	Das wissenschaftlich-technische Ergebnis des Vorhabens	68
3.3	Fortschreibung des Verwertungsplans	68
3.4	Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben	68
3.5	Präsentationsmöglichkeiten	69
3.6	Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung	69
4	<i>Kurzfassung</i>	71
5	<i>Abstract</i>	73
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	75

1 Kurze Darstellung

1.1 Aufgabenstellung

Zur Bekämpfung des illegalen Holzeinschlages sind verschiedene internationale und nationale Gesetze und Verordnungen erlassen worden (u.a. EU Holzhandelsverordnung, Holzhandelssicherungsgesetz). Als Teil der Sorgfaltspflicht zur Vermeidung des Handels mit illegal eingeschlagenem Holz müssen die Marktteilnehmer Angaben zur botanischen Holzart und zum Ursprungsland des Holzes machen. Mit Hilfe von genetischen Tests am Holz können diese Angaben kontrolliert werden (Lowe et al. 2016). Bevor jedoch genetische Tests zur Kontrolle und Identifizierung der geographischen Herkunft von Holz eingesetzt werden können, müssen Referenzdaten zur genetischen Zusammensetzung im Verbreitungsgebiet der jeweiligen Baumart erarbeitet werden. Die genetischen Referenzdaten einer Baumart können nicht für andere Arten genutzt werden. Vielmehr müssen diese Referenzdaten für jede Baumart extra aufgebaut werden.

Aufbau von genetischen Referenzdaten zur Herkunftskontrolle

Im Rahmen des Vorhabens sollten diese genetischen Referenzdaten für 14 ökonomisch wichtige Baumarten in Afrika (7 Arten) und Lateinamerika (7 Arten) erarbeitet werden. Diese genetischen Referenzdaten und die Methoden der Gentests wurden im Rahmen von Kooperationen mit verschiedenen Partnern erarbeitet.

Auf internationaler Ebene laufen die Aktivitäten zur Holzarten- und Holzherkunftskontrolle im „Global Timber Tracking Network (GTTN)“ zusammen. Das Netzwerk identifizierte vorrangige Baumarten und Regionen. Die 14 Baumarten des Vorhabens waren Teil der als prioritär identifizierten Arten von GTTN. Die Referenzdaten des Vorhabens wurden GTTN zugänglich gemacht.

Ausbildung und Kompetenzbildung in Afrika und Lateinamerika

Ein weiteres Ziel des Vorhabens war es, die Kapazitäten zur genetischen Holzherkunftskontrolle in den holzproduzierenden, tropischen Ländern zu verbessern bzw. aufzubauen. Dafür sollten zwei genetische Referenzlabore in Afrika und Lateinamerika mit zusätzlicher Ausrüstung versehen werden und wissenschaftliches und technisches Personal sollte entsprechend geschult werden. Auf diese Weise wurden das Genetiklabor des „Forest Research Institutes of Ghana“ (FORIG) in Kumasi (Ghana) und ein Labors des „Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana“ (IIAP) in Iquitos (Peru) unterstützt.

1.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

In den letzten 15 Jahren hat das Thünen-Institut für Forstgenetik sehr intensiv an der Entwicklung und dem Einsatz DNA-basierter Methoden zur Holzidentifizierung gearbeitet. Im März 2013 ist das Institut ein wichtiger Teil des Thünen Kompetenzzentrums für Holzherkünfte geworden. Seit 1997 sind im Rahmen von genetischen Forschungsarbeiten zur Baumartunterscheidung, zu den genetischen Unterschieden zwischen Baumbeständen (Populationen) und direkt zur Holzherkunftskontrolle mehr als 70 Publikationen von Mitarbeitern des Instituts erschienen. Zu den wichtigsten Veröffentlichungen zählen hierbei die Erarbeitung einer genetischen Referenzkarte zur Herkunftskontrolle vom Echten Mahagoni in Lateinamerika und der Lärche in Eurasien (Degen et al. 2013, Blanc-Jolivet et al. 2018), eine Pilotstudie zum Einsatz von DNA-Tests zur Kontrolle der deklarierten Einschlagsorte von Sapelli Holz in Forstkonzessionen in Kamerun (Jolivet and Degen 2012) sowie Arbeiten zu neuen Genmarkern für die Identifizierung von ökonomisch sehr wichtigen Baumarten z.B. Mahagoni, Khaya, Sapelli, Carapa und verschiedenen Weiß-Eichen (Holtken et al. 2012, Pakull et al. 2016, Schroeder et al. 2016).

Im Rahmen der Arbeiten zur Holzherkunftsidentifizierung hat das Institut ein großes Netzwerk von Partnern in vielen Ländern aufgebaut. Beispielfhaft zu nennen sind 14 Partner in Afrika, Europa, Asien und Australien im vom Thünen-Institut koordinierten ITTO-Projekts “Development and implementation of a species identification and timber tracking system in Africa with DNA fingerprints and stable isotopes”. Andere wichtige Kooperationspartner für dieses Forschungsfeld hat das Institut in Lateinamerika (Brasilien, Costa Rica, Panama, Peru und Bolivien) sowie in Russland, China, Singapur und Süd-Korea.

Die Ausbildung, der Aufbau von Kapazitäten und der Technologietransfer waren stets wichtige Elemente dieser intensiven internationalen Kooperation. Das Thünen-Institut bildet Studenten und Gastwissenschaftler aus holzproduzierenden Ländern aus und unterstützte im Rahmen des oben genannten ITTO-Projekts drei regionale genetische Referenzlabore zur Holzherkunftskontrolle in Afrika (Kumasi in Ghana, Libreville in Gabun, Nairobi in Kenia).

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Die geplanten Arbeiten ließen sich in die Arbeitspakete „Stichprobennahme“, „Genetisches Screening“, „Technologietransfer / Ausbildung“ sowie „Koordinierung“ unterteilen. Im Laufe des Projekts kamen dann noch drei zusätzliche Arbeitspakete dazu: „Pilotstudie SmallScale“, „Isotopen-Analyse“ und „Genmarker zur Artunterscheidung“.

Baumartenwahl

Bei der Auswahl der Baumarten hatten wir uns zunächst an der vorhandenen Liste von vorrangigen Baumarten des Global Timber Tracking Networks (GTTN) orientiert. Zusätzlich hatten wir die potentiellen Projektpartner in den verschiedenen Ländern nach den wichtigsten Baumarten gefragt. Die wesentlichen Auswahlkriterien für die vorrangigen Baumarten waren: a) die ökonomische Bedeutung, b) das Risiko für illegalen Holzeinschlag und c) das Vorkommen in möglichst vielen Ländern der Partner. Von der Auswahl wurden die Baumarten ausgeschlossen, für die schon in größerem Umfang genetische Referenzdaten vorhanden sind. Auf diesem Weg kamen wir zu der in Tabelle 1 genannten Liste von vorrangigen Baumarten. Bei der endgültigen Auswahl der Baumarten gab es noch Diskussionsbedarf, den wir zu Beginn des Projekts beim ersten gemeinsamen Projekttreffen klären konnten.

Afrika	Lateinamerika
<i>Nauclea diderrichii</i> (Bilinga)	<i>Carapa guianensis</i> (Aubl.) (Meliaceae) – Andiroba
<i>Entandophragma utile</i> (Sipo)	<i>Cedrela fissilis</i> Vell (Meliaceae) – Cedro
<i>Khaya ivorensis</i> (Acajou)	<i>Cedrela odorata</i> L. (Meliaceae) - Cedro-cheiroso
<i>Khaya anthotheca</i> (Acajou)	<i>Dinizia excelsa</i> Ducke – (Leguminosae) - Angelim Vermelho
<i>Lophira alata</i> (Azobe)	<i>Hymenaea courbaril</i> L. (Fabaceae) - Jatobá
<i>Afzelia africana</i> (Doussié blanc)	<i>Jacaranda copaia</i> (Aubl.) D. Don. (Bignoniaceae) – Pará-pará
<i>Baillonella toxisperma</i> (Moabi)	<i>Manilkara huberi</i> (Ducke) Chevalier (Sapotaceae) - Maçaranduba
<i>Entandophragma candolei</i> (Kosipo)	<i>Simarouba amara</i> Aubl. (Simaroubaceae) - Marupá
<i>Entandophragma angolense</i> (Tiama)	<i>Handroanthus (vormals Tabebuia) serratifolia</i> (Vahl.) Nich.) (Bignoniaceae) - Ipê-amarelo
<i>Pericopsis elata</i> (Afrormosia /Assamela)	<i>Virola surinamensis</i> (Rol. Ex Rottb.) Warb. (Myristicaceae)

Tabelle 1: Ursprüngliche Liste von jeweils 10 prioritären Baumarten für Afrika und Lateinamerika

Stichprobennahme

Es waren drei verschiedene Phasen der Stichprobennahme geplant:

- Während einer ersten Stichprobennahme sollten von sechs Bäumen je Baumart größere Mengen frischen Pflanzenmaterials gewonnen werden. Das Material dieser Proben sollte umfangreiche Mengen DNA guter Qualität für die DNA-Sequenzierung zur Genmarkerentwicklung liefern. Die sechs Bäume je Art sollten jeweils von zwei verschiedenen Orten mit einem Mindestabstand von 200 km zwischen den Orten stammen. Es sollte sichergestellt werden, dass das Pflanzenmaterial sehr schnell zum Ort der DNA-Extraktion geschafft wird.
- In der zweiten Phase der Stichprobennahme sollten für jede Baumart Blattproben oder Kambiumproben von insgesamt 40 verschiedenen Orten (Populationen) eingesammelt werden. Je Ort sollten Proben von 20-30 Individuen geerntet werden. Je Baumart sollten so insgesamt 800-1200 Referenzproben zusammenkommen. Wegen der Überlappung des Verbreitungsgebiets der meisten Baumarten schätzten wir, dass an einem Ort jeweils ca. 30% bis 50% aller Baumarten zu finden sein würden. Daher sollten für die Beprobung des Referenzmaterials insgesamt ca. 100 Orte in Afrika und 100 Orte in Lateinamerika aufgesucht werden. Das Pflanzenmaterial sollte in Silika-Gel gelagert und so gut erhalten werden, um dann im zeitlichen Abstand von mehreren Wochen zum Ort der DNA-Extraktion transportiert zu werden.
- Die letzte Stichprobennahme sollte dem Zweck dienen, in den Zielregionen Holzproben für einen Blindtest zu sammeln. Hierbei wurden je Baumart 20 Holzproben von verschiedenen Orten benötigt. Dabei sollten auch Orte sein, für die es kein Referenzmaterial gibt.

In früheren Forschungsprojekten, die nicht dem Ziel der Holzherkunftskontrolle dienten, wurden für einige der Zielbaumarten bereits Stichproben gesammelt. Diese Proben waren zu einem Teil am Anfang des Projekts noch vorhanden und wurden bei unterschiedlichen Institutionen gelagert. Diese Proben stellten eine sinnvolle Ergänzung zu den neuen Stichproben dar, wenn deren DNA noch von ausreichender Qualität war. Zur Sicherung des Zugangs zu diesen Proben war ein Budget

vorgesehen, dass den entsprechenden Projektpartnern eine sinnvolle Beteiligung an dem Projekt ermöglichen sollte.

Genetisches Screening

Die DNA im Holz ist je nach Alter und Verarbeitung sehr stark degradiert. Als Genmarker für die Anwendung beim Holz eigneten sich daher besser solche, die genetische Unterschiede in sehr kurzen DNA-Fragmenten analysieren (Rachmayanti et al. 2009). Auch ist im Holz die DNA der Chloroplasten und Mitochondrien besser erhalten als die DNA des Zellkerns (Tnah et al. 2012). Basierend auf den Erfahrungen in vorhergegangenen und laufenden Projekten (BMEL Merbau, RussiaFarEast, ITTO-Afrika) waren die sog. Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) die besten Genmarker für die Holzherkunftsidentifizierung. Diese Genmarker repräsentieren die kleinste mögliche Einheit der genetischen Variation, nämlich die Variation einzelner Basen. Bei Bäumen findet man im Genom ca. alle 200 bis 600 Basen einen SNP (Neale and Kremer 2011). Wir planten daher einen Ansatz, bei dem sowohl SNPs des Zellkerns als auch SNPs der Plastiden (Chloroplasten, Mitochondrien) als Genmarker benutzt werden sollten.

In dem Vorhaben sollte der Aufbau der genetischen Referenzdaten in vier Schritten erfolgen: Zunächst mussten für jede Baumart mit Hilfe der DNA-Sequenzierung potentielle SNPs identifiziert werden. Hier wollten wir moderne Methoden des „Next Generation Sequencing“ einsetzen, um für jede Art eine große Zahl potentieller SNPs (> 1000) zu identifizieren. Die gängigen Methoden hierfür waren die Rad-Sequenzierung (Pujolar et al. 2014), das von der Universität Adelaide entwickelte Crops Verfahren und das „Skimming“ (Besnard et al. 2014). Diese Sequenzierarbeiten sollten im Vorhaben von Fremdfirmen (u.a. Floragenex) und von der Universität Adelaide erledigt werden. Das Thünen-Institut sollte die bioinformatische Aufarbeitung der Daten vornehmen, um so die potentiellen Genmarker zu identifizieren. Dann planten wir ein Prae-Screening, um damit mehrere hundert potentielle SNPs auswählen und jeweils bei 96 Proben testen zu können. Diejenigen SNPs, die zuverlässig reproduzierbar waren, auch beim Holz gute Ergebnisse lieferten und genügend Unterschiede zwischen verschiedenen Herkunftsregionen zeigten, sollten dann für das eigentliche Screening verwendet werden. Hier planten wir, alle Referenzproben an 120-240 ausgewählten SNPs zu genotypisieren. Auf diese Weise wollten wir unsere genetischen Referenzdaten erhalten. Wir sahen hierfür das Sequenome Verfahren (McKernan et al. 2002) vor. Die Auswertung und Aufarbeitung der Daten sollte durch Mitarbeiter des Thünen-Instituts sowie durch verschiedene Projektpartner erfolgen. In einfach ausgestatteten Laboren in Afrika und Lateinamerika konnte die Genotypisierung mit Sequenome nicht durchgeführt werden. Damit die SNPs in diesen Laboren dennoch später zur Holzherkunftsidentifizierung genutzt werden konnten, planten wir in einem weiteren Schritt die Entwicklung vereinfachter Verfahren zur Genotypisierung besonders informativer SNPs. Dafür sollten für jede Baumart 10-20 SNPs ausgewählt werden. Hier planten wir einen PCR-RFLP Ansatz, der dann auch mit einfacher Laborausstattung fehlerfrei durchgeführt werden konnte (Cullings 1992). Schließlich wollten wir die Genauigkeit und Praxistauglichkeit der Genmarker und Referenzdaten mit Hilfe von Blindtests überprüfen. Für jede Baumart sollten dabei von einem unabhängigen Team im Zielgebiet aber auch in nicht beprobten Regionen 20 Holzproben gesammelt und dem Labor zur Analyse zugeschickt werden.

Technologietransfer / Ausbildung

Die Partner in den tropenholzproduzierenden Ländern sollten auch in der Lage sein, die Holzherkunft zu überprüfen. Hierfür planten wir für Personen des technischen und wissenschaftlichen Bereichs aus den Partnerländern jeweils Ausbildungsaufenthalte beim Thünen-Institut und anderen genetischen Laboren. Ziel der Ausbildung sollte es sein, die Techniken der Probennahme, DNA-Extraktion, der Genmarkeranwendung und die Datenauswertung zu schulen. Dem gleichen Zweck sollten Ausbildungswerkshops in den tropischen Ländern dienen. In Afrika

planten wir die Unterstützung in Form von zusätzlicher Ausrüstung und weiteren Schulungen für das Labor von FORIG in Kumasi (Ghana) zu intensivieren. In Südamerika wollten wir das Labor des INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE LA AMAZONIA PERUANA in Iquitos als Referenzlabor einrichten. Das Labor in Peru wurde 2013 von einer Mitarbeiterin des Thünen Instituts besucht und hatte sich dabei als sehr vielversprechend für Arbeiten zur Holzherkunftsidentifizierung herausgestellt.

Koordinierung

Für die Koordinierung hatten wir am Thünen-Institut einen Wissenschaftler für die gesamte Laufzeit des Projekts vorgesehen. Zu seinen Aufgaben sollte die Gestaltung der Verträge mit den Partnern, die Organisation von Projekttreffen und Workshops und die Kommunikation und Berichterstattung zählen. Hierbei sollte er sich auf die Arbeiten in Afrika konzentrieren. Ferner sollte er die Unterstützung der Referenzlabore organisieren und sich um die Bedarfsermittlung, den Kauf und die Installation der zusätzlichen Ausrüstung für die Referenzlabore kümmern. Ferner sahen wir einen Forstingenieur für die ersten 12 Monate des Projekts vor, um die Stichprobennahme zu organisieren und deren Fortschritt und Qualität durch Besuche vor Ort sicherzustellen. Ein Verwaltungsangestellter sollte befristet für die finanzielle Administration bei der Thünen-Verwaltung eingestellt werden. Als weitere Elemente der Koordinierung waren mindestens einmal pro Jahr Projekttreffen mit den Partnern in Südamerika und Afrika geplant. Die Referenzdaten sollten zunächst in einheitlicher Weise am Thünen-Institut in eine Datenbank aufgenommen und dann den jeweiligen Projektpartnern und dem Global Timber Tracking Network (GTTN) zur Verfügung gestellt werden.

Small-Scale Erweiterung

Hintergrund

Für nachhaltig wirtschaftende forstliche Unternehmen, insbesondere solche, die der Zertifizierung unterliegen, wäre es von Interesse, auch auf kleiner räumlicher Ebene den sicheren Nachweis der Holzherkunft zu erbringen. Hierbei geht es um die Ebene einzelner forstlicher Konzessionen und damit in den beteiligten Ländern um Flächen von 30.000 bis 200.000 ha. Vor einigen Jahren konnten wir bereits für eine Forstkonzession in Kamerun zeigen, dass der Ansatz grundsätzlich funktioniert (Jolivet and Degen 2012). Während des Projekts hatten sich jedoch die genetischen Methoden deutlich weiterentwickelt, so dass wir im Rahmen einer zusätzlichen Pilotstudie mit noch besseren Ergebnissen rechnen konnten.

Ziele

Wir wollten in Form einer Machbarkeitsstudie für drei Forstkonzessionen in den Ländern Kamerun, Peru und Brasilien für insgesamt drei Baumarten (*Lophira alata*, *Hymenaea courbaril*, *Dipterix odorata*) demonstrieren, dass mit vertretbarem Aufwand der Herkunftsnachweis auf kleiner räumlicher Ebene möglich ist. Je Forstkonzession sollte eine Zielbaumart sowohl mit den bereits entwickelten SNPs als auch zusätzlich mit stabilen Isotopen untersucht werden. Ein Blindtest sollte zeigen, wie zuverlässig der Herkunftsnachweis für Holz aus bestimmten Forstkonzessionen gelingt. Die Ergebnisse sollten publiziert und auf der Abschlusskonferenz vorgestellt werden. Der neue Ansatz, Legalitätsnachweise mit Nachhaltigkeitsnachweisen zu kombinieren, hat ein großes Potential als neues Auditsystem in zertifizierten Forstbetrieben.

Arbeitsschritte

Insgesamt planten wir für den Zeitraum von April 2017 bis Dezember 2018 in der Demonstrationsstudie neun Arbeitsschritte. Je Baumart und Konzession wollten wir 100 Bäume beproben. Jede dieser Referenzproben sollte an 120 SNPs genotypisiert und zusätzlich an verschiedenen stabilen Isotopen bestimmt werden. Für die Isotopenuntersuchungen sollten jedoch noch jeweils 25 Bäume je Art in jeweils zwei benachbarten Forstkonzessionen gewonnen werden.

Damit kommen wir für die Isotopenuntersuchung auf insgesamt 510 Proben (3 x 100 Bäume in der Zielkonzession + 6 x 25 Bäume in benachbarten Konzessionen + 60 Blindtestproben). Die Genauigkeit des Verfahrens wollten wir an insgesamt 60 Blindtestproben überprüfen. Hierbei sollte es sich um jeweils 20 Holzproben je Baumart und Forstkonzession handeln, die mit richtigen und falschen Angaben zum geographischen Ursprung versehen werden sollten.

Referenzdaten für stabile Isotope auf Landesebene

Zur Herkunftsbestimmung von Holz werden neben genetischen Daten auch stabile Isotope genutzt (Dormontt et al. 2015). Das Thünen-Institut hatte während der Projektlaufzeit die Voraussetzungen geschaffen, solche Daten selbst zu generieren. In der Small-Scale Studie (siehe oben) sollte auch in diesem Projekt bereits Material für Isotopen-Analysen gesammelt. Für die Baumarten *Carapa guianensis* und *Hymenaea courbaril* beabsichtigten wir, in der Projektverlängerung in Brasilien, jeweils repräsentativ über das natürliche Verbreitungsgebiet je Art, von 300 Bäumen Holzbohrkerne für Isotopenanalysen zu gewinnen. Diese Proben sollten dann an mindestens vier der sechs Isotope C, N, O, H, S und Si analysiert werden. In der anschließenden Datenauswertung sollten dann auf Landesebene die Genauigkeit der Rückverfolgung von stabilen Isotopen mit der von genetischen Daten verglichen werden. So könnten dann Strategien zur effektiven Kombination von alternativen Bestimmungsverfahren entwickelt werden.

DNA-Sequenzierung und zusätzliches genetisches Screening für einige Baumarten

Die Holzhändler müssen gemäß EU-Holzhandelsverordnung neben den Angaben zur Holzherkunft auch Angaben zur botanischen Art machen. Bei unseren Arbeiten im Projekt hatte sich bei mehreren Gattungen gezeigt, dass die Unterscheidung zwischen Arten schwierig und offensichtlich häufig fehlerhaft war. Besondere Probleme ergaben sich bei den Gattungen *Hymenaea* und *Handroanthus*. Wir konnten zeigen, dass mit Hilfe von umfangreichen DNA-Sequenzierungen die Genbereiche, die eine Artunterscheidung ermöglichen, identifiziert werden können (Mader et al. 2018). Hierfür ist es wichtig, möglichst viele und große Bereiche des Genoms der betreffenden Arten zu sequenzieren. Bei der DNA-Sequenzierung werden je nach verwendetem Verfahren DNA-Fragmente von 100bp bis mehreren Tausend bp erzeugt. Mit modernen bioinformatischen Methoden und leistungsstarken Rechenkapazitäten können dann anhand von Überlappungen in der DNA-Sequenz die richtigen DNA-Fragmente zusammengeführt werden.

Für solche DNA-Sequenzierung benötigten wir frische DNA von guter Qualität. Daher planten wir für insgesamt sechs Baumarten der Gattungen *Handroanthus* vormals *Tabebuia* (*H. serratifolius*, *H. incanus* und *H. impetiginosus*) und *Hymenaea* (*H. courbaril*, *H. longifolia*, *H. subsessilis*) von den Projektpartnern in Brasilien, Peru und Französisch Guayana jeweils 20 Proben von taxonomisch eindeutig bestimmbar Bäumen je Art und Land für die neuerliche DNA-Sequenzierung einsammeln zu lassen.

Für die DNA-Sequenzierung sollten die zwei modernen Verfahren Double-Digestion-Rad (de Medeiros and Farrell 2018, Maroso et al. 2018) und Gras-Di (<https://www.eurofinngenomics.com/en/about-us/news/all/toyota-eg-japan/>) zum Einsatz kommen. Als Endergebnis der vergleichenden DNA-Sequenzierung erwarteten wir dann mehrere hundert SNPs, von denen wir die vielversprechendsten an einem größeren Satz von Individuen mit Hilfe der MassARRAY®iPLEX™ -Genotypisierung testen wollten.

1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Vorhabens

Zu Beginn des Projektes waren alle wesentlichen technischen Voraussetzungen zur erfolgreichen Bearbeitung des Projekts vorhanden und das Thünen-Institut hatte diese zuvor in einem mehrere Länder umfassenden Projekt in Afrika mit guten Ergebnissen angewendet (Degen and Bouda 2015). Die Entwicklung und das großflächige Screening mit den SNP-Genmarkern hatten wir zuvor bereits gemacht (Jardine et al. 2016). Ansätze zur effektiven Sequenzierung der DNA zur Identifizierung von Genmarkern mit einem räumlichen genetischen Muster (RAD-Sequenzierung, Skimming) standen zur Verfügung (Besnard et al. 2014, Pujolar et al. 2014). Für eine effektivere DNA-Extraktion aus Holz hatten wir zuvor gemeinsam mit einem Team an der Universität Adelaide (Australien) ein Patent eintragen lassen (WO 2015/070279). Effektive Methoden und Software zur Datenauswertung, insbesondere zur räumlichen Zuordnung fraglicher Proben nach einem DNA-Test, standen zur Verfügung [z.B. das Programm GeneClass (Piry et al. 2004)] und wir hatten selber mit der weiteren Verbesserung der Auswerteroutinen begonnen (Degen et al. 2017).

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

In der Vorbereitungsphase zum Projekt hatten wir diverse potentielle Partner kontaktiert und deren mögliche Beiträge zum Projekt diskutiert. Die Projektpartner wurden als Unterauftragnehmer in das Projekt eingebunden. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Partner und deren Beiträge zum Projekt.

Bei der Bearbeitung der afrikanischen Gattung *Khaya* hatten wir eine enge Kooperation mit zwei anderen Projekten. Dabei handelt es sich zum einen um ein Projekt, welches von Bioversity International in Rom koordiniert wird, zum anderen um ein Projekt im Rahmen der Promotion von Gael Bouka-Diplelet aus dem Kongo an der Universität in Montpellier (Frankreich). Durch diese Kooperation konnten wir den Umfang der untersuchten Referenzproben erheblich ausweiten und wir konnten sehr von der langjährigen botanischen Expertise an der Universität Montpellier im Bereich der taxonomischen Zuordnung von Proben zu Arten innerhalb der Gattung *Khaya* profitieren.

Land	Institut /Person /Ort	Aufgabe
Deutschland	Thünen-Institut Großhansdorf	Koordinierung Genmarkerentwicklung Genetisches Screening, Datenauswertung Ausbildung Personal Referenzlabore
Deutschland	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg	DNA-Sequenzierung, Entwicklung Genmarker
Australien	Universität Adelaide	Genmarkerentwicklung Genetisches Screening, Datenauswertung Ausbildung Personal Referenzlabore
Belgien	Universität Brüssel, Nature +	Stichprobennahme Afrika, Bereitstellung Altproben, Genetisches Screening Ausbildung Personal Referenzlabore
Bolivien	Dr. Kathelyn Paredes	Stichprobennahme in Bolivien, Datenauswertung
Brasilien	Barbara Rocha, Curitiba Prof. Alexandre Sebbenn, Sao Paulo Forest Research Institute	Stichprobennahme in Brasilien DNA Extraktion des brasilianischen Materials Datenauswertung
Französisch Guayana	INRA, UMR EcoFog Kourou	Stichprobennahme in Französisch Guayana Genmarkerentwicklung, Datenauswertung Ausbildung
Frankreich	INRA Bordeaux,	Genetisches Screening, Datenauswertung
Ghana	Forest Research Institute of Ghana (FORIG, Kumasi)	Stichprobennahme in Westafrika (Ghana, Elfenbeinküste, Liberia, Nigeria) Genetisches Referenzlabor - Afrika
Großbritannien	CEH, Edinburgh	Stichprobennahme Lateinamerika, Bereitstellung Altproben Organisation und Auswertung Blindtest Genetisches Screening, Datenauswertung Ausbildung Personal Referenzlabore
Kamerun	Gersyn Services, Yaounde	Stichprobennahme in Zentralafrika (Kamerun, Gabun, Kongo)
Peru	Peruvian Amazon Research Institute (IIAP), Iquitos	Stichprobennahme Peru Genetisches Referenzlabor Lateinamerika DNA Extraktion Proben aus Peru

Tabelle 2: Partner des LargeScale-Projekts und deren Beiträge

2 Eingehende Darstellung

2.1 Ergebnisse, Verwendung der Zuwendung und Vergleich mit den Zielen

2.1.1 Generelle Methodenbeschreibung

Stichprobennahme

Wir führten die Stichprobennahme wie geplant in drei Phasen durch. Zunächst wurde für die DNA-Sequenzierung und Genmarkerentwicklung für jede Baumart von 2 bis 35 Bäumen frisches Blatt – und Kambiummaterial gesammelt (Tabelle 3). Das Ziel war hierbei, je Baumart DNA guter Qualität von sechs Bäumen zu gewinnen. Die sechs Bäume sollten dabei aus zwei Regionen mit einem Mindestabstand von 200 km gewonnen werden. Leider war die DNA Qualität und Menge nicht immer für Sequenzierung ausreichend, so dass wir in zwei Fällen verwertbare Proben von weniger Bäumen bekamen (*Lophira*, *Handroanthus*).

Kontinent / Baumart	Anzahl beprobter Bäume	Herkunft
Afrika		
<i>Aucoumea klaineana</i>	6	Gabun
<i>Cylicodiscus gabunensis</i>	6	Kamerun, Gabun, Kongo Brazzaville
<i>Entandrophragma utile</i>	6	Ghana, Kamerun, DR Kongo, Kongo Brazzaville
<i>Khaya sp.</i>	5	Kamerun, Kongo Brazzaville, Ghana
<i>Lophira alata</i>	4	Gabun, Kamerun
<i>Nauclea diderrichii</i>	8	Kamerun, Kongo Brazzaville, DR Kongo, Nigeria
<i>Pterocarpus soyauxii</i>	7	Kamerun, DR Kongo
Südamerika		
<i>Carapa sp.</i>	7	Französisch Guayana, Bolivien
<i>Cedrela sp.</i>	35	Peru, Bolivien
<i>Dipteryx sp.</i>	9	Französisch Guayana, Peru
<i>Handroanthus sp.</i>	2	Französisch Guayana
<i>Hymenaea sp.</i>	10	Französisch Guayana, Peru
<i>Jacaranda copaia</i>	11	Französisch Guayana, Peru
<i>Simarouba amara</i>	10	Französisch Guayana, Peru

Tabelle 3: Übersicht zu den beprobten Bäumen für die Gewinnung hochwertiger DNA

In der zweiten Stichprobenphase sollten die eigentlichen Referenzproben je Baumart von 40 Orten mit 20-40 beprobten Bäumen je Ort gesammelt werden. Die beprobten Orte sollten geographisch so verteilt werden, dass sie möglichst große Teile des natürlichen Verbreitungsgebiets der Baumarten abdecken. Der Plan war es, je Baumart zwischen 800 und 1600 Referenzproben zu gewinnen. In den meisten Fällen gelang dies und wir konnten insgesamt 18.269 Proben einsammeln (Tabelle 4, Abbildung 1). Teilweise waren es wegen der geringen Dichte weniger Proben je Ort. Die Proben der Gattung *Khaya* beinhalten auch Proben, die wir aus der Kooperation mit Bioversity International und der Universität im Kongo erhielten. Die Partner aus Belgien steuerten aus vorherigen Einsammlungen in Afrika für die Baumart *Entandrophragma utile* 29, für *Cylicodiscus gabonensis* 22, für *Pterocarpus soyauxii* 242, für *Lophira alata* 236 und für

Nauclea diderrichii 45 Proben bei. Ebenso lieferte uns Dr. Stephen Cavers (CEH, UK) aus vorhergehenden Projekten in Lateinamerika für die Baumarten *Cedrela sp.* und *Hymenaea sp.* insgesamt 770 Proben. Zusätzlich standen uns am Thünen-Institut aus vorhergehenden Untersuchungen für die Gattung *Swietenia* ca. 2000 Proben zur Verfügung.

In Afrika wurden alle Proben in Silikagel gelagert und transportiert. In Südamerika kamen ebenfalls in Silikagel gelagerte Proben aus Französisch Guyana und Bolivien, während die Partner in Brasilien und Peru die DNA-Extraktion in Laboren vor Ort durchführten und fertige DNA lieferten.

Afrika	N Individuen	N Orte	Südamerika	Anzahl	N Orte
<i>Aucoumea klaineana</i>	1301	30	<i>Carapa sp.</i>	1119	38
<i>Cylicodiscus gabunensis</i>	1048	38	<i>Cedrela sp.</i>	2060	53
<i>Entandrophragma utile</i>	755	37	<i>Dipteryx sp.</i>	1029	38
<i>Khaya sp.</i>	1996	102	<i>Handroanthus sp.</i>	952	27
<i>Lophira alata</i>	1481	93	<i>Hymenaea sp.</i>	1643	58
<i>Nauclea sp.</i>	1413	63	<i>Jacaranda copaia</i>	1061	43
<i>Pterocarpus soyauxii</i>	848	116	<i>Manilkara huberi</i>	426	17
			<i>Simarouba amara</i>	927	37
			<i>Swietenia macrophylla</i>	210	12
Gesamt	8842	479	Gesamt	9427	323

Tabelle 4: Eingesammeltes Material der Referenzproben

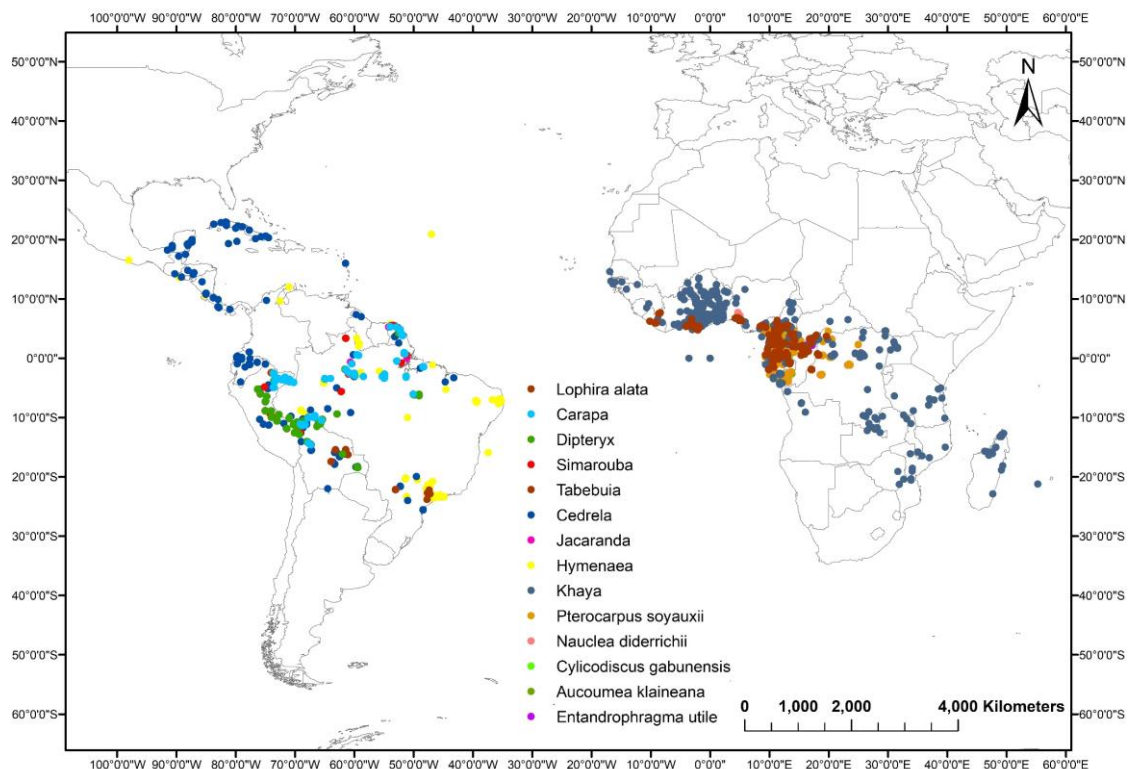


Abbildung 1: Räumliche Verteilung der Probenpunkte (jede Farbe repräsentiert eine andere Art / Gattung)

In der dritten Phase sollten schließlich für den Blindtest für jede Baumart Proben von 20 Bäumen gesammelt werden. Idealerweise sollten dabei von jedem Baum die drei verschiedenen Gewebearten Blatt, Kambium und Holz beprobt werden. Da die DNA im Holz deutlich stärker degradiert ist, kann ein Fehler beim Blindtest nicht nur von einer unzureichenden Referenzdatenbank sondern auch von der DNA-Qualität herrühren. Die Erfolgsquote getrennt nach Gewebetyp sollte hierüber Auskunft geben. Eine weitere Vorgabe war, dass ein Teil der Proben aus Regionen stammen sollte, für die keine Referenzproben gesammelt wurden. Die Koordination der Probennahme, das anonymisierte Verschicken der Proben für die Untersuchung zum Thünen-Institut und die Auswertung der Ergebnisse übernahm der Projektpartner CEH (UK). So sollte die Unabhängigkeit beim Blind-Test sichergestellt werden.

Es konnten für jede Baumart bis auf *Manilkara* über 20 Proben für den Blindtest gesammelt werden (Tabelle 5). Die Dreifachbeprobung derselben Bäume mit verschiedenen Gewebearten gelang jedoch nur unvollständig.

Kontinent/ Gattung/Art	Kambium	Blatt	Holz	Gesamt
Südamerika				
<i>Carapa sp.</i>	19	1	28	48
<i>Cedrela sp.</i>	26	8	53	87
<i>Dipteryx sp.</i>	18	6	40	64
<i>Handroanthus sp.</i>	6	6	18	30
<i>Hymenaea courbaril</i>	15	5	22	42
<i>Jacaranda copaia</i>	21		34	55
<i>Manilkara huberi</i>	5		11	16
<i>Simarouba amara</i>	16	3	35	54
<i>Swietenia macrophylla</i>	9		16	25
Summe	130	29	246	405
Afrika				
<i>Aukoumea klaineana</i>	11	10	11	32
<i>Cylicodiscus gabunensis</i>	19	14	18	51
<i>Entandrophragma utile</i>	64	46	44	154
<i>Khaya sp.</i>	46	39	45	130
<i>Lophira alata</i>	25	22	24	71
<i>Nauclea diderrichii</i>	30	29	28	87
<i>Pterocarpus soyauxii</i>	13	13	13	39
Summe	208	173	183	580

Tabelle 5: Probennahme für den Blindtest

DNA-Sequenzierung

Der erste Schritt zur Identifizierung von SNP-Genmarkern war die DNA-Sequenzierung. Hierbei wurden große Teile des Genoms von verschiedenen Individuen jeder Art sequenziert und dann auf Unterschiede in der Abfolge des genetischen Codes hin untersucht. Bei punktuellen Unterschieden, das heißt beim Unterschied von nur einer Base an der gleichen Stelle, handelt es sich um einen SNP (Single Nucleotid Polymorphism). Wir setzten im Projekt zwei verschiedene Methoden des modernen „Next Generation Sequencing“ ein:

- Bei der RAD-Sequenzierung (Miller et al. 2007) wird die DNA mit Restriktionsenzymen geschnitten und die Sequenzierung erfolgt ausschließlich im Bereich dieser Schnittstellen. Diese Methode liefert zumeist SNPs des Zellkerns (= nukleare SNPs oder kurz „nSNPs“). Da nicht das gesamte Genom sequenziert wird, sondern nur bestimmte Bereiche, handelt es sich um ein Verfahren mit „reduzierter Komplexität“. Für jede Baumart hatten wir hierfür drei Individuen sequenziert. Diese stammten aus zwei bis drei verschiedenen Ländern. Wir erhielten so für jede Baumart mehrere Tausend potentielle SNPs.
- Um auch aus dem Bereich der Plastiden (Chloroplasten + Mitochondrien) SNPs zu gewinnen, nutzten wir als weiteres Verfahren das sog. Skimming (Straub et al. 2012). Hierbei erfolgt keine Reduzierung der Komplexität durch den Einsatz von Restriktionsenzymen, sondern die deutlich höhere Häufigkeit der Plastiden führt dazu, dass auch mit geringer Abdeckung (Wiederholung = „Coverage“) ausreichend häufig die gleichen DNA-Sequenzabschnitte sequenziert wurden. Pro Baumart nutzten wir für das Skimming 4 bis 10 Individuen unterschiedlicher geographischer Herkunft. Bei den Laubbaumarten werden die SNPs im Chloroplasten und in den Mitochondrien zumeist mütterlich vererbt. Ihre räumliche Verbreitung erfolgt daher nur über die Samen. Und dies führt zumeist zu stärkeren räumlichen genetischen Mustern bei dieser Art von Genmarkern.

Eine Übersicht zum genutzten Material für die DNA-Sequenzierung zur Genmarkerentwicklung gibt Tabelle 6.

Kontinent / Baumart	Anzahl Individuen RADseq	Anzahl Individuen Skimming	Herkunft
Afrika			
<i>Aucoumea klaineana</i>	3	4	Kongo Brazzaville, Gabun
<i>Cylicodiscus gabunensis</i>	3	10	Ghana, Gabun, Kamerun
<i>Entandrophragma utile</i>	3	10	Ghana, Kamerun, Kongo Brazzaville, DR Kongo
<i>Khaya sp.</i>	6	10	Ghana, Kamerun, Kongo, Burkina Faso
<i>Lophira alata</i>	3	10	Nigeria, Kamerun, Kongo Brazzaville, Gabun
<i>Nauclea diderrichii</i>	3	8	Ghana, Kamerun, Gabun
Südamerika			
<i>Carapa sp.</i>	3	4	Französisch Guayana, Bolivien
<i>Cedrela sp.</i>	3	6	Cuba, Bolivien
<i>Dipteryx sp.</i>	3	4	Französisch Guayana, Bolivien, Peru
<i>Handroanthus sp.</i>	3	4	Französisch Guayana, Bolivien
<i>Hymenaea sp.</i>	3	10	Französisch Guayana, Brasilien, Bolivien, Honduras
<i>Jacaranda copaia</i>	3	4	Französisch Guayana, Bolivien
<i>Simarouba amara</i>	3	4	Französisch Guayana, Peru

Tabelle 6: Übersicht zum genutzten Material für DNA-Sequenzierung zur Genmarkerentwicklung
Auswahl SNPs und Genotypisierung

Die bioinformatische Auswertung der RAD- und Skimmingdaten lieferte für jede Baumart mehrere Tausend potenzielle SNPs. In einem nächsten Schritt wählten wir hiervon je Art zwischen 195 und 482 SNPs für ein Prae-Screening aus. Hiervon waren ca. 30% der SNPs in den Plastiden und ca. 70% im Zellkern lokalisiert. Das Prae-Screening erfolgte je Baumart an 94 Individuen. Diese waren über das gesamte beprobte Gebiet verteilt. Die Genotypen der SNPs wurden vom Partner INRA in Bordeaux mit Hilfe des MassArray-Verfahrens der Firma Agena Bioscience bestimmt (McKernan et al. 2002). Das Prae-Screening diente dem Zweck für das eigentliche Screening der Referenzproben, die am besten geeigneten SNPs auszuwählen. Für die Auswahl nutzten wir verschiedene Kriterien:

- Möglichst geringe Ausfallrate bei der Bestimmung der SNPs (Vollständigkeit der Daten)
- Gute Ergebnisse bei verschiedenen Gewebearten
- Möglichst hohe genetische Vielfalt
- Starke genetische Unterschiede zwischen verschiedenen Regionen
- Positive Korrelation zwischen räumlicher Entfernung und genetischen Unterschieden

Die Anwendung dieser Kriterien führte zur Auswahl von 84-136 SNPs je Art. Für die meisten Baumarten ist zu der Genmarkerentwicklung bereits eine Publikation erstellt worden (Tabelle 7).

Kontinent / Baumart	Anzahl SNPs Prae-screening	Anzahl SNPs Screening	Referenz
Afrika			
<i>Aucoumea klaineana</i>	195	91	
<i>Cylicodiscus gabunensis</i>	382	124	
<i>Entandrophragma utile</i>	446	118	
<i>Khaya sp.</i>	482	120	Pakull et al. (2016)
<i>Lophira alata</i>	397	126	
<i>Nauclea diderrichii</i>	205	88	Honorio Coronado et al. (2019)
Südamerika			
<i>Carapa sp.</i>	261	120	Tysklind et al. (2019)
<i>Cedrela sp.</i>	351	136	
<i>Dipteryx sp.</i>	315	100	Honorio Coronado et al. (2019)
<i>Handroanthus sp.</i>	402	121	Meyer-Sand et al. (2018)
<i>Hymenaea sp.</i>	358	125	Chaves et al. (2018)
<i>Jacaranda copaia</i>	407	130	Sebbenn et al. (2019)
<i>Simarouba amara</i>	398	84	
<i>Swietenia macrophylla</i>	410	120	

Tabelle 7: Anzahl getesteter SNPs im Prae-Screening und Anzahl ausgewählter SNPs für das Screening, Publikation zur Genmarkerentwicklung.

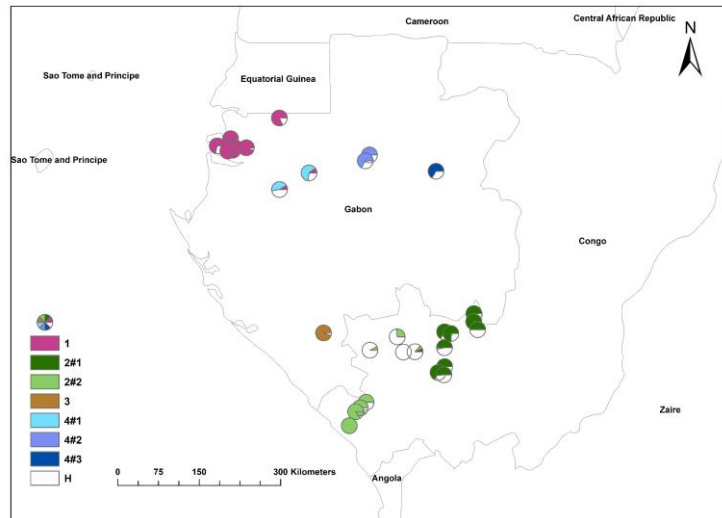
2.1.2 Datenauswertung der genetischen Referenzdaten

Für jede Baumart bzw. Gattung suchten wir nach unterscheidbaren genetischen Gruppen. Ein übliches Verfahren hierfür ist die Bayesische Clusteranalyse mit der Software STRUCTURE (Pritchard et al. 2000). Dabei haben wir für die meisten Arten drei Datensätze verrechnet: a) nukleare SNPs, b) platidiäre SNPs, c) alle SNPs zusammen. Das Computerprogramm testet iterativ verschiedene Anzahlen an genetischen Gruppen. Mit Ansätzen von Evanno et al. (2005) und Kopelman et al. (2015) bestimmten wir die Anzahl genetischer Gruppen, die statistisch am besten zu den Daten passten. Die Ergebnisse veranschaulichten wir dann mit dem Geographischen Informationssystem ArcGIS anhand von Karten. Die genetischen Gruppen wurden jeweils mit verschiedenen Farben dargestellt (Abbildungen 2-19). Farbnuancen innerhalb einer Farbe geben das Ergebnis einer hierarchischen STRUCTURE-Analyse wieder. Dabei wurde zunächst die Hauptgruppe identifiziert und dann innerhalb jeder Hauptgruppe nur mit den Daten dieser Individuen nach einer weiteren Untergruppierung gesucht (Janes et al. 2017).

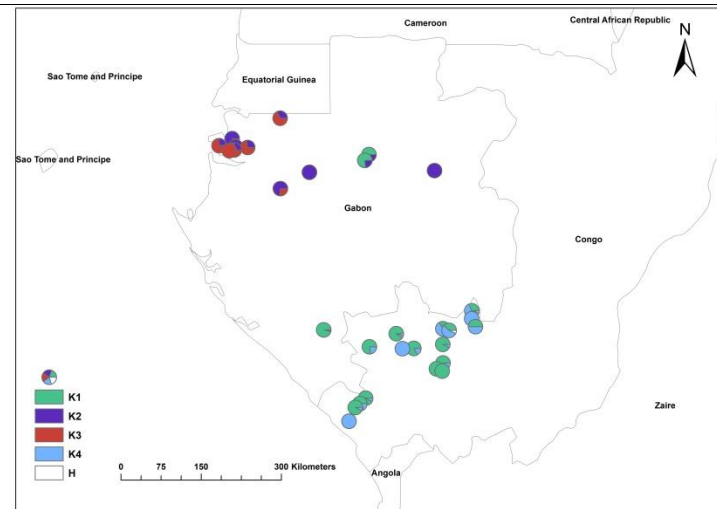
Baumart

Aucoumea klaineana

Nukleäre SNPs



Plastidiäre SNPs



Alle SNPs

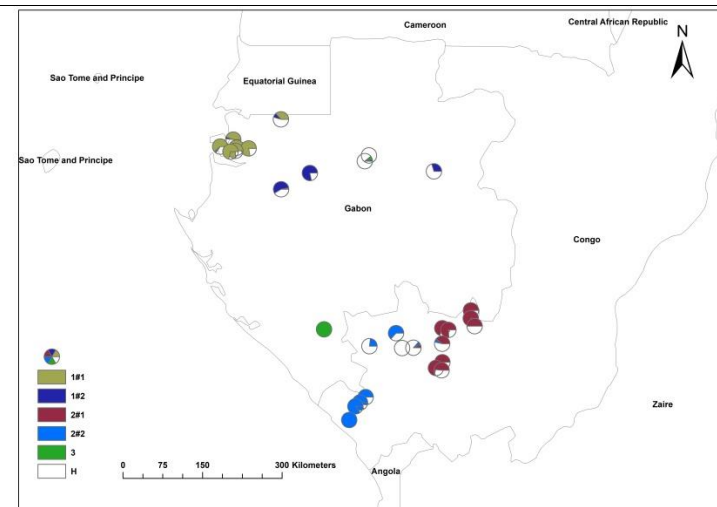
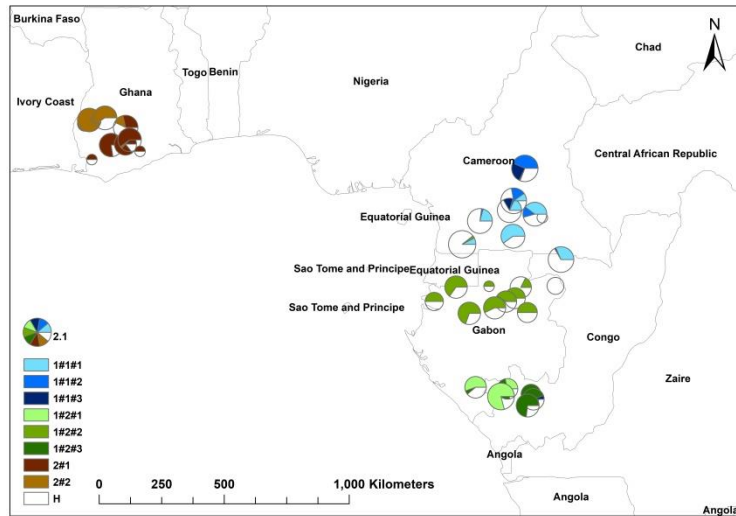
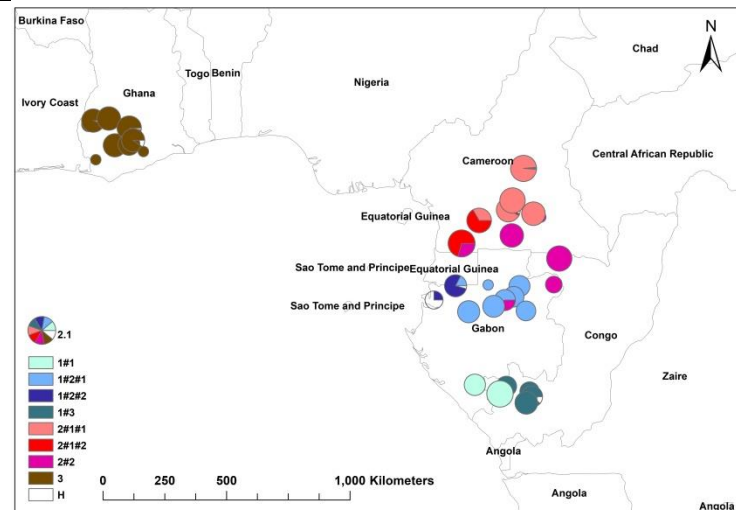


Abbildung 2a,b,c: Räumliche Verteilung der genetischen Gruppen für die Baumart *Aucoumea klaineana*

Nukleäre
SNPsPlastidiäre
SNPs

Alle SNPs

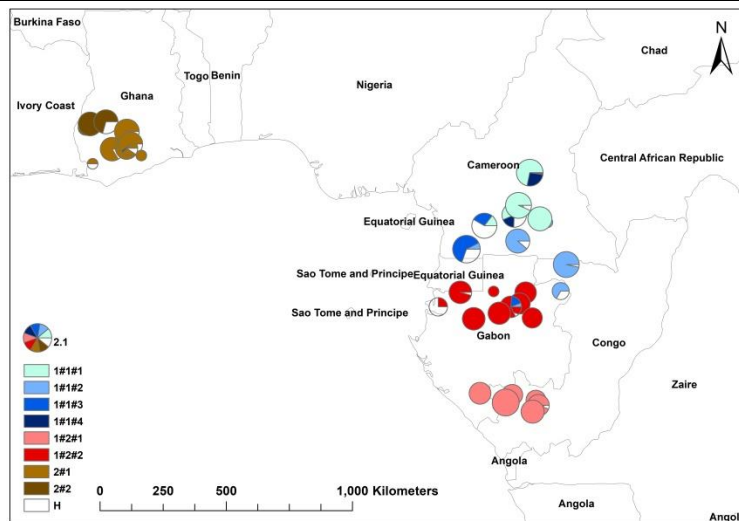


Abbildung 3a,b,c: Räumliche Verteilung der genetischen Gruppen für die Baumart *Cylicodiscus gabunensis*

Baumart***Entandrophragma utile***

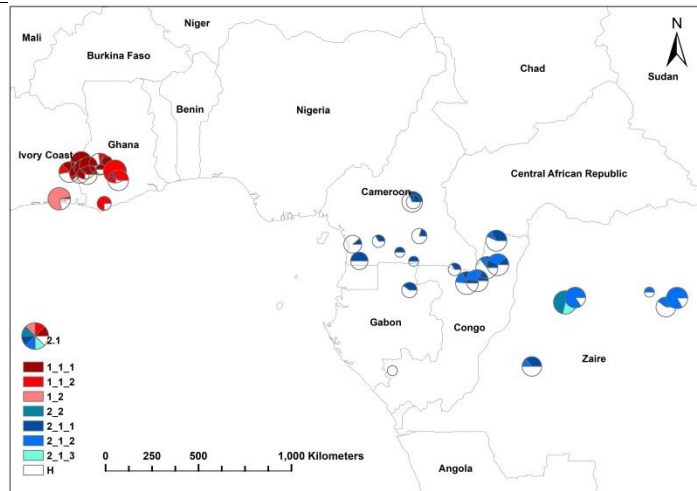
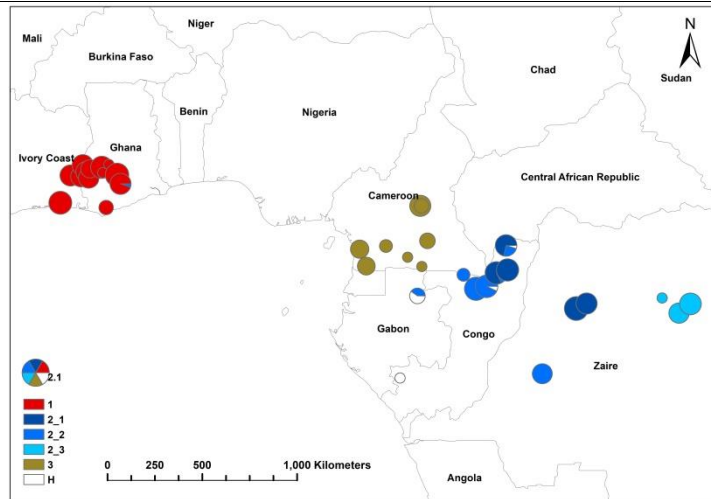
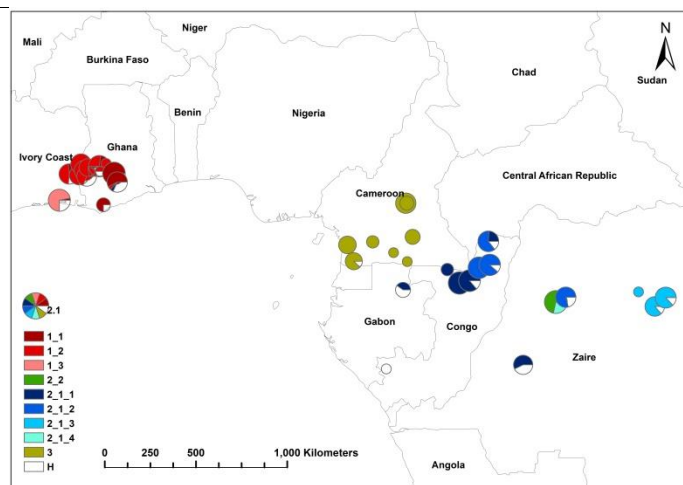
**Nukleäre
SNPs****Plastidiäre
SNPs****Alle SNPs**

Abbildung 4 a,b,c: Räumliche Verteilung der genetischen Gruppen für die Baumart *Entandrophragma utile*

Baumart***Khaya anthotheca***

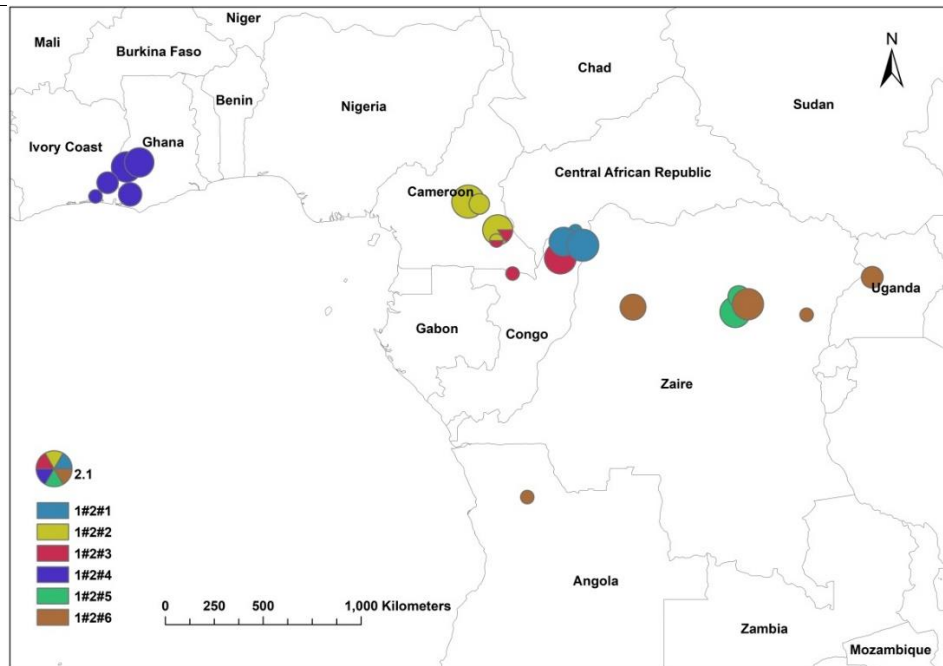
Alle SNPs

Abbildung 5: Räumliche Verteilung der genetischen Gruppen für die Baumart *Khaya anthotheca*

Baumart***Khaya grandifoliola***

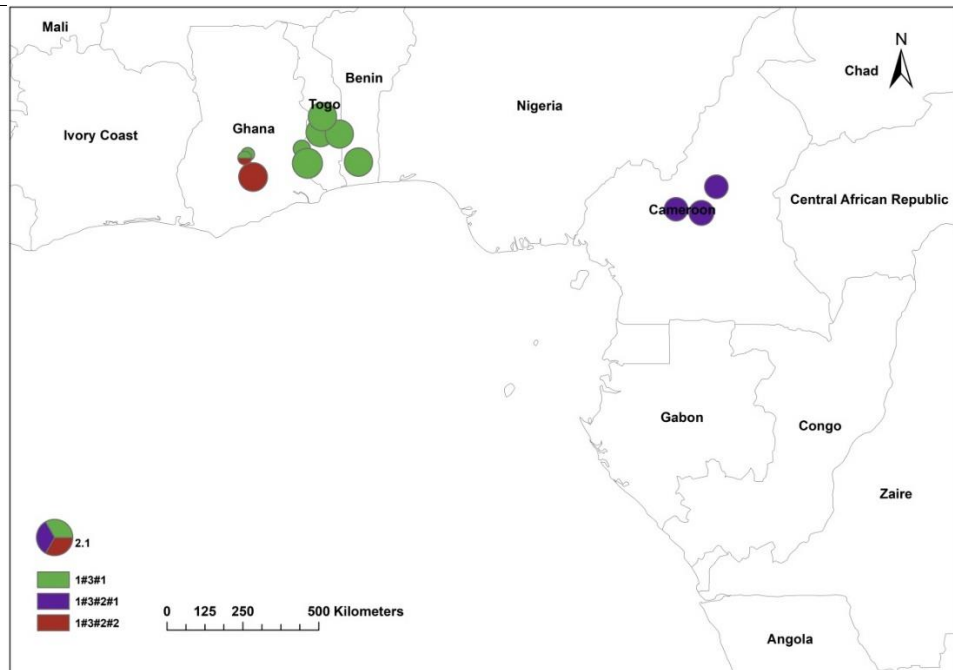
Alle SNPs

Abbildung 6: Räumliche Verteilung der genetischen Gruppen für die Baumart *Khaya grandifoliola*

Baumart***Khaya ivorensis***

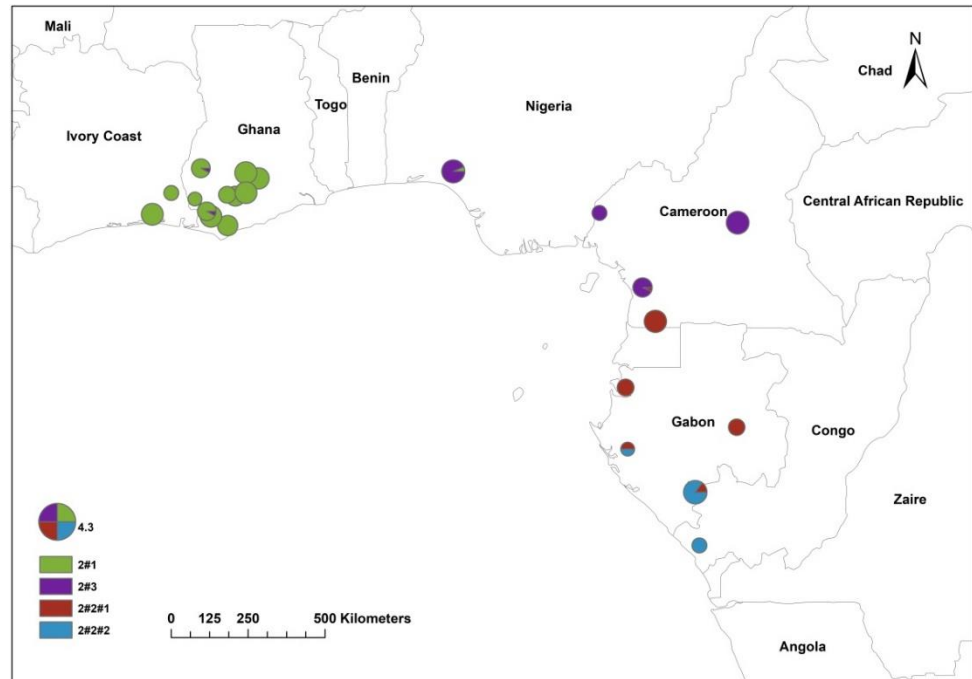
Alle SNPs

Abbildung 7: Räumliche Verteilung der genetischen Gruppen für die Baumart *Khaya ivorensis*

Baumart***Khaya senegalensis***

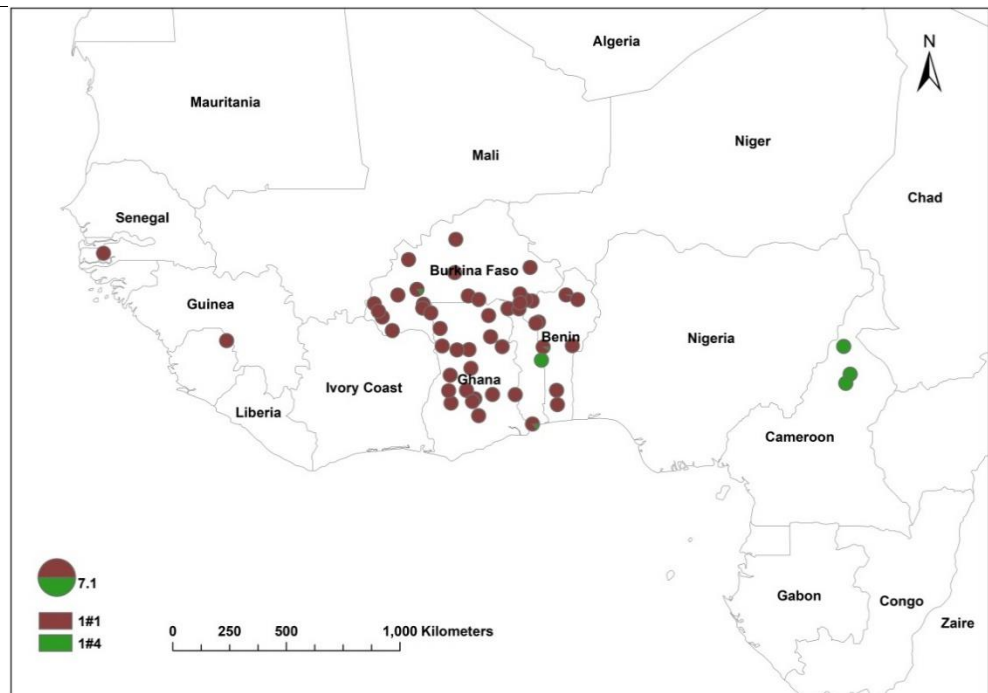
Alle SNPs

Abbildung 8: Räumliche Verteilung der genetischen Gruppen für die Baumart *Khaya senegalensis*

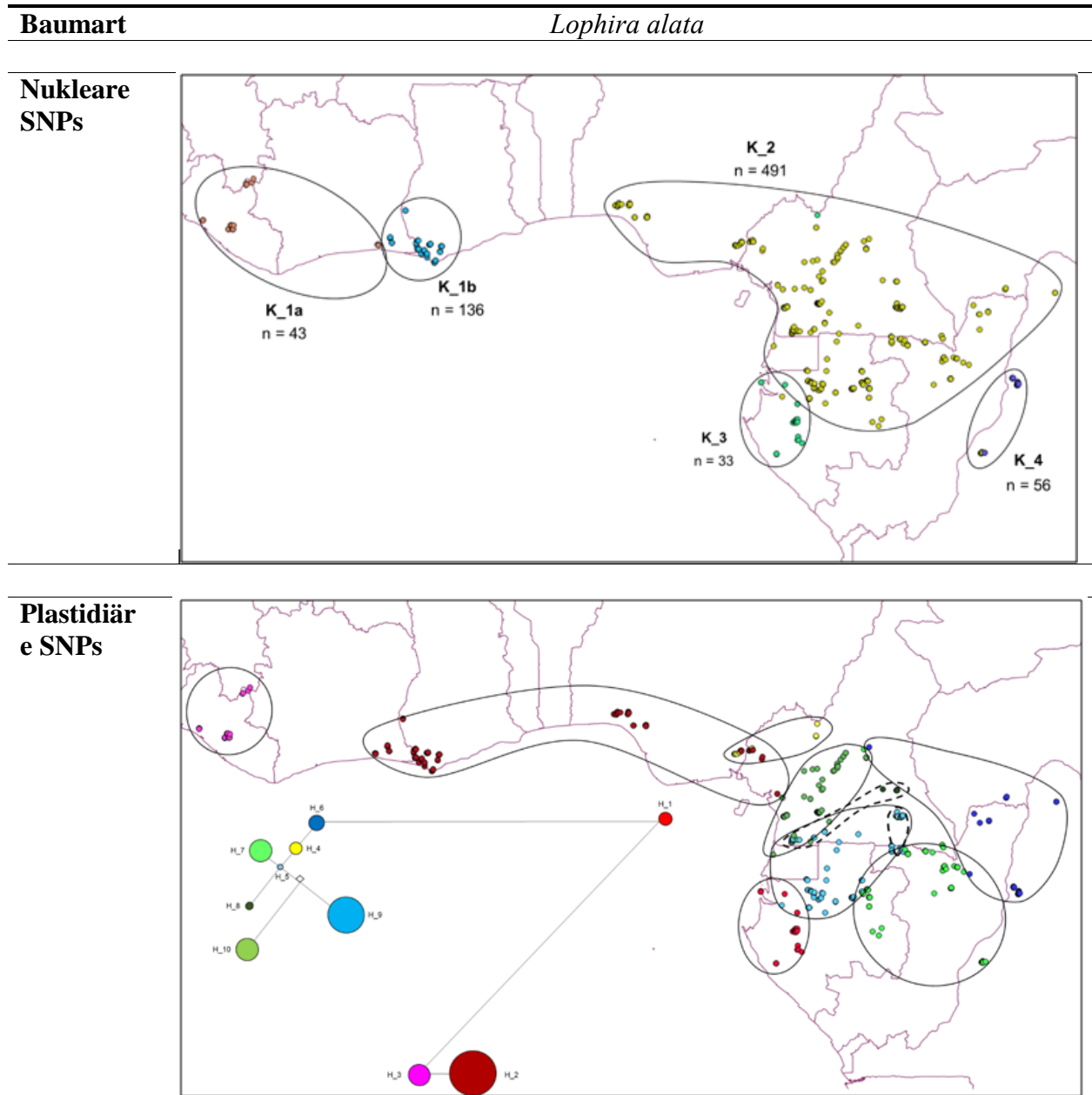
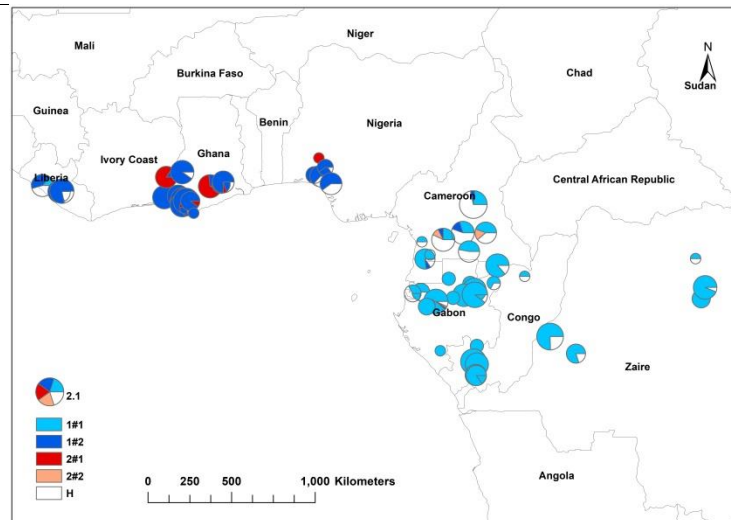
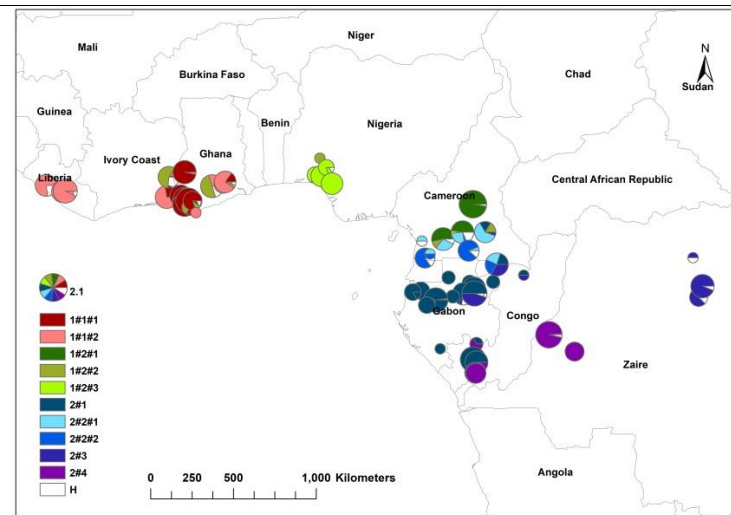


Abbildung 9,a,b: Räumliche Verteilung der genetischen Gruppen für die Baumart *Lophira alata*

Nukleare
SNPsPlastidiäre
SNPs

Alle SNPs

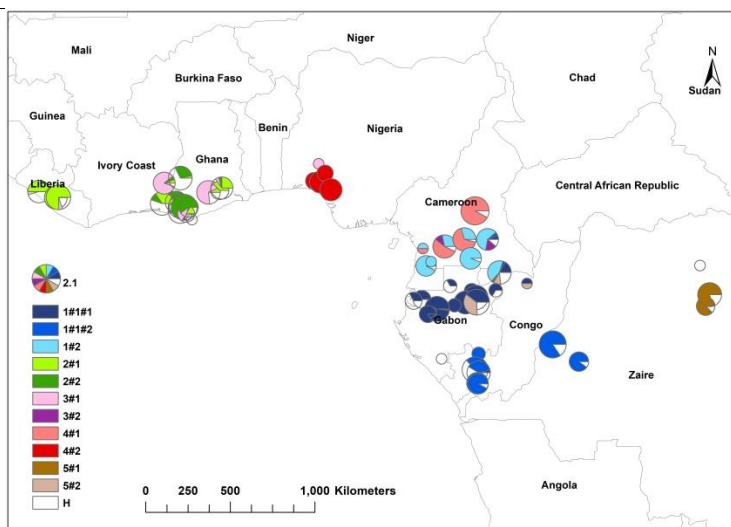


Abbildung 10, a,b,c: Räumliche Verteilung der genetischen Gruppen für die Baumart *Nauclea diderrichii*

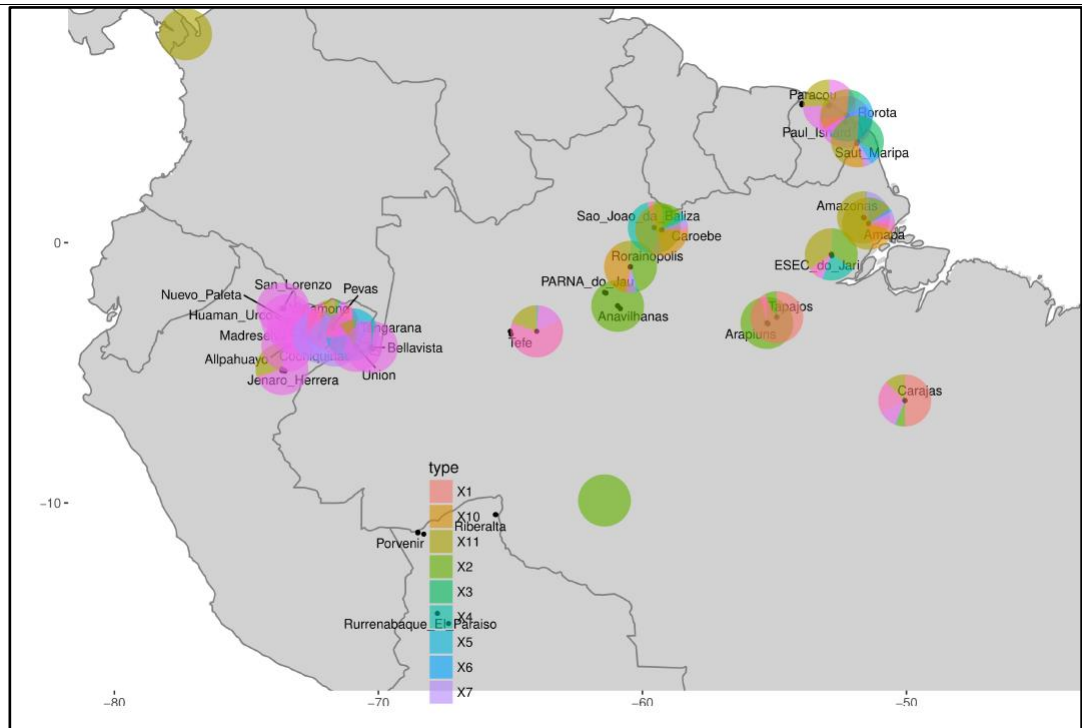
Nukleare
e SNPs

Abbildung 11: Räumliche Verteilung der genetischen Gruppen für die Baumart *Carapa sp.*

Baumart***Cedrela fissilis***

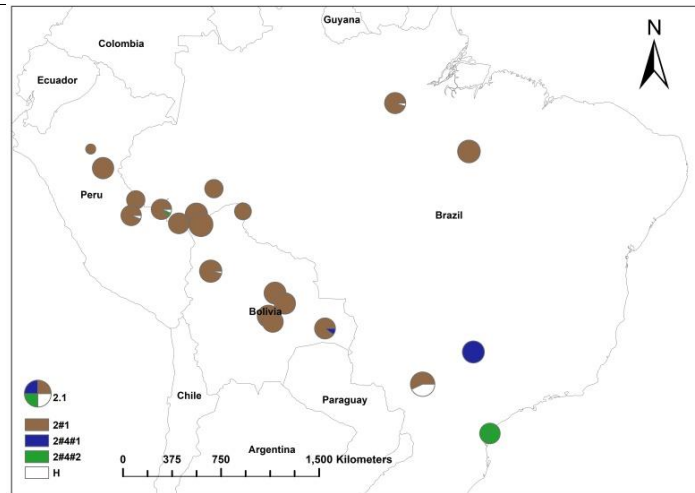
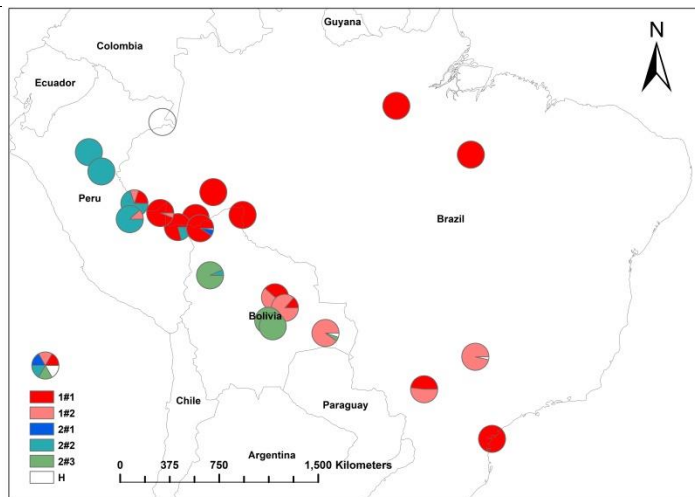
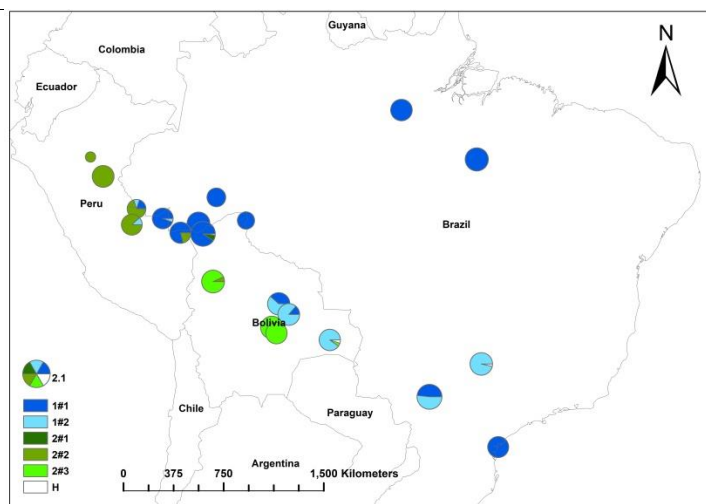
**Nukleare
SNPs****Plastidiäre
SNPs****Alle SNPs**

Abbildung 12,a,b,c: Räumliche Verteilung der genetischen Gruppen für die Baumart *Cedrela fissilis*

Baumart***Cedrela odorata***

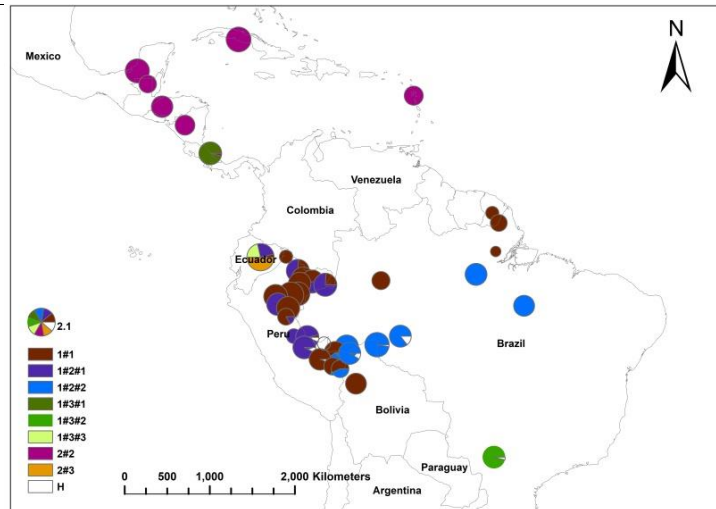
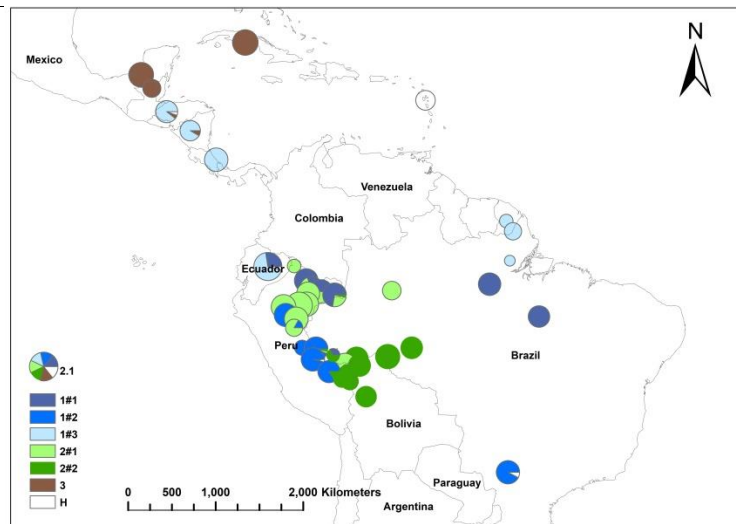
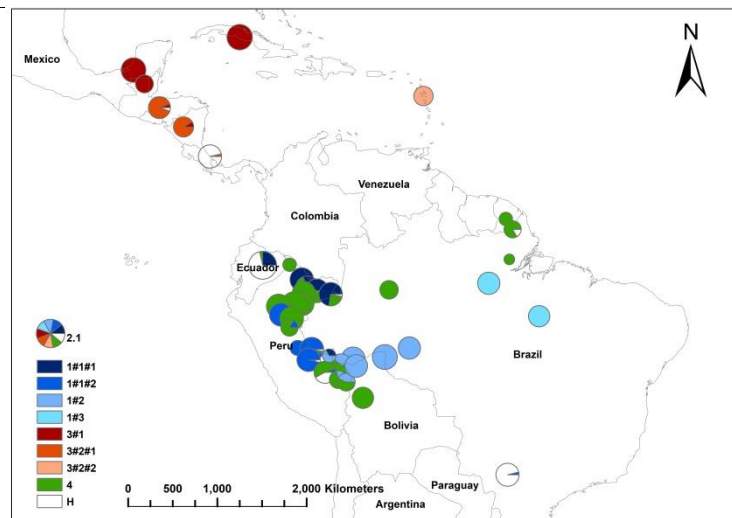
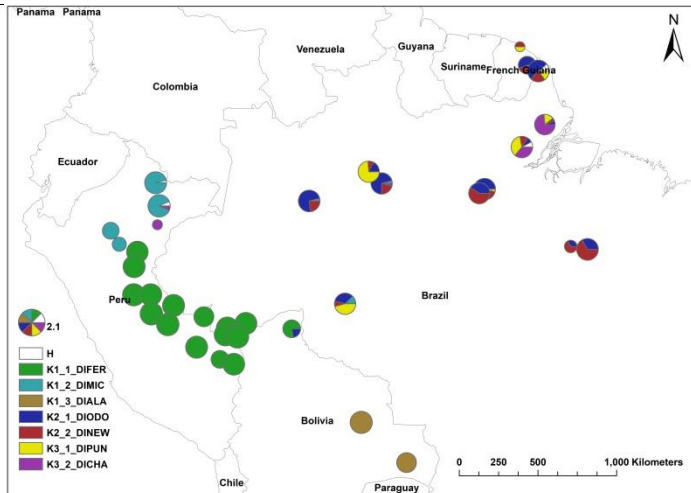
**Nukleare
SNPs****Plastidiäre
SNPs****Alle SNPs**

Abbildung 13,a,b,c: Räumliche Verteilung der genetischen Gruppen für die Baumart *Cedrela odorata*

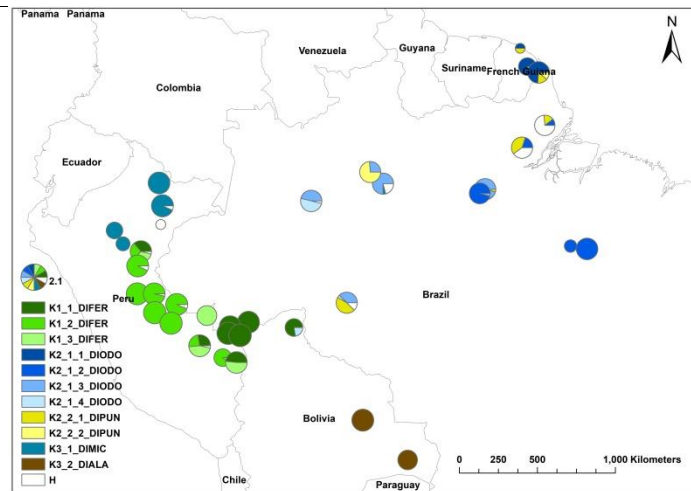
Baumart

Dipteryx sp.

Nukleare SNPs



Plastidiäre SNPs



Alle SNPs

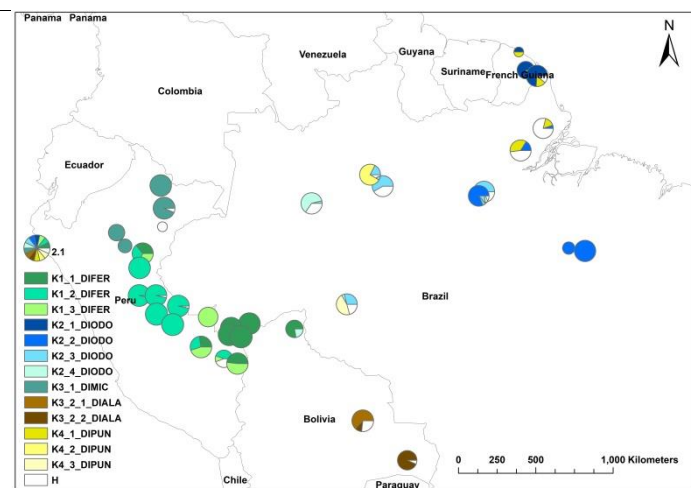
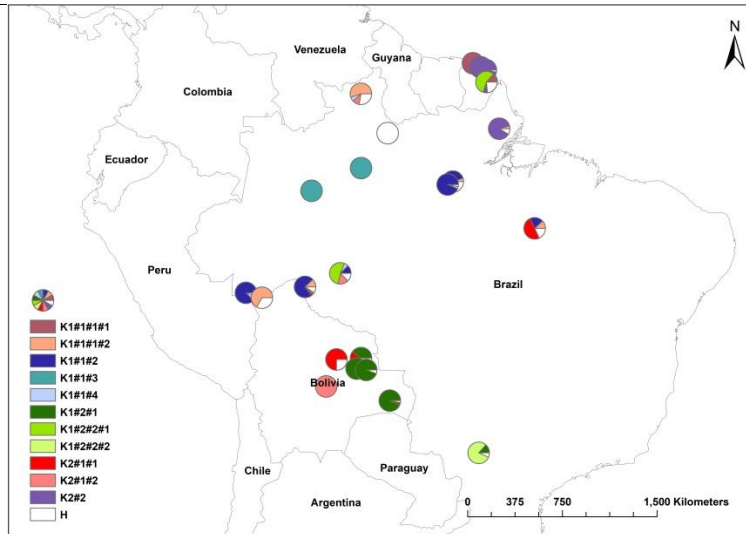


Abbildung 14 a,b,c: Räumliche Verteilung der genetischen Gruppen für die Baumart *Dipteryx sp.*

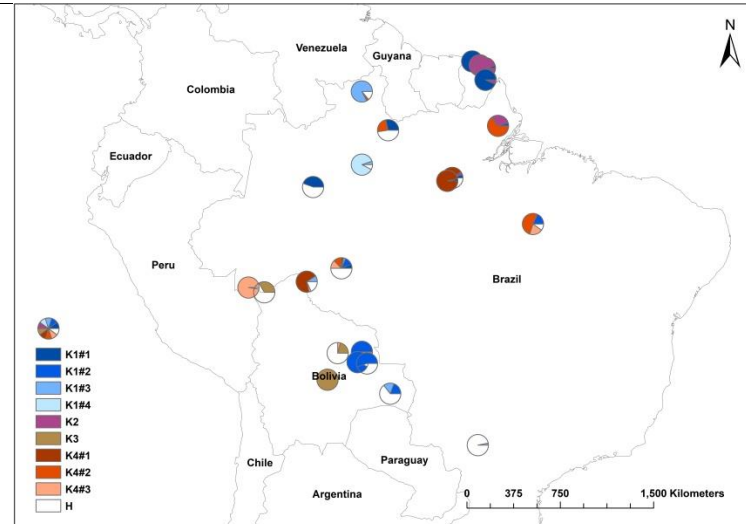
Baumart

Handroanthus sp.

**Nukleare
SNPs**



**Plastidiäre
SNPs**



Alle SNPs

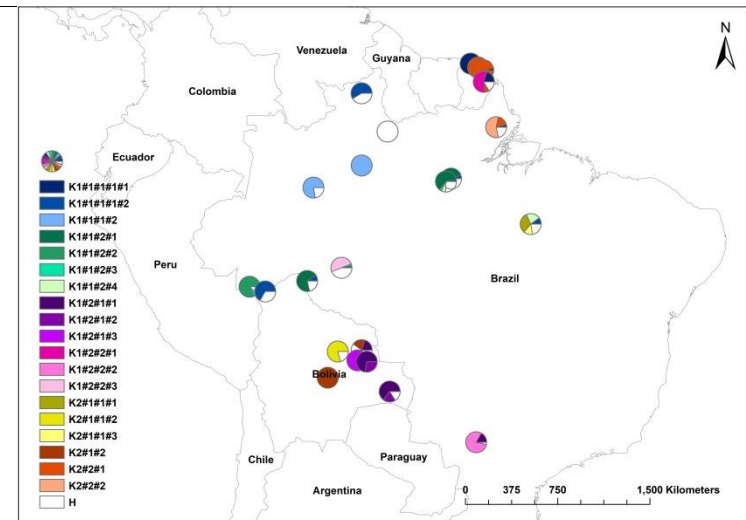
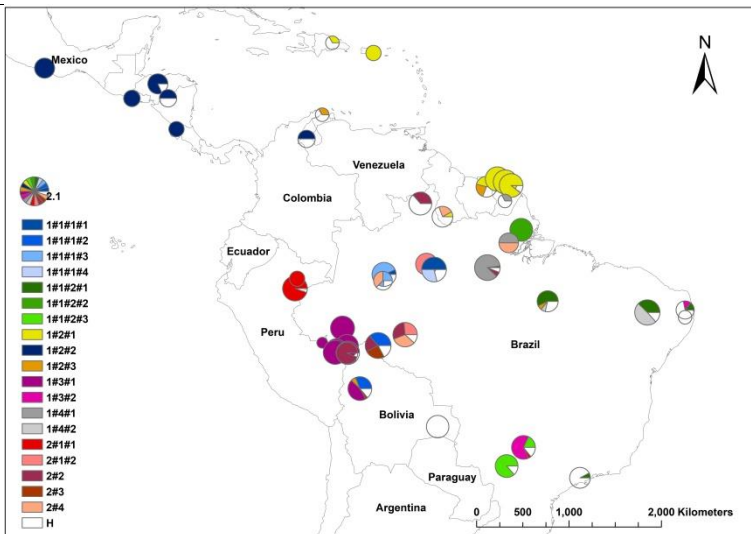
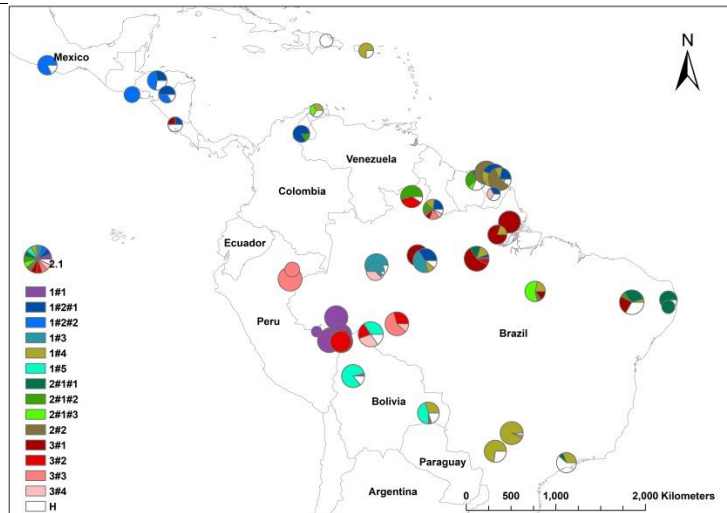


Abbildung 15 a,b,c: Räumliche Verteilung der genetischen Gruppen für die Baumart *Handroanthus sp.*

Nukleare
SNPsPlastidiäre
SNPs

Alle SNPs

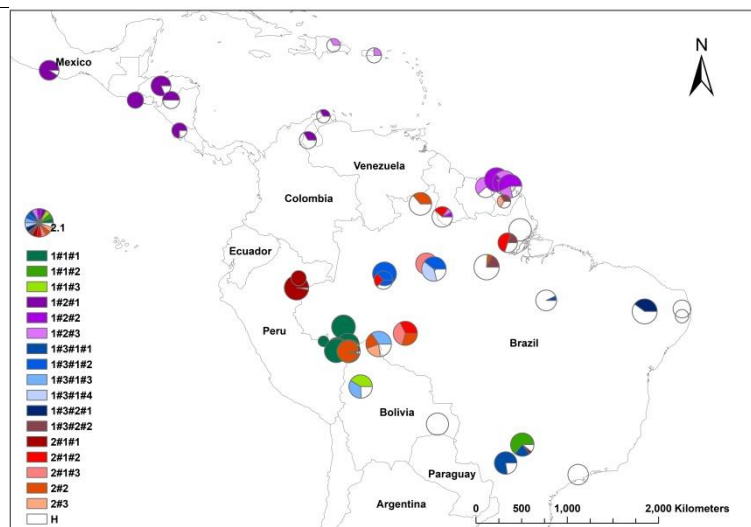
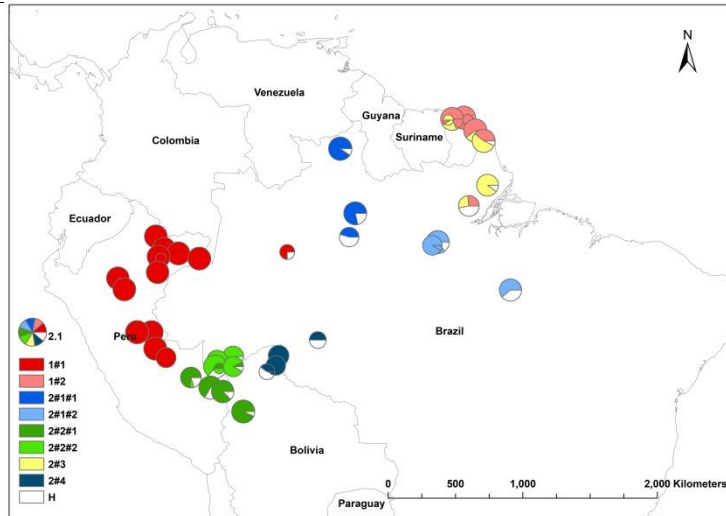


Abbildung 16 a,b,c Räumliche Verteilung der genetischen Gruppen für die Baumart *Hymenaea sp.*

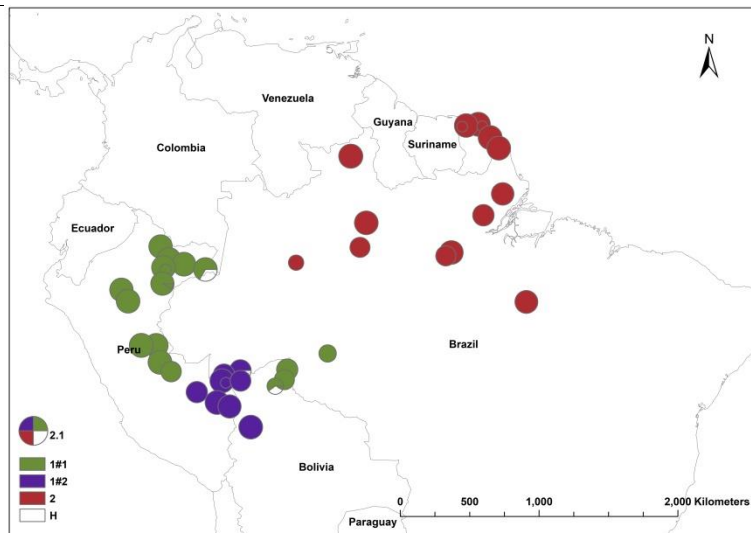
Baumart

Jacaranda copaia

Nukleare SNPs



Plastidiäre SNPs



Alle SNPs

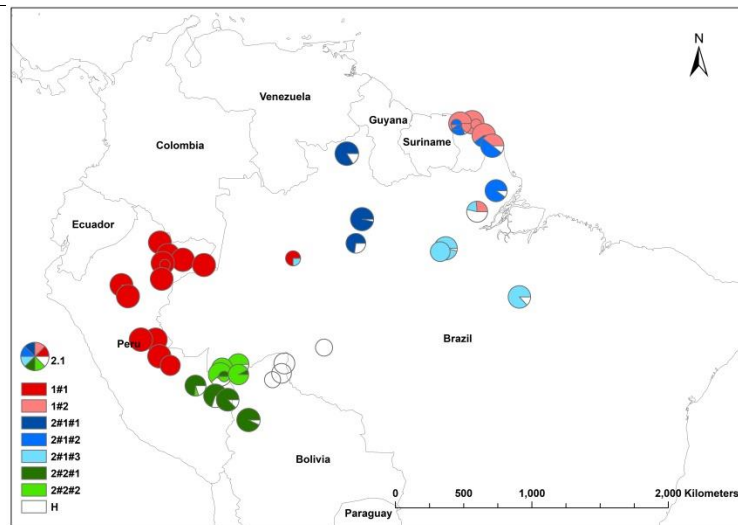


Abbildung 17 a,b,c: Räumliche Verteilung der genetischen Gruppen für die Baumart *Jacaranda copaia*

Baumart***Simarouba amara***

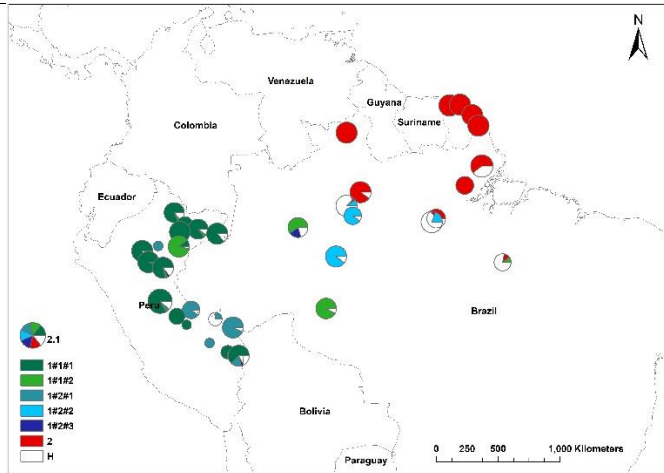
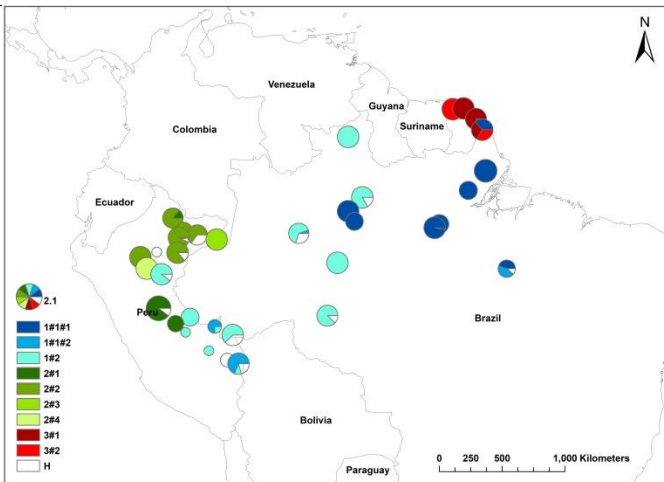
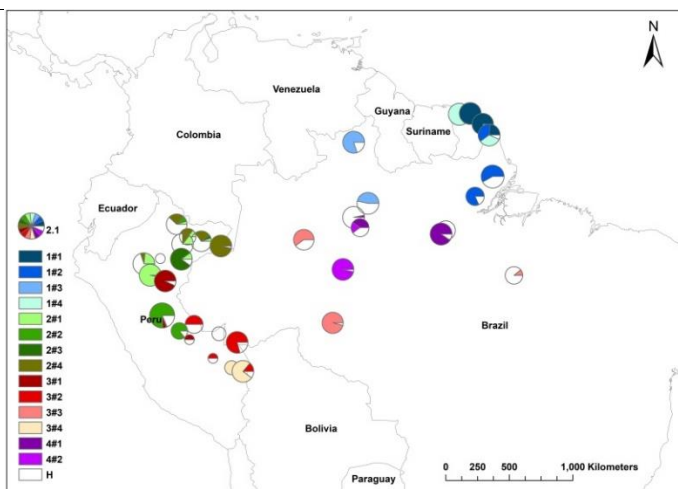
**Nukleare
SNPs****Plastidiäre
SNPs****Alle SNPs**

Abbildung 18 a,b,c: Räumliche Verteilung der genetischen Gruppen für die Baumart *Simarouba amara*

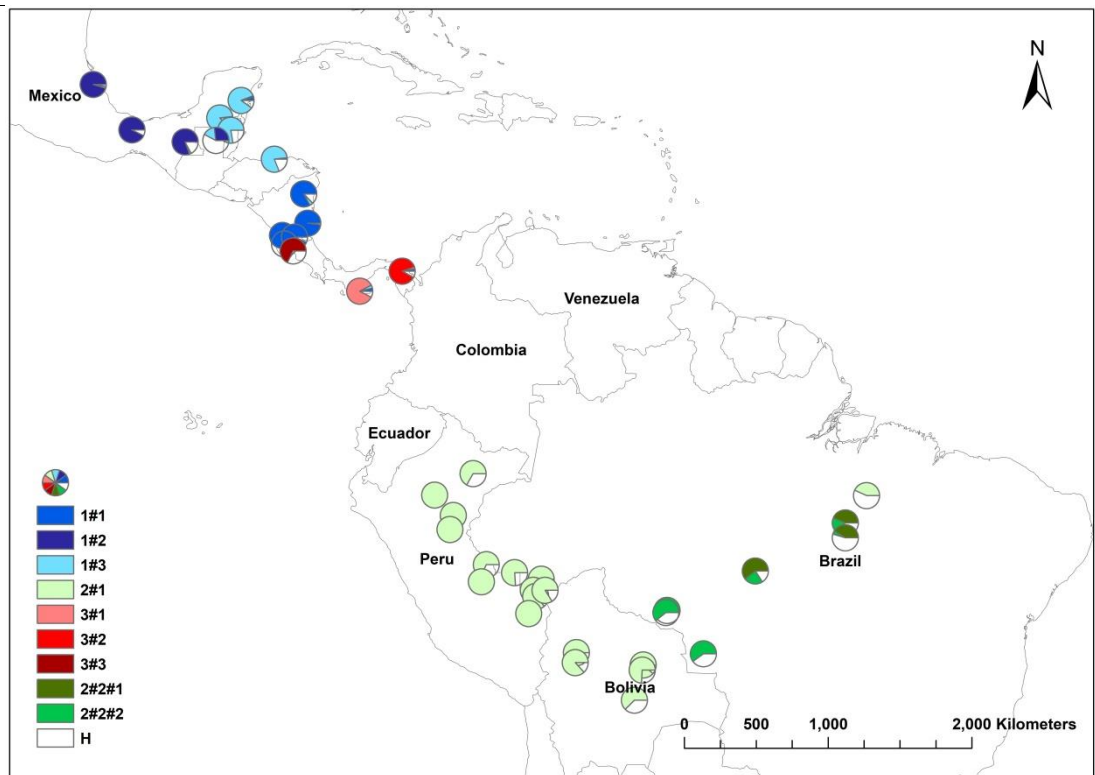
Nukleare
e SNPs

Abbildung 19: Räumliche Verteilung der genetischen Gruppen für die Baumart *Swietenia macrophylla*

2.1.3 Eignung der genetischen Referenzdaten zur Herkunftsidentifizierung

Genetische Differenzierung

Bei einer Überprüfung von Angaben zur Holzherkunft wird in der Praxis die fragliche Holzprobe genetisch untersucht und mit den genetischen Referenzdaten verglichen. Mit Hilfe einer statistischen Auswertung wird dann ermittelt, ob die deklarierte Herkunft zu der genetischen Zusammensetzung in dem angegebenen Herkunftsland passt. Möglichst starke Unterschiede in der genetischen Zusammensetzung einer Baumart in verschiedenen Ländern oder geographischen Regionen sind eine wesentliche Voraussetzung für das Gelingen einer Herkunftsidentifizierung. Allerdings sind die genetischen Unterschiede einer Baumart in verschiedenen Gebieten fast immer nur gradueller Natur und nicht vollständig. In der Populationsgenetik werden verschiedene Maße genutzt, um diese graduellen Unterschiede zu messen: Weit verbreitet ist das Maß F_{ST} (Weir and Cockerham 1984), das die Fixierung auf einzelne genetische Varianten misst. F_{ST} variiert zwischen 0 und 1. Der Wert $F_{ST}=1$ wird an einem bestimmten Genort dann erreicht, wenn in mindestens einer Population (Land, geographische Region) eine genetische Variante (Allel) eine Häufigkeit von 100 % hat (Fixierung), während in anderen Populationen an diesem Genort mehrere Allele vorkommen. Bei dem Maß δ (Gregorius 1987) hingegen wird der genetische Abstand zwischen einer Population und der genetischen Zusammensetzung aller anderen Populationen berechnet. Auch dieses Maß variiert zwischen 0 und 1. Der Wert 1 wird erreicht, wenn eine Population kein Allel mit den anderen Populationen gemeinsam hat. Eine Übersicht zu diesen beiden Maßen, ausgewertet für die genetischen Referenzdaten, findet sich in Tabelle 8.

Baumart	δ		F_{ST}	
	Land	Region	Land	Region
Afrika				
<i>Aucoumea klaineana</i>	0.18	0.17	0.11	0.22
<i>Cylicodiscus gabunensis</i>	0.20	0.24	0.18	0.48
<i>Entandrophragma utile</i>	0.15	0.24	0.14	0.43
<i>Khaya sp.</i>	0.25	0.28	0.56	0.62
<i>Lophira alata</i>	0.11	0.24	0.08	0.35
<i>Nauclea diderrichii</i>	0.10	0.20	0.14	0.39
Südamerika				
<i>Carapa sp.</i>	0.28	-	0.32	-
<i>Cedrela sp.</i>	0.33	0.24	0.65	0.51
<i>Dipteryx sp.</i>	0.22	0.26	0.48	0.46
<i>Handroanthus sp.</i>	0.10	-	0.06	-
<i>Hymenaea sp.</i>	0.20	0.22	0.26	0.46
<i>Jacaranda copaia</i>	0.23	0.26	0.21	0.39
<i>Simarouba amara</i>	0.28	0.25	0.23	0.39
<i>Swietenia macrophylla</i>	0.32	0.32	0.52	0.59

Tabelle 8: Genetische Differenzierung δ und Fixierung F_{ST} für die untersuchten Baumarten berechnet für die Unterschiede zwischen Ländern und geographischen Regionen mit ähnlicher genetischer Zusammensetzung

Bezogen auf die Länder, in denen die Proben gesammelt wurden, fanden sich besonders große Werte für δ (≥ 0.25) bei den Baumarten *Khaya sp.*, *Carapa sp.*, *Cedrela sp.*, *Simarouba amara*

und *Swietenia macrophylla*. Große Werte für die Fixierung F_{ST} (≥ 0.30) beobachteten wir bei *Khaya* sp., *Carapa* sp., *Cedrela* sp., *Dipteryx* sp. und *Swietenia macrophylla*.

Wir errechneten die genetische Differenzierung bzw. Fixierung auch für eine Einteilung der Individuen nach Regionen. Die Regionen repräsentierten für jede Baumart Gebiete mit ähnlicher genetischer Zusammensetzung, also mit der gleichen genetischen Gruppe gemäß den Karten 2 bis 19. In fast allen Fällen waren die Maße von Δ und F_{ST} für diese Einteilung größer als bei einer Betrachtung nach Ländern. Dies zeigte, dass das genetische Muster nur sehr bedingt den geographischen Grenzen von Ländern folgt. Vielmehr waren populationsgenetische und demographische Prozesse - insbesondere Extinktions- und Wiederbesiedlungsereignisse mit damit einhergehender genetischen Drift und Genfluss über Pollen und Samen für das heutige genetische Muster verantwortlich.

Genetische Selbstzuordnung (Self-assignment)

Mehrere Methoden wurden entwickelt, um Genotypen von Testproben verschiedenen alternativen Gruppen von Referenzdaten zuzuordnen. Die Zuordnung erfolgt hierbei zumeist anhand der Allelhäufigkeiten in den verschiedenen Gruppen. Diese werden genutzt, um Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten des Genotyps der Testprobe zu ermitteln. Der Gruppe mit der höchsten Wahrscheinlichkeit wird die Probe dann zugeordnet (Paetkau et al. 1995, Rannala and Mountain 1997). Alternativ können genetische Abstände zwischen der Testprobe und allen Genotypen in den Gruppen der Referenzdaten ausgerechnet und die Testprobe dann der Gruppe zugeordnet werden, bei der die meisten Individuen mit kleinen genetischen Abständen vorkommen [Genetische Nachbarschaft, (Degen et al. 2017)].

Ein übliches Verfahren, um die Eignung von genetischen Referenzdaten für die Zuordnung zu überprüfen, ist die sogenannte Selbstzuordnung (self-assignment): Hierbei wird der Reihe nach jedes Individuum aus dem Datensatz herausgenommen und dann die wahrscheinlichste Gruppe der Zuordnung nach den oben beschriebenen Verfahren ermittelt. Die Häufigkeit der richtig zugeordneten Individuen in jeder Gruppe gilt dann als Maß für die Eignung der Daten für die Zuordnung [leave one out method, (Efron 1983)]. Die Berechnungen führten wir einmal länderweise mit dem bayesischen Ansatz (Rannala and Mountain 1997) und einmal mit genetisch definierten Regionen (siehe oben) und der Methode der genetischen Nachbarschaft (Degen et al. 2017) durch.

Die Tabellen 9, 10, 11 und 12 geben die Ergebnisse der Selbstzuordnung für die untersuchten Baumarten in Afrika und Südamerika wieder.

Einige wenige Baumarten zeigten in allen Ländern sehr hohe Selbstzuordnungsraten mit Werten von über 80% : so z.B. *Aucoumea klaineana*, *Cylicodiscus gabunensis* und *Dipteryx odorata*. Bei den meisten Baumarten waren die Erfolgsraten für einzelne Länder gut und für andere wiederum schlecht (z.B. *Entandrophragma utile* mit Werten von 92% in Ghana und Kamerun aber mit 0% in Gabun und nur 65% an der Elfenbeinküste). Und schließlich beobachteten wir eine dritte Gruppe von Baumarten für die in allen Ländern schlechte Ergebnisse der Selbstzuordnung erzielt wurden (etwa *Khaya senegalensis* und *Nauclea diderrichii*). In den meisten Fällen gab es höhere Erfolgsraten bei einer Einteilung der Individuen in geographisch-genetisch definierte Regionen.

	<i>Aucoumea klaineana</i>	<i>Cylicodiscus gabunensis</i>	<i>Entandrophragma utile</i>	<i>Lophira alata</i>	<i>Nauclea diderrichii</i>
Liberia, Guinea				85	78
Elfenbeinküste			65	79	33
Ghana		99	92	80	13
Nigeria				60	67
Kamerun		89	92	61	55
Gabun	99	82	0	34	55
Kongo	99	89	85	61	66
DR Kongo			73	80	48
Mittelwert Land	99	85	68	68	52
Mittel Region	84	86	86	75	86

Tabelle 9: Anteil (%) erfolgreicher Selbstzuordnungen (self-assignment) von untersuchten Baumarten in Afrika

	<i>Khaya anthotheca</i>	<i>Khaya ivorensis</i>	<i>Khaya grandifoliola</i>	<i>Khaya senegalensis</i>
Senegal				0
Elfenbeinküste	13	43		
Ghana	94	78	55	35
Burkina Faso				18
Benin			40	19
Togo			66	40
Nigeria		83		
Kamerun	99	62	89	47
Gabun		50		
Kongo	32	86		
DR Kongo	92			
Uganda	83			
Madagaskar				0
Mittel Land	69	67	62	23

Tabelle 10: Anteil (%) erfolgreicher Selbstzuordnungen (self-assignment) von untersuchten Khaya-Baumarten in Afrika

	<i>Carapa sp.</i>	<i>Cedrela odorata/ fissilis</i>	<i>Dipteryx alata</i>	<i>Dipteryx odorata</i>	<i>Dipteryx ferrea</i>	<i>Dipteryx micrantha</i>	<i>Dipteryx punctata</i>
Kuba		82					
Mexiko		88					
Honduras		11					
Costa Rica		96					
Ecuador		50					
Franz. Guayana	99			97			50
Brasilien	72	21/48		94	47		91
Peru	81	66/38			71	100	
Bolivien		79/86	100		36		
Mittel Land	88	61/55	100	96	51	100	70
Mittel Region (Gattung)	99	70			84		

Tabelle 11: Anteil (%) erfolgreicher Selbstzuordnungen (self-assignment) von untersuchten Baumarten in Lateinamerika

	<i>Handroanthus sp.</i>	<i>Hymenaea sp.</i>	<i>Jacaranda copaia</i>	<i>Simarouba amara</i>	<i>Swietenia macrophylla</i>
Mexiko		100			51
Belize					82
Guatemala					79
Honduras		91			75
Nicaragua					97
Costa Rica					28
Panama					87
Guayana		38			
Franz. Guayana	39	92	74	100	
Brasilien	79	77	80	53	79
Peru	69	56	76	99	91
Bolivien		52	100		85
Mittel Land	62	72	82	91	84
Mittel Region (Gattung)	94	85	82	91	61

Tabelle 12: Anteil (%) erfolgreicher Selbstzuordnungen (self-assignment) von untersuchten Baumarten in Lateinamerika

Es fiel auf, dass für alle Baumarten in Afrika deutliche genetische Unterschiede zwischen West- und Zentralafrika bestanden. Diese Unterschiede führten dann zu einer fast vollständig erfolgreichen Selbstzuordnung. Ebenso ließ sich für mehrere Baumarten Material aus Kamerun in der Selbstzuordnung sehr sicher identifizieren. Ähnlich war die Situation in Südamerika, hier konnte zumeist sehr erfolgreich innerhalb einer Art zwischen Nordost-Brasilien, Nord-Peru und Bolivien unterschieden werden (siehe z.B. Gruppe 2.2.1 und 2.2.2 bei *Jacaranda copaia* in Abbildung 17a). Ferner gab es Regionen, in denen die genetische Zusammensetzung grenzübergreifend sehr homogen war. Dies traf etwa für fast alle Baumarten für Ghana und die benachbarte Elfenbeinküste zu.

Für die Nutzung der genetischen Referenzdaten in der Praxis zur Holzherkunftskontrolle bedeutet die geographisch heterogene Erfolgsrate der Zuordnungstests, dass es immer sinnvoll ist, möglichst genaue Angaben zur geographischen Herkunft auch innerhalb eines Landes zu haben. Je nach deklarerter Holzherkunft, kann dann schon vor dem eigentlichen Test eingeschätzt werden, ob die Referenzdaten ausreichen.

2.1.4 Genetische Unterschiede zwischen Arten derselben Gattung

Die neu entwickelten Genmarker konnten auch erfolgreich genutzt werden, um verschiedene Arten in den Gattungen *Khaya* (Afrika) und *Carapa*, *Cedrela* und *Dipteryx* (Südamerika) zu unterscheiden. Bei der Gattung *Dipteryx* hatte unsere erste Auswertung der genetischen Daten Fragen zum taxonomischen Status der beprobten Individuen aufgeworfen. So war zum Beispiel eine Probe aus Französisch Guayana als *Dipteryx odorata* angegeben. Sie unterschied sich jedoch genetisch erheblich von einer anderen *Dipteryx odorata* Probe derselben Fläche. Die botanischen Experten des Projektpartners in Peru konnten schließlich diese fragliche Probe als *Dipteryx punctata* identifizieren. Ferner zeigte sich bei einer erneuten Auswertung der Daten unter Berücksichtigung dieser beiden Arten, dass auch ein Teil der als *Dipteryx odorata* gesammelten Proben in Brasilien in Wirklichkeit *Dipteryx punctata* war (Abbildung 14a). In Peru ließen sich die *Dipteryx*-Proben wiederum zwei weiteren Arten: *Dipteryx micrantha* und *Dipteryx ferrea* zuordnen. Einige unserer SNPs für *Dipteryx* eignen sich besonders gut zur Artdifferenzierung. Dazu konnten wir eine Publikation erstellen (Garcia-Davila et al. 2020) und ein vereinfachtes Laborverfahren zur Artidentifizierung (SNaPSHOT Genotypisierung) entwickeln. Diese Methode wird nun im Regionallabor in Peru erfolgreich zur Artunterscheidung eingesetzt.

Ebenso konnte in Zusammenarbeit mit unseren afrikanischen Partnern ein Satz von SNPs entwickelt werden, der die vier verschiedenen *Khaya*-Arten (*K. anthotheca*, *K. ivorensis*, *K. senegalensis* und *K. gradifoliola*) trennt (Pakull et al. 2019). Gemeinsam mit dem Projektpartner INRA in Französisch Guayana konnten wir auch SNPs zur Differenzierung der beiden Arten *Carapa surinamensis* und *Carapa guianensis* identifizieren. Erfolgreich gelangen auch die Artzuordnungen des Referenzmaterials innerhalb der Gattung *Entandrophragma*. So konnten wir bei 19% der als *Entandrophragma utile* eingesammelten Proben die Artzuordnung korrigieren. Tatsächlich waren die meisten dieser fraglichen Proben *Entandrophragma cylindricum* oder *Entandrophragma angolense*.

Trotz aller Bemühungen verblieben jedoch Schwierigkeiten bei der Trennung der Arten innerhalb der Gattungen *Cedrela*, *Handroanthus* und *Hymenaea*. Daher unternahmen wir in der Schlussphase des Projekts einen weiteren Anlauf zur Generierung von zusätzlichen DNA-Sequenzdaten an taxonomisch genauer untersuchtem Material (siehe Kapitel 2.1.9).

Für die Gattungen *Khaya*, *Dipteryx* und *Swietenia* selektierten wir jeweils bis zu 14 hoch informative SNPs zur Unterscheidung von Arten. Für diese SNPs entwickelten wir dann

Laborprotokolle für den SNaPShot-Ansatz. Mit diesem Ansatz konnten auch in Laboren mit einem DNA-Sequenzierer (ABI, Backman) die genetischen Analysen durchgeführt werden. Solche Geräte sind in den Laboren der FORIG in Kumasi und der IIAP in Iquitos vorhanden bzw. wurden im Rahmen des Projekts für das Labor der FORIG beschafft. Zudem beschafften wir für die beiden Labore die nötigen Chemikalien und schulten Techniker und Wissenschaftler in der Anwendung der SNaPShot-Methode.

2.1.5 Stabile Isotopenanalyse - LargeScale

Einleitung

Untersuchungen zur Zusammensetzung von stabilen Isotopen sind neben den genetischen Methoden eine hilfreiche Technik zur Herkunftskontrolle von Holz (Dormontt et al. 2015). Im Projekt wurden Untersuchungen zu stabilen Isotopen auf zwei räumlichen Skalen als ergänzende Pilotstudien zu den genetischen Erhebungen durchgeführt. Zum einen bauten wir auf Landesebene am Beispiel Brasilien für die beiden Baumarten *Carapa guianensis* und *Hymenaea courbaril* Referenzdaten auf (Isotopen – LargeScale) und zum anderen testeten wir den Einsatz stabiler Isotope auf kleinerer, regionaler Ebene für insgesamt drei Baumarten in Peru, Brasilien und Kamerun (Isotopen – SmallScale). Mit Hilfe dieser Pilotstudien sollten die Potentiale der stabilen Isotope bei der Holzherkunftskontrolle durch ein und dieselbe Projektgruppe wie die genetischen Untersuchungen erarbeitet werden.

Methoden

Bei der Stablen Isotopen Analyse (SIA) wird durch die Kombination der stabilen Isotopenverhältnisse von Wasserstoff ($^2\text{H}/^1\text{H}$ oder D/H), Sauerstoff ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$), Kohlenstoff ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), Stickstoff ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) und Schwefel ($^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) eine lokale Signatur ermittelt, die zur Herkunftsidifizierung herangezogen wird. Ein weiteres Isotopenverhältnis, welches in diesem Zusammenhang genutzt werden kann, ist das des Strontiums ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$), worauf in dieser Untersuchung nicht weiter eingegangen wird (Dormontt et al. 2015). Als Isotope bezeichnet man hierbei Atomkerne des gleichen Elements mit der gleichen Protonenanzahl, aber einer unterschiedlichen Anzahl von Neutronen und somit einem unterschiedlichen Gewicht. Es gibt stabile und instabile Isotope. Während instabile Isotope unter Abgabe radioaktiver Strahlung zerfallen (radioaktive Isotope), verändern sich stabile Isotope nicht. Das Verhältnis vom schweren zum leichteren stabilen Isotop ist regional unterschiedlich. Dieser Unterschied entsteht dadurch, dass bei verschiedenen chemischen, biologischen oder physikalischen Prozessen bevorzugt das leichtere Isotop umgesetzt wird.

Zur Analyse der stabilen Isotope Kohlenstoff, Stickstoff, Schwefel, Wasserstoff und Sauerstoff verwendet man die Isotopenhäufigkeitsmassenspektrometrie (IRMS, Isotope Ratio Mass Spectrometry). Bei diesem Verfahren werden Moleküle in einem Massenspektrometer so zu sagen „gewogen“. Isotopenverhältnisse werden per Definition als Delta-Werte (δ) in Promille (‰) angegeben. Exemplarisch für Sauerstoff ergibt sich für die Notation:

$$\delta^{18}\text{O} = \frac{\left(\frac{^{18}\text{O}}{^{16}\text{O}}\right)_{\text{Probe}} - \left(\frac{^{18}\text{O}}{^{16}\text{O}}\right)_{\text{Standard}}}{\left(\frac{^{18}\text{O}}{^{16}\text{O}}\right)_{\text{Standard}}} * 1000$$

Die Ergebnisse können somit entweder als $\delta = -25 \text{ ‰}$ oder als $\delta = 0,025$ notiert werden (Urey 1948, Hayes 2004). Das Verhältnis von schwerem zu leichtem Isotop wird hier relativ zu einem

internationalen Standard, auch Referenzmaterial genannt, gesetzt. Internationale Referenzmaterialien haben fest eingemessene Delta-Werte und dienen als Endpunkte der Delta – Skala. Als primäre Standards gelten z.B. PDB $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0$ und SMOW $^{18}\text{O}/^{16}\text{O} = 0$ und als sekundäre Standards, welche in Bezug zu den primären Standards stehen, die seit 2016 bei der USGS (United States Geological Services) erhältlichen Holzstandards USGS 54, USGS 55 und USGS 56 (Qi et al. 2016). Diese Standards werden in den Messserien mit gemessen.

Für Holz bzw. für organisches Material allgemein muss bei der Isotopenuntersuchung der austauschbare Wasserstoff berücksichtigt werden. Im Holz sind nicht alle Wasserstoffatome festgebunden, sondern ein Teil von Ihnen tauscht sich mit der Umgebungsluft aus bis ein Gleichgewichtszustand eintritt und die Isotopensignatur verändert sich jeweils mit der Signatur in der Umgebungsluft.

Probennahme

Für diese Untersuchung wurden Holzproben der verschiedenen Baumarten und Regionen mit einer Bohrmaschine in Brusthöhe von stehenden, lebenden Baumstämmen genommen. Hierbei wurde jeweils ungefähr 20 cm gerade zur Mitte des Stammes gebohrt. Die groben Holzspäne fingen wir auf. Bei einer Bohrtiefe von 20 cm ergab sich ein guter Querschnitt über mehrere Wachstumsphasen des Baumes. Hierdurch konnte die Variation der Isotopenzusammensetzung zwischen verschiedenen Jahren ausgeglichen werden (Förstel et al. 2011). Die Holzspäne wurden vorzugsweise in Baumwollsäckchen gelagert. Diese Baumwollsäckchen wurden zum Teil vorab getrocknet, dann mit Silikagel verpackt, um Feuchtigkeit aus den Proben zu ziehen und Schimmelbildung zu verhindern. Für jede Probe ermittelten wir die geographischen Koordinaten des Baumes.

Probenaufbereitung

Für die Vorpräparation im Labor wurden die Proben bei bis zu 70°C für ein bis mehrere Tage getrocknet und dann ein Teil der Holzspäne (ca. 2g) mit einer Kugelmühle zu feinem Holzmehl vermahlen. Kleine Mengen des Holzpulvers werden entweder in Zinnkapseln für die C-, N- und S-Analyse eingewogen oder in Silberkapseln für die H- und O-Analyse. Im Anschluss wurde die Probe im Elementaranalysator (N, C) oder in einem Hochtemperaturofen, auch Pyrolyseinheit genannt, (H, O) umgesetzt, vereinfacht gesagt „verbrannt“ und das entstehende Gas im Gaschromatographen in seine Bestandteile aufgetrennt.

Auswertung

Die statistische Auswertung der Probendaten (Tests auf Unterschiede bei Mittelwerten, Korrelationen, Hauptkomponentenanalysen) erfolgte mit dem Programm PAST - PAleontological STatistics Version 4. (Hammer et al. 2001). Karten zur räumlichen Verteilung der Isotopenverhältnisse erstellten wir mit ArcMap 10.6. Wie bei den genetischen Daten führten wir mit dem Programm GeoAssign (Degen et al. 2017) eine Selbstzuordnung (Self-assignment test) durch, um die Genauigkeit der Referenzdaten für die Kontrolle der räumlichen Herkunft zu ermitteln.

Ergebnisse

Die Isotopenanalyse auf der Landesebene Brasilien führte das Labor für Stabile Isotope (LSI) des Helmholtz - Zentrums für Umweltforschung in Leipzig als Unterauftrag durch. Dieser Unterauftrag war notwendig, da am Thünen-Institut verschiedene technische Probleme am Massenspektrometer sowie in der Gasanlage immer wieder zu Verzögerungen geführt hatten und es absehbar wurde, dass die Menge der aufgelaufenen Proben zeitlich bis zum Projektende nicht mehr messbar war. Die Vorbereitung der Holzproben fand im Labor des Thünen-Instituts für Forstgenetik in Großhansdorf statt. Aus den gemahlenen Proben wurde eine Unterstichprobe

ausgewählt, die Proben jeder geographischen Region enthielt. Daraus ergab sich die in Tabelle 13 dargestellte Übersichtsliste.

Art	Land	Gesammelte Proben	Proben mit C, H, N & O Werten
<i>Carapa guianensis</i>	Brasilien	210	150
<i>Hymenaea courbaril</i>	Brasilien	241	150
Gesamt		451	300

Tabelle 13: Übersicht zu beprobten und analysierten Proben für die Landesstudie Brasilien

Im Fokus des LSI steht die stabile Isotopenanalyse organischer Verbindungen mit Routineuntersuchungen für die stabilen Isotope 2H , ^{13}C und ^{15}N . Dort waren deshalb Geräte und Methoden für die Isotope C, H, N und O vorhanden. Die Methoden mussten nur noch für tropisches Holz entsprechend angepasst werden.

Um den austauschbaren Wasserstoff im Holz, wie oben erwähnt zu berücksichtigen, wurde eine vergleichende Equilibrierung nach dem Ansatz von Wassenaar and Hobson (2003) durchgeführt. Während des Equilibrierens tauschen sich die Referenzmaterialien USGS 54, USGS 55 und USGS 56 sowie die Holzproben über mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur mit der gleichen Laborluft aus und werden im Anschluss daran in der gleichen Messfolge analysiert. Durch diese vergleichende Methode kann der Anteil des austauschbaren Wasserstoffes in der Ergebnisrechnung berücksichtigt werden. Nachdem die Proben im LSI eingewogen und equilibriert wurden, erfolgte die Isotopenanalyse für C und N an einem MAT253 IRMS (Thermo Fischer Scientific, Deutschland) gekoppelt mit einem Euro EA3000 Elementaranalysator (EuroVector, Italy) mit den Referenzmaterialien USGS 40, USGS 41, CH7 + N-, USGS 54, USGS 55 und USGS 56. Für die H- und O – Isotopenanalyse wurde das MAT253 mit einem HTO Pyrolyse System der Firma HEKAtech (Deutschland) gekoppelt und zusätzlich zu den Referenzmaterialien USGS 54, USGS 55 und USGS 56, wurden die Referenzen UC 04, GISP, VSMOW2 gemessen.

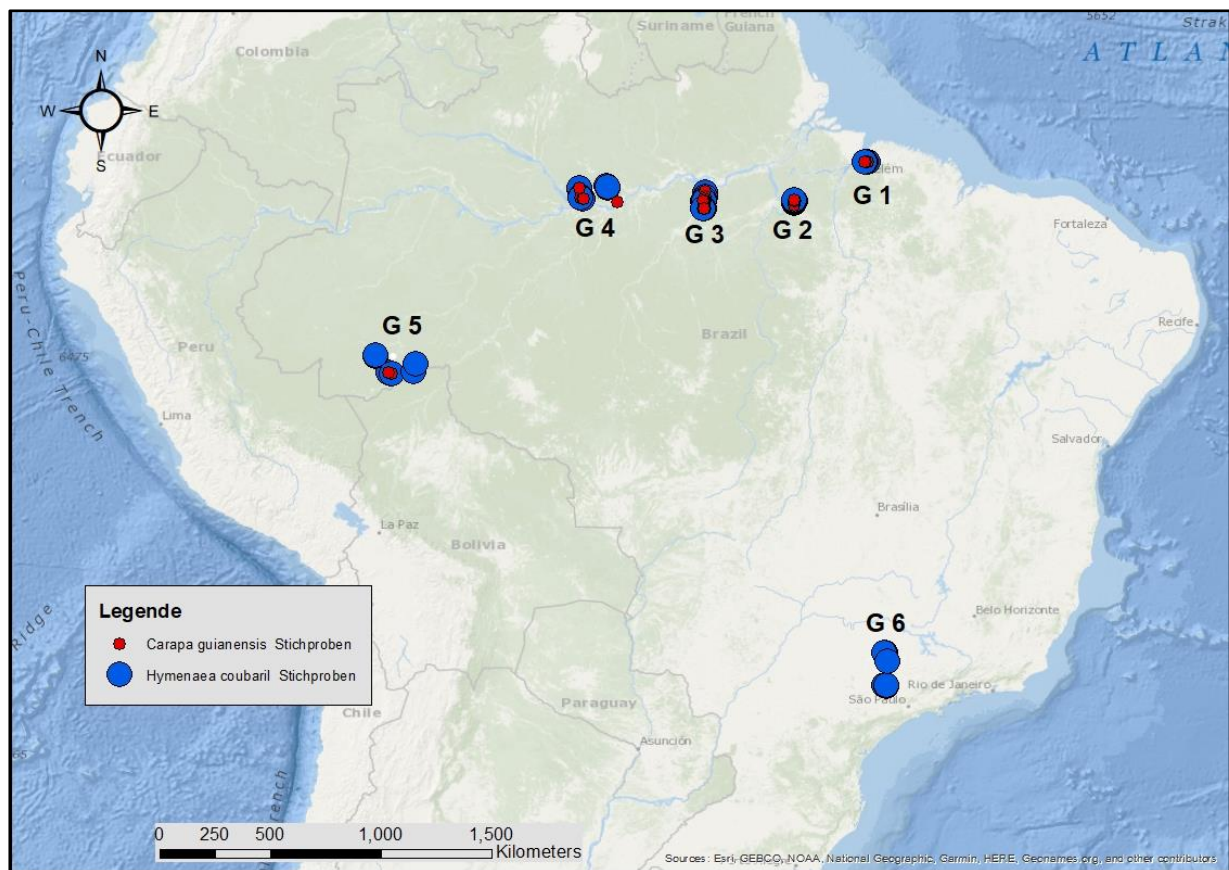


Abbildung 20: Einteilung der Stichprobenpunkte von *Carapa guianensis* rot und *Hymenaea courbaril* blau in geographische Gruppen G1 bis G6

Carapa guianensis

Die Stichprobenpunkte der Baumarten *Carapa guianensis* und *Hymenaea courbaril* wurden zu fünf bzw. für *H. courbaril* zu sechs geographischen Gruppen zusammengefasst (Abbildung 20). Die Probenahme in Brasilien erstreckte sich auf der Ost-West-Achse über eine Distanz von etwa 2300 km. Die sechste Region um São Paulo lag etwa 3000 km südlich, zu den anderen Regionen. Zwischen den Gruppen 1 bis 4 lagen jeweils zwischen 400 und 600 km. In den Gebieten 1 bis 5 kamen beide Baumarten mit unterschiedlichen Probenanzahlen vor.

Carapa guianensis

In den Abbildungen 22-25 wird die Verteilung der Isotopenverhältnisse der Baumart *Carapa guianensis* in Brasilien für $d^{13}\text{C}$, $d^2\text{H}$, $d^{15}\text{N}$ und $d^{18}\text{O}$ in ‰ dargestellt. Die einzelnen Isotopenverhältnisse in den Gruppen wiesen zum Teil signifikante Unterschiede in ihren Mittelwerten auf. Besonders deutlich zeigte sich dies in den hoch signifikanten Ergebnissen des Welch-Tests für $d^{18}\text{O}$ im Vergleich von Gruppe 1 mit den anderen vier Gruppen. Weiterhin zeigte $d^{18}\text{O}$ eine schwache, aber signifikante Korrelation zur geographischen Breite ($r = 0,4$; $p = 0,00$) und zur geographischen Länge ($r = 0,3$, $p = 0,00$) auf. Für $d^2\text{H}$ und $d^{15}\text{N}$ konnte ebenfalls ein schwacher Zusammenhang mit der geographischen Breite nachgewiesen werden ($d^2\text{H}$: $r = 0,4$, $p = 0,01$; $d^{15}\text{N}$: $r = -0,4$, $p = 0,00$).

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
Anzahl	23	15	58	39	15
MW d ¹³ C	-29,78	-28,70	-29,09	-29,22	-29,18
SD d ¹³ C	1,61	0,80	1,27	0,51	0,78
MW d ¹⁵ N	2,06	3,38	4,36	2,67	3,49
SD d ¹⁵ N	2,01	1,37	1,20	1,53	1,05
MW d ² H	-57,39	-60,82	-58,44	-55,60	-67,23
SD d ² H	6,09	6,27	5,94	6,28	6,37
MW d ¹⁸ O	24,10	22,11	22,33	22,90	21,72
SD d ¹⁸ O	0,86	0,75	0,84	0,82	1,38

Tabelle 14: Zusammenfassende Statistik der geographischen Gruppen von *Carapa guianensis* (MW Mittelwert (‰), SD Standardabweichung (‰))

Die Unterschiede der geographischen Gruppen untereinander reichten nicht aus, um die Gruppen in einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) der vier Isotopenverhältnisse sichtbar voneinander zu trennen. Abbildung 21 veranschaulicht, dass 90,31 % der Variabilität durch die erste Hauptkomponente dargestellt wurden und 5,86 % durch die zweite Hauptkomponente.

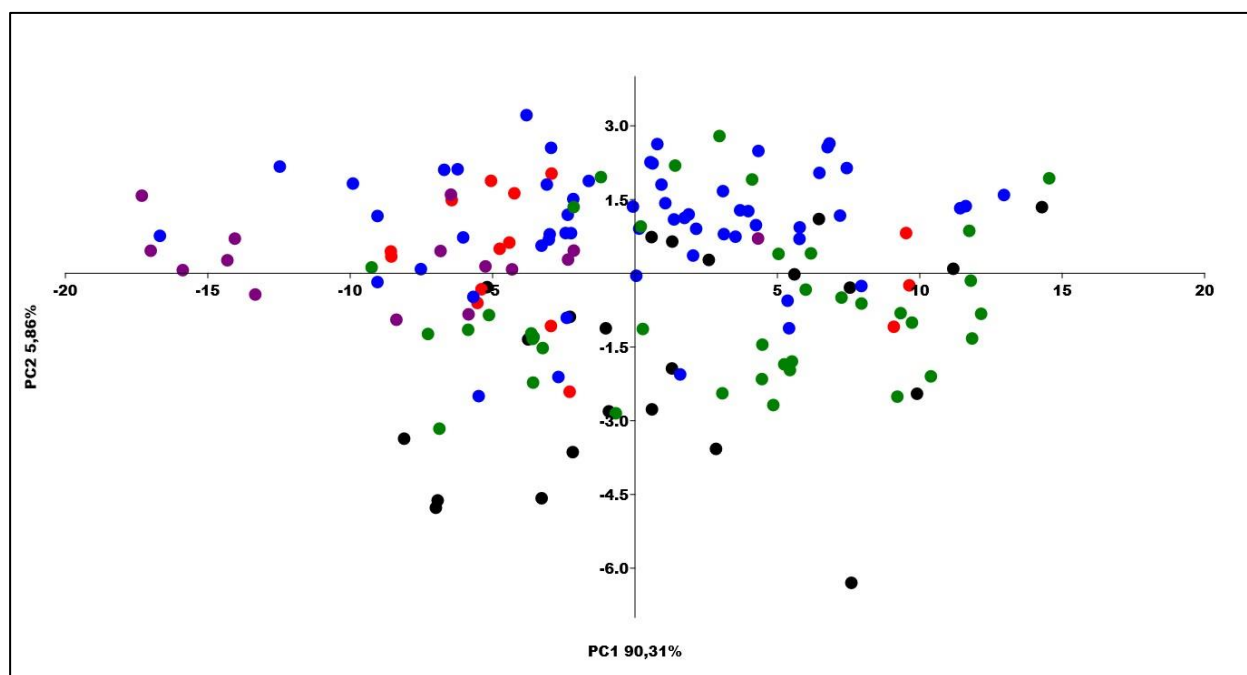


Abbildung 21. Hauptkomponentenanalyse der geographischen Gruppen von *Carapa guianensis* anhand der Isotopenverhältnisse; G1 schwarz, G2 rot, G3 blau, G4 grün und G5 violett

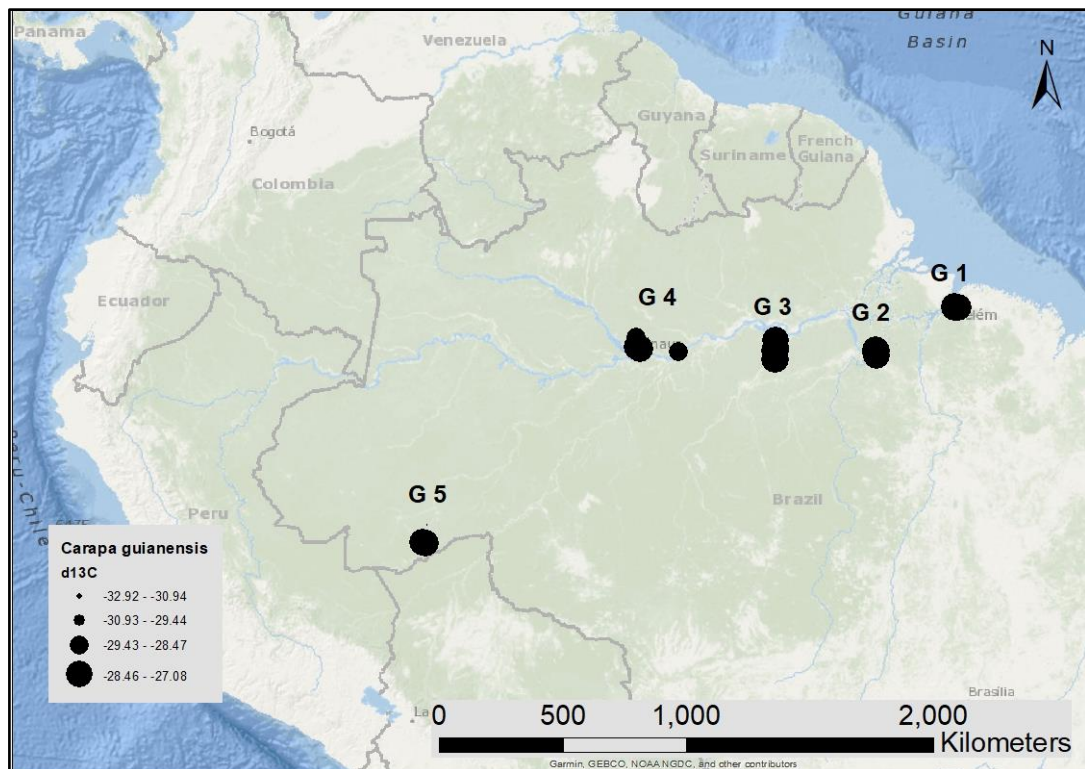


Abbildung 22: Verteilung der Isotopenverhältnisse der Baumart *Carapa guianensis* in Brasilien für $d^{13}C$ in ‰

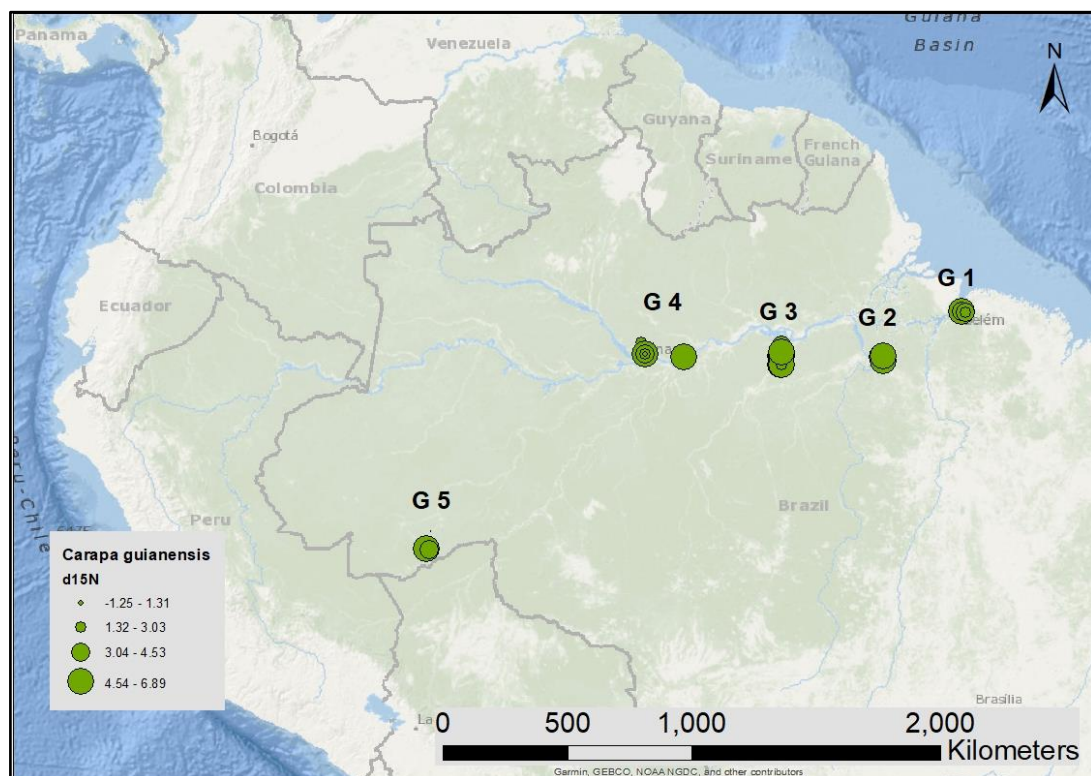


Abbildung 23: Verteilung der Isotopenverhältnisse der Baumart *Carapa guianensis* in Brasilien für $d^{15}N$ in ‰

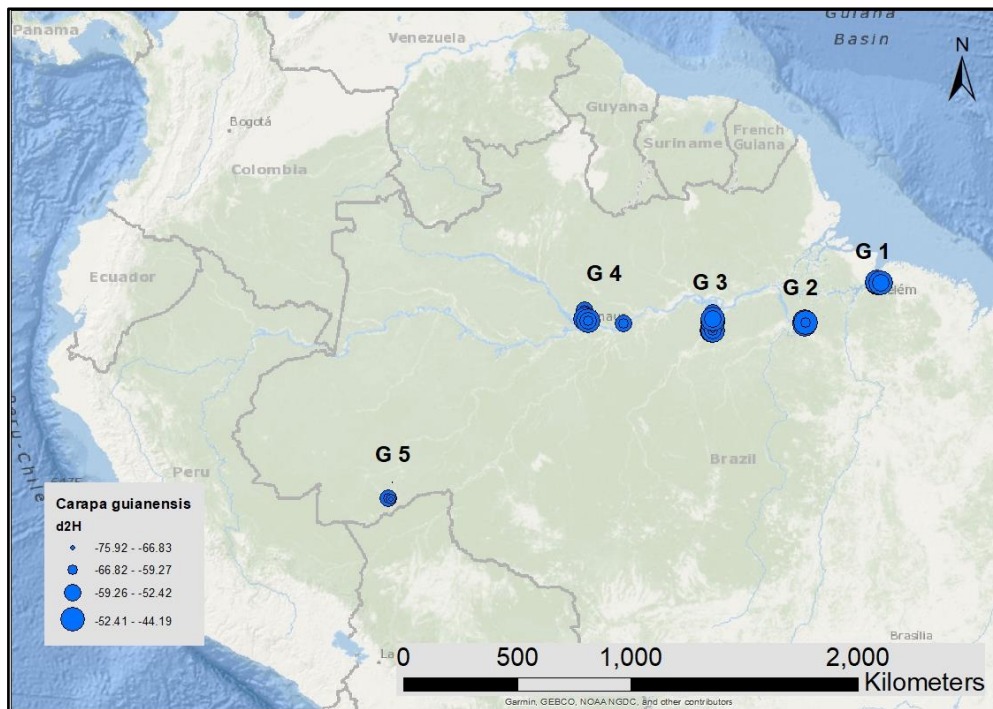


Abbildung 24: Verteilung der Isotopenverhältnisse der Baumart *Carapa guianensis* in Brasilien für d²H in ‰

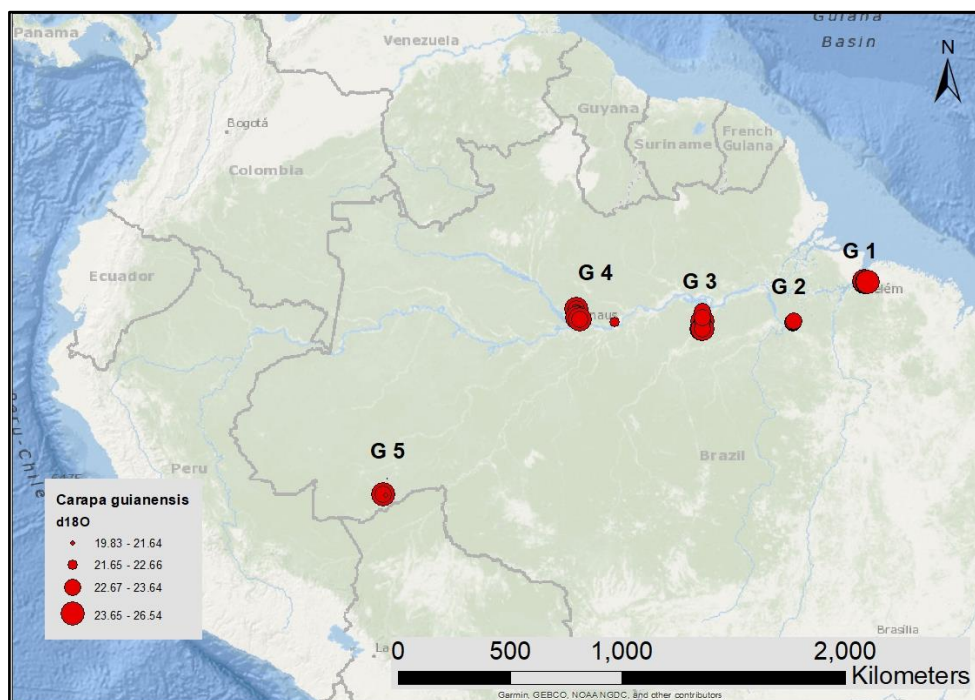


Abbildung 25: Verteilung der Isotopenverhältnisse der Baumart *Carapa guianensis* in Brasilien für d¹⁸O in ‰

Bei der Selbstzuordnung der Proben in die geographischen Gruppen konnte für *Carapa guianensis* eine Gesamterfolgsquote von 58% berechnet werden. Außer in Gruppe 2 hatten alle Gruppen einen Zuordnungserfolg von über 50% (Tabelle 15). In Gruppe 4 konnten 77% erfolgreich zugeordnet werden.

Geographische Gruppen	Anzahl Referenzproben	Erfolgsquote Zuordnung (%)
Region 1	23	52
Region 2	15	13
Region 3	58	64
Region 4	39	77
Region 5	15	53
Gesamt	150	59

Tabelle 15: Selbstzuordnung *Carapa guianensis*

Hymenaea courbaril

Die sechs Probengebiete der Baumart *Hymenaea courbaril* in Brasilien mit der Verteilung der Isotopenverhältnisse von $d^{13}C$, d^2H , $d^{15}N$ und $d^{18}O$ in ‰ werden in den Abbildungen 26-29 illustriert. Tabelle 16 zeigt eine Übersicht der Mittelwerte und Standardabweichung je Isotop und Region. Mit Hilfe von Welch und Mann - Whitney - Tests konnte ermittelt werden, dass die geographischen Gruppen sich in ihren Varianzen, Mittelwerten und Medianen unterschieden. Für Gruppe 1 war diese Variabilität nicht signifikant für den Vergleich der $d^{13}C$ Wert, aber für die drei weiteren Isotopenverhältnisse war dies der Fall. Für die $d^{18}O$ – Verhältnisse zeichnete sich in allen Gruppenvergleichen eine signifikant unterschiedliche Tendenz ab, ausgenommen zwischen den Gruppen 2 und 4, 2 und 6 sowie 6 und 4.

	Region 1	Region 2	Region 3	Region 4	Region 5	Region 6
Anzahl	12	12	34	38	30	24
MW $d^{13}C$	-28,13	-28,16	-28,70	-28,82	-29,19	-27,95
SD $d^{13}C$	1,39	0,73	0,73	1,09	0,89	0,69
MW $d^{15}N$	1,51	5,20	5,08	2,90	4,27	3,95
SD $d^{15}N$	0,61	1,01	1,06	1,14	2,87	2,29
MW d^2H	-54,38	-73,64	-79,18	-73,98	-78,25	-72,94
SD d^2H	8,97	8,19	5,84	8,10	11,91	8,11
MW $d^{18}O$	24,08	22,28	21,03	21,58	20,13	22,23
SD $d^{18}O$	1,19	0,99	1,13	0,84	0,77	1,79

Tabelle 16: Zusammenfassende Statistik für die geographischen Gruppen von *Hymenaea courbaril* (MW Mittelwert (‰), SD Standardabweichung (‰))

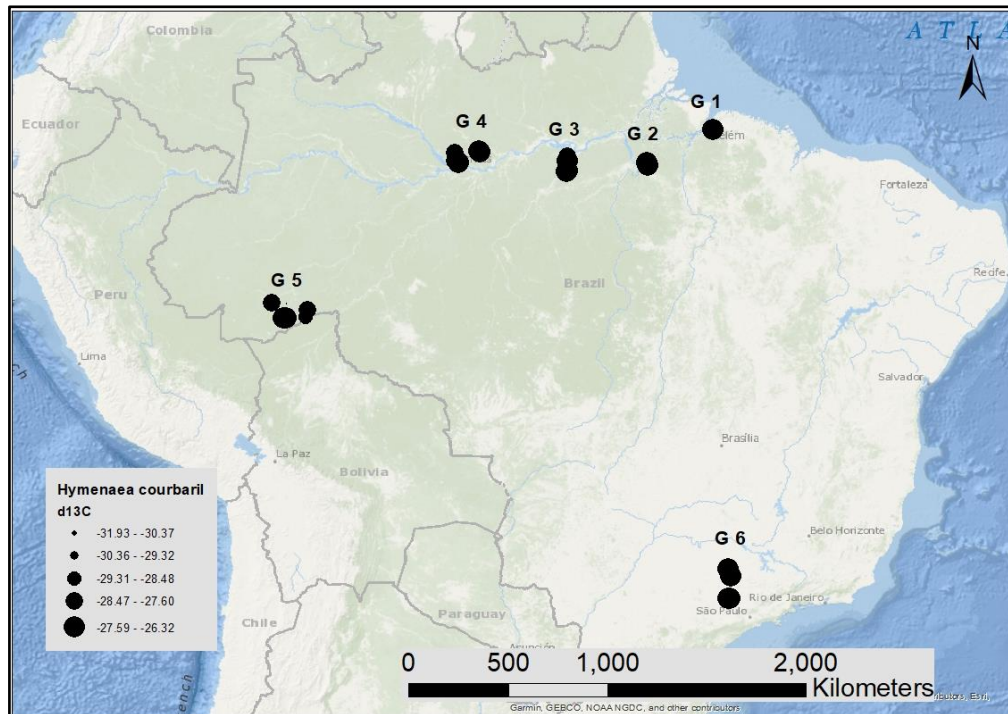


Abbildung 26: Verteilung der Isotopenverhältnisse der Baumart *Hymenaea courbaril* in Brasilien für d¹³C in ‰

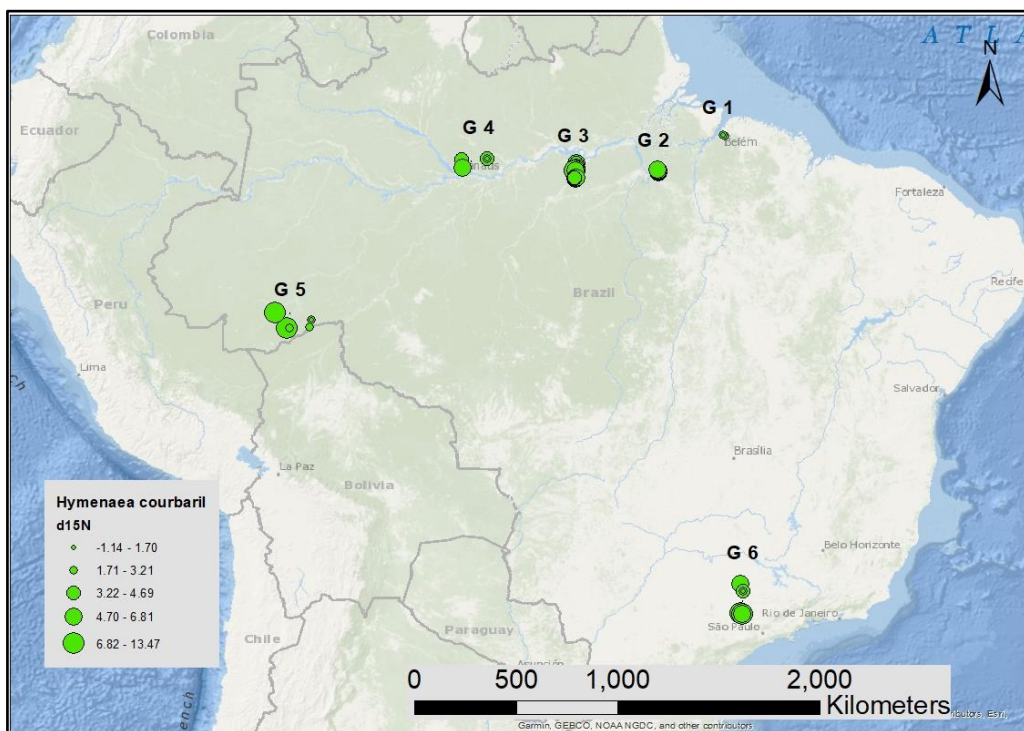


Abbildung 27: Verteilung der Isotopenverhältnisse der Baumart *Hymenaea courbaril* in Brasilien für d¹⁵N in ‰

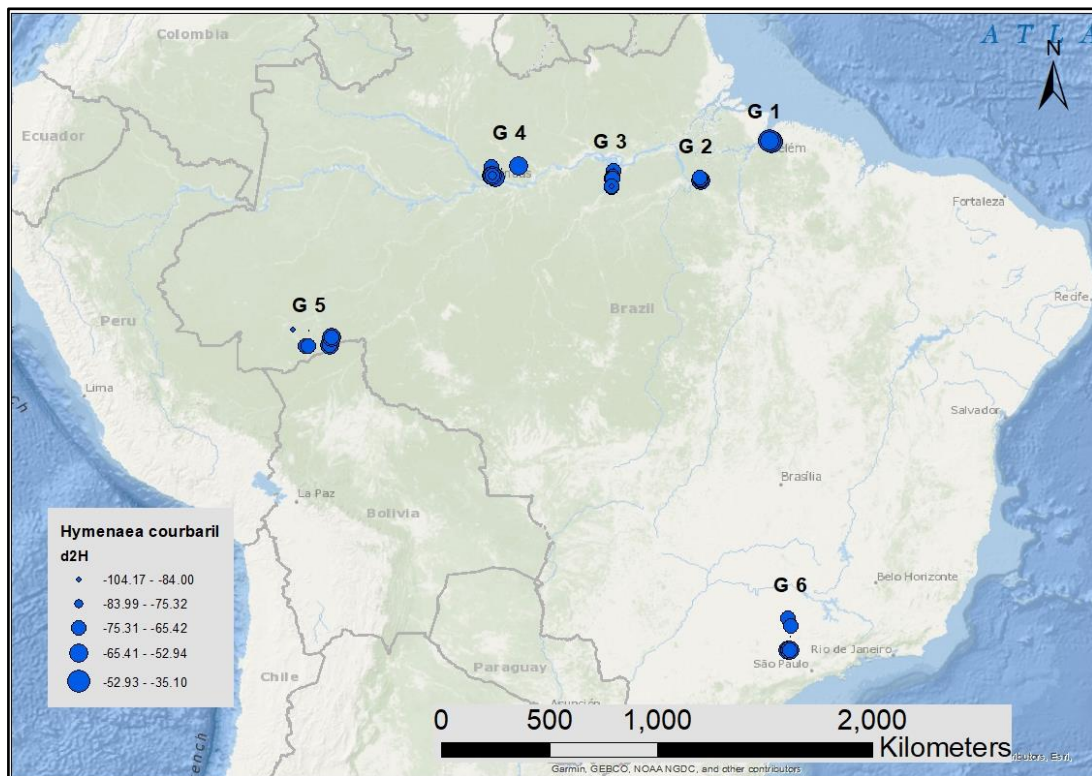


Abbildung 28: Verteilung der Isotopenverhältnisse der Baumart *Hymenaea courbaril* in Brasilien für d^2H in ‰

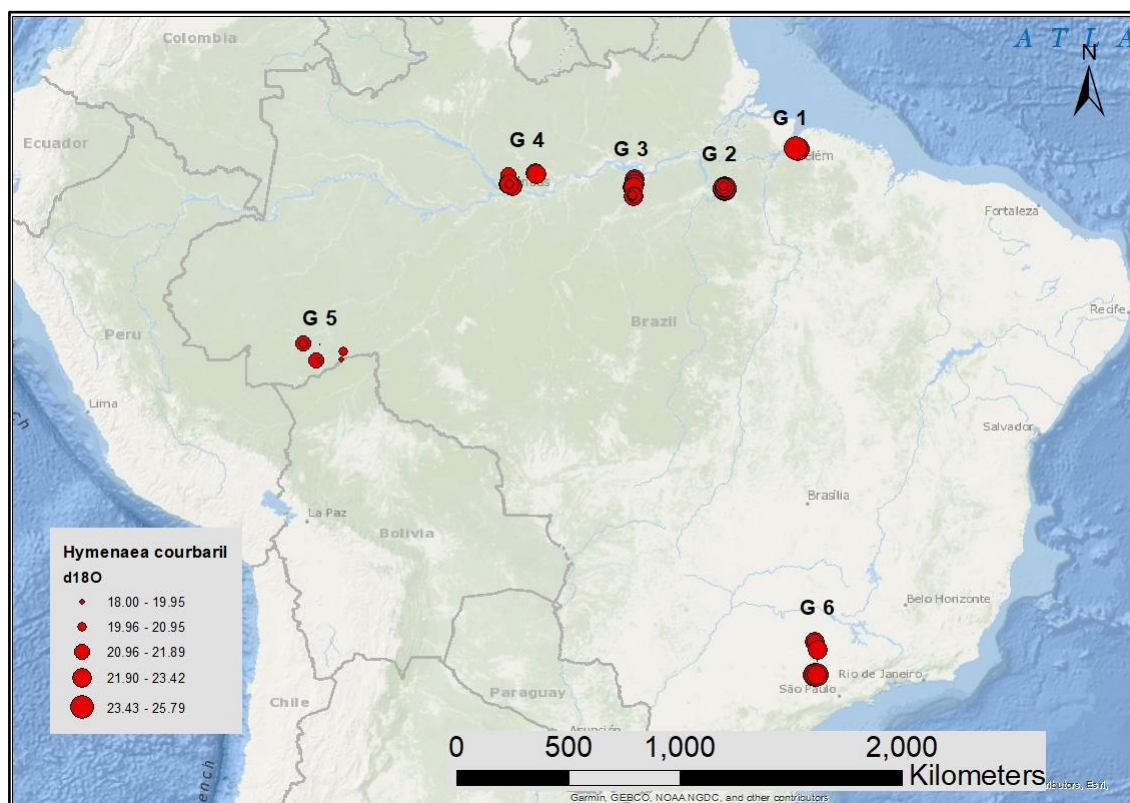


Abbildung 29: Verteilung der Isotopenverhältnisse der Baumart *Hymenaea courbaril* in Brasilien für $d^{18}O$ in ‰

Im Gegensatz zu den Isotopenverhältnissen von *Carapa guianensis* zeigten sich für *Hymenaea courbaril* in der Korrelationsanalyse nach Spearman (r_s) signifikante Zusammenhänge zwischen der geographischen Länge und $d^{13}C$ ($r_s = 0,46$, $p = 0,000$), d^2H ($r_s = 0,25$, $p = 0,002$) sowie $d^{18}O$ ($r_s = 0,52$, $p = 0,000$). Ferner bestand ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen $d^{18}O$ und der geographischen Breite ($r_s = 0,3$, $p = 0,000$). Zwischen $d^{15}N$ und d^2H berechneten wir eine negative Korrelation ($r_s = -0,4$, $p = 0,01$) und eine positive Korrelation zwischen $d^{18}O$ und d^2H ($r_s = 0,302$, $p = 0,000$).

Die Zusammenhänge der Isotopenverhältnisse spiegeln sich allerdings nur mit schwachen Tendenzen in der Graphik der Hauptkomponentenanalyse wider (Abbildung 30). In der Abbildung gab es wie bei *Carapa guianensis* keine deutlich sichtbare Trennung der Gruppen.

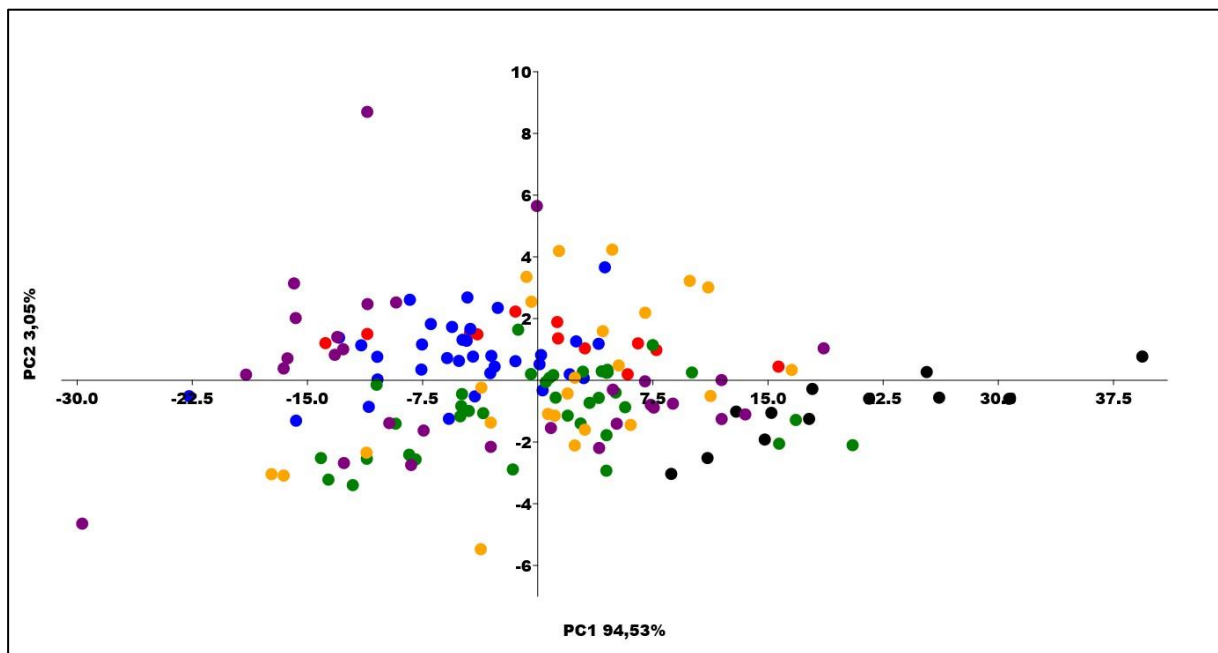


Abbildung 30: Hauptkomponentenanalyse der geographischen Gruppen von *Hymenaea courbaril* anhand der Isotopenverhältnisse; G1 schwarz, G2 rot, G3 blau, G4 grün, G5 violett und G6 orange

Beim Test der Selbstzuordnung von *Hymenaea courbaril* ergab sich insgesamt eine Erfolgsquote von 54 % (Tabelle 17). Auch bei dieser Baumart hatte die geographische Gruppe 2 die geringste Erfolgsquote mit nur 17 %. Die nächstniedrige Quote von 25% wies die nur für *Hymenaea* beprobte Gruppe 6 auf. Die Gruppe 1 hatte einen Zuordnungserfolg von 75% und die drei weiteren Gruppen lagen zwischen 55 % und 66 %.

Geographische Gruppen	Anzahl Referenzproben	Erfolgsquote Zuordnung (%)
Gruppe 1	12	75
Gruppe 2	12	17
Gruppe 3	34	65
Gruppe 4	38	66
Gruppe 5	30	57
Gruppe 6	24	25
Gesamt	150	54

Tabelle 17: Selbstzuordnung *Hymenaea courbaril*

Ähnlichkeit der Isotopenverteilung zwischen den Baumarten

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse von einer Baumart auf eine andere wird als Vorteil der Isotopenanalyse zur Herkunftsbestimmung genannt (Förstel et al. 2011). In fünf der sechs beprobten Gebiete in Brasilien wurden beide Baumarten analysiert. Es zeigt sich eine Ähnlichkeit bei der Rangordnung der Mittelwerte insbesondere für die Isotope O und N (Abbildung 31).

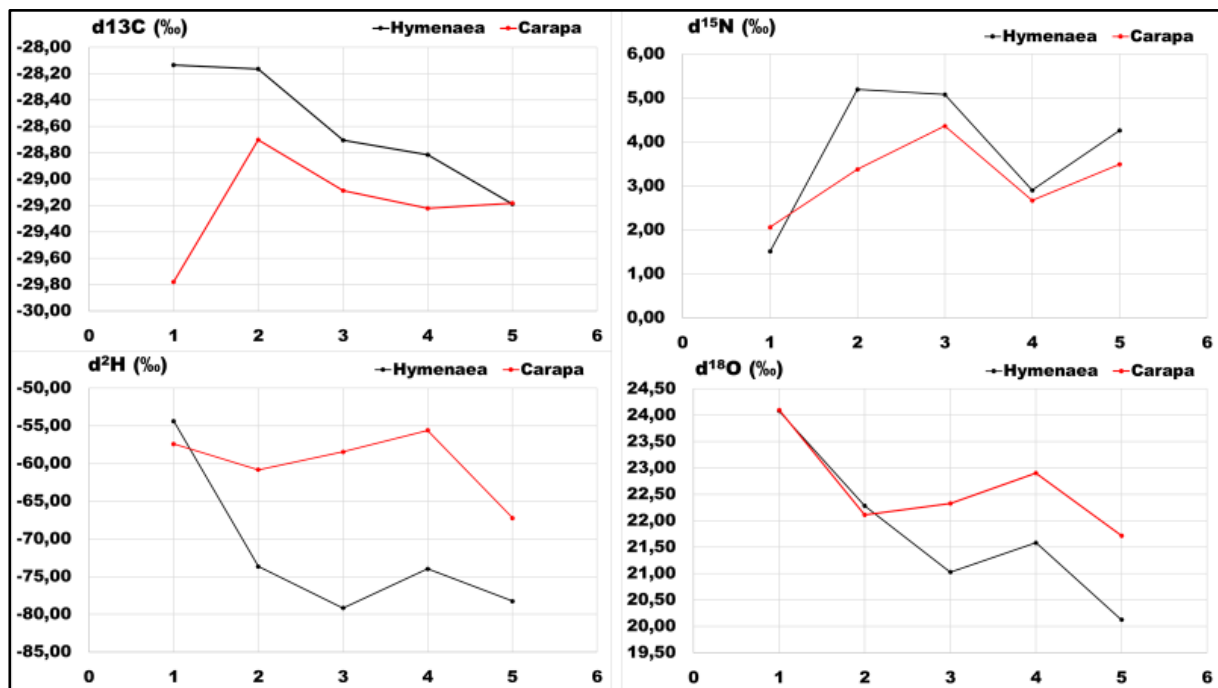


Abbildung 31: Vergleich der Mittelwerte der einzelnen Isotopenverhältnisse je Art über die fünf geographischen Gruppen, *Hymenaea courbaril* schwarz und *Carapa guianensis* rot

Eine Varianzanalyse mit den Faktoren „Baumart“ und „geographischer Gruppe“ ergab für die einzelnen Isotope ein sehr unterschiedliches Bild:

- Bei d¹³C war der Anteil der nicht erklärten Varianz mit 88% sehr hoch. Baumart, geographische Gruppe und deren Interaktion waren zwar statistisch signifikant, jedoch erklärten diese Komponenten jeweils nur 3-4% der Gesamtvarianz.

- Bei $d^{15}N$ lag die nicht erklärte Varianz mit 67% niedriger. Hier erklärte die geographische Gruppe 28% der Varianz und die Baumart und Interaktion spielten mit 2% bzw. 3% kaum eine Rolle. Alle Werte waren statistisch signifikant.
- Bei d^2H lag der Anteil nicht erklärter Varianz mit 37% deutlich niedriger. Hier hatte die Baumart mit 43% den größten Einfluss, gefolgt von der geographischen Gruppe (17%) und der Interaktion von beiden (12%). Auch hier waren alle Werte statistisch signifikant.
- Bei $d^{18}O$ gab es auch einen relativ niedrigen Anteil der nicht erklärten Varianz (40%). Hier erklärte die geographische Gruppe mit 43% den größten Anteil der Gesamtvarianz, gefolgt von der Baumart (20%) und der Interaktion (6%). Auch hier waren alle Werte statistisch signifikant.

Diskussion

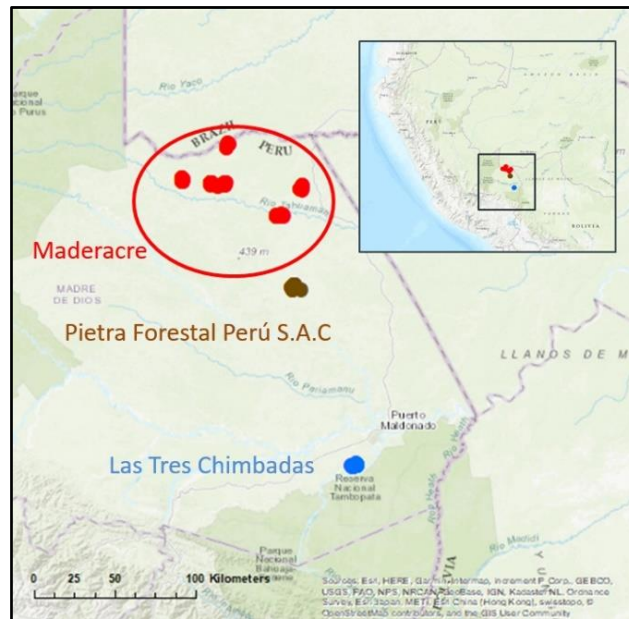
Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Isotopenverhältnisse Unterschiede in den geographischen Gruppen aufwiesen und schwache signifikante Zusammenhänge mit geographischer Breite und Länge bei beiden Arten, wie erwartet, über die Isotope des Wassers (H und O) festzustellen waren. Dass sich besonders die geographische Gruppe 1 in den Tendenzen der Isotopenverhältnisse von den anderen Gruppen absetzt, kann durch die relative Nähe zum Atlantik verursacht werden. Dass die ebenfalls vergleichsweise atlantiknahe sechste Gruppe sich nicht so deutlich von den anderen Proben unterschied, kann dadurch bedingt sein, dass der Nord-Süd Gradient im Isotopenverhältnis nicht so ausgeprägt ist wie der Ost-West-Gradient.

Aus den Ergebnissen der Varianzanalyse kann geschlossen werden, dass für eine geographische Zuordnung von Holz die Isotope O und N besonders geeignet sind. Beim Wasserstoff (H) spielte die Zugehörigkeit zur Baumart eine wichtigere Rolle als die geographische Herkunft. Wenn dieser Faktor berücksichtigt wird, dann ist H auch nützlich für die geographische Zuordnung. Die C-Isotope lieferten hingegen kaum Informationen für die räumliche Zuordnung.

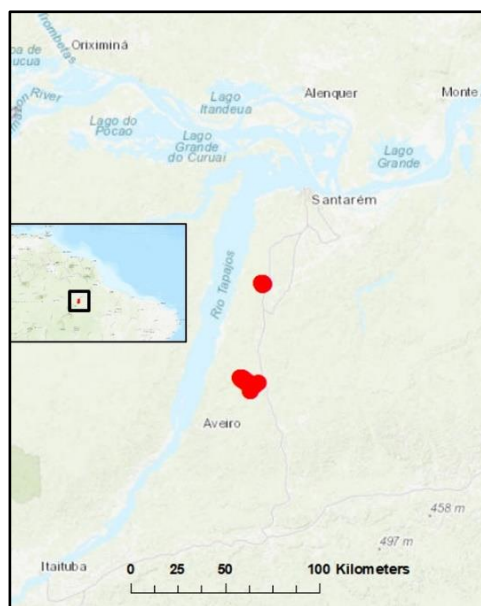
2.1.6 Small Scale – Genetik

In Kamerun wurden für die Baumart *Lophira alata*, in Peru für *Dipterix ferrea* und in Brasilien für *Hymenaea* sp. Kambium/Blatt- und Holzproben im Bereich einzelner Forstkonzessionen eingesammelt. Ziel war zu testen, ob der Herkunftsnachweis auch auf kleiner räumlicher Ebene mit DNA-Analysen und stabilen Isotopen (siehe Kapitel 2.1.7) möglich ist. Für jede Zielbaumart sollten Proben aus einer Zielkonzession und bis zu zwei anderen Forstkonzessionen gewonnen werden. Eine dieser beiden Forstkonzessionen sollte jeweils in einer Entfernung von weniger als 100 km und eine in einer Entfernung von über 100 km von der Zielkonzession beprobt werden. Das geplante Design konnte in Kamerun und Peru realisiert werden, in Brasilien konnten jedoch wegen Zugangsbeschränkungen in Indianerreservaten nur im nördlichen und südlichen Bereich einer großen Forstkonzession Proben gewonnen werden (Abbildung 32). Die Blindproben wurden mit einer Herkunftsdeklaration geliefert und von einer sonst nicht am Projekt beteiligten Mitarbeiterin anonymisiert. Die SNPs von Referenz- und Blindproben wurde mit der MassARRAY-Methode bestimmt. Für jede Konzession führten wir Selbst-Zuordnungen mit der Methode von Rannala and Mountain (1997) durch.

a) *Dipteryx ferrea* (Peru)



b) *Hymenaea* sp. (Brasilien)



c) *Lophira alata* (Kamerun)

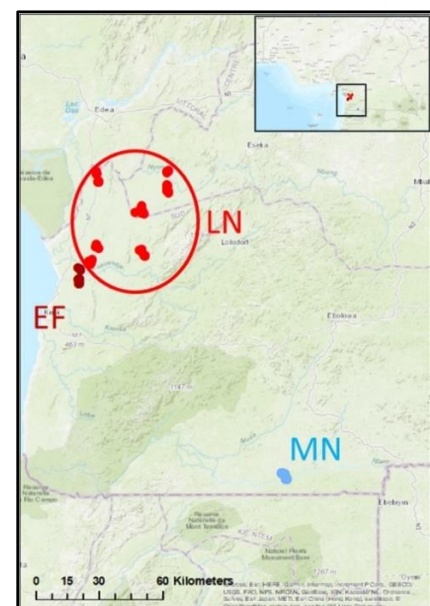


Abbildung 32: Räumliche Verteilung der Proben der SmallScale-Studie in den Forstkonzessionen für a) *Dipteryx ferrea* in Peru, b) *Hymenaea* sp. in Brasilien und c) *Lophira alata* in Kamerun

Dipteryx ferrea (Peru)

Für *Dipteryx ferrea* zeigten die Ergebnisse der DNA-Analyse eine sehr zuverlässige Zuordnung der Proben aus der Konzession Las Tres Chimbadass (Tabelle 18). In dieser Konzession fanden wir einen ganz anderen Haplotypen im Chloroplastengenom. Die Trennung zwischen den Konzessionen Maderacre (Zielkonzession) und Pietra Forestal Peru war jedoch mit genetischen Markern nicht möglich. Für *Dipteryx ferrea* war nach unseren Ergebnissen ein Mindestabstand von 100 km für eine genetische Unterscheidung nötig.

Forstkonzession	Anzahl Referenzproben	Erfolgsquote Zuordnung (%)
Maderacre	121	56
Pietra Florestal	25	44
Tres Chimbadas	23	100
Gesamt	170	60

Tabelle 18: Ergebnisse der Selbst-Zuordnung für *Dipteryx ferrea* in drei Forstkonzession in Peru

Hymenaea courbaril, *Hymenaea jatai* (Brasilien)

Das Probenmaterial war eine Mischung der beiden Arten *Hymenaea courbaril* und *Hymenaea jatai*. Proben dieser Arten ließen sich mit den DNA Markern zu 100% identifizieren. Die Individuen der beiden Beprobungsorte innerhalb derselben Forstkonzession mit einem Abstand von ca. 70 km konnten aber mit einer Selbst-Zuordnung (Tabelle 19) nur teilweise korrekt zugeordnet werden (56% bis 80% Erfolgsquote). Ein Herkunftsnachweis auf dieser kleinen räumlichen Ebene nur mit DNA Analysen wäre nicht sicher machbar.

Beprobungsort/Art	Anzahl Referenzproben	Erfolgsquote Zuordnung (%)
Süd/ <i>Hymenaea courbaril</i>	44	80
Süd/ <i>Hymenaea jatai</i>	45	96
Nord/ <i>Hymenaea courbaril</i>	51	57
Nord/ <i>Hymenaea jatai</i>	9	0
Gesamt	149	58

Tabelle 19: Ergebnisse der Selbst-Zuordnung für *Hymenaea* in einer Forstkonzession in Brasilien

Lophira alata (Kamerun)

Für *Lophira alata* zeigten die Ergebnisse der DNA-Analyse eine sehr zuverlässige Zuordnung für die Proben aus der Forstkonzessionen EF (100%) und MN (96%). Proben der Zielkonzession LN und der Nachbarkonzession EF waren jedoch mit den DNA-Analysen nicht zuverlässig zu trennen (Tabelle 20).

Forstkonzession	Anzahl Referenzproben	Erfolgsquote Zuordnung (%)
LN	100	61
EF	25	100
MN	25	96
Gesamt	150	73

Tabelle 20: Ergebnisse der Selbst-Zuordnung für *Lophira alata* in Forstkonzessionen in Kamerun

Blindtest

Für alle Holzproben des Blindtests war die DNA von ausreichender Qualität, sodass die SNP-Genotypen erfolgreich bestimmt werden konnten. Ähnlich wie bei den Tests zur Selbstzuordnung konnten richtige und falsche Deklarationen nur für die weiter entfernten Forstkonzessionen (>100 km) zuverlässig erkannt werden.

2.1.7 Small Scale – Stabile Isotopen

Methoden

Für die Isotopenanalyse im Zuge der SmallScale-Pilotstudie konnten die Proben wie in Tabelle 21. bearbeitet werden.

Art	Land	Geplante Proben	Gesammelte Proben	Proben mit C & N Werten
<i>Dipteryx ferrea</i>	Peru	150 + 20 Blindproben	181 + 21 Blindproben	168 + 21 Blindproben
<i>Hymenaea courbaril</i> , <i>Hymenaea jutai</i>	Brasilien	150 + 20 Blindproben	147 + 20 Blindproben	100 + 0 Blindproben
<i>Lophira alata</i>	Kamerun	150 + 20 Blindproben	150 + 20 Blindproben	150 + 0 Blindproben
Gesamt		510	539	439

Tabelle 21: Untersuchtes Material für die Isotopenuntersuchungen auf der Ebene von Forstkonzessionen (SmallScale)

Die Probenvorbereitung der Holzproben fand in den Laboren der Thünen-Institute für Forstgenetik und Agrarklimaschutz in Großhansdorf und Braunschweig statt. Die gemahlenen Holzproben wurden im Labor für die Analytik stabiler Isotope des Thünen-Instituts für Agrarklimaschutz eingewogen und massenspektrometrisch untersucht. Diese Untersuchungen erfolgten größtenteils an einem Delta V Advantage Isotopenverhältnis – Massenspektrometer (IRMS) gekoppelt an einen Elementaranalysator (EA) für CNS – Analyse und einen Hochtemperatur - Elementaranalysator (HT/EA) für die OH – Analyse.

Als Referenzmaterial wurden die Standards USGS 40, USGS 41 bzw. 41a, USGS 54, USGS 55 und USGS 56 verwendet.

Das IRMS-Messsystem wurde neu während des LargeScale Projekt angeschafft. Mehrere Gründe führten dazu, dass nur ein Teil der vorgesehenen Arbeiten durchgeführt werden konnten:

- Das IRMS-Gerät konnte nur mit großer zeitlicher Verzögerung in Betrieb genommen werden und in der Anfangsphase musste erst eine aufwendigere Methodenentwicklung durchgeführt werden als angenommen worden war.
- Es gelang aus technischen Gründen nur die Isotope $d^{13}C/^{12}C$ und $d^{15}N/^{14}N$ zu messen. Der Plan war es N, C und S in einer Messung zu untersuchen. Allerdings ist das Verhältnis von Kohlenstoff zu Schwefel in den tropischen Holzproben stark unterschiedlich. Um eine ausreichende Menge Schwefel für die Messung zu haben, muss eine große Menge Holzmehl eingewogen werden. Der ebenfalls in der Probe enthaltene Kohlenstoff überfrachtet dann die Trennsäule im Gaschromatographen, so dass in der Detektion ein sehr hoher Untergrund auftritt. Durch diesen Untergrund ist das geringe Signal des Schwefels nicht mehr sinnvoll zu messen. Um eine Einzelmessung von $d^{34}S/^{32}S$ vorzunehmen, müssten die Proben aufwendig nasschemisch aufbereitet werden. Diese Aufbereitung konnte aus Zeitgründen und fehlender personeller Kapazitäten nicht durchgeführt werden.
- Es ist technisch nur möglich eine Isotopengruppe am IRMS zu messen, also entweder C&N, gegebenenfalls S, oder O&H. Da die Methodenentwicklung und Messung somit bei C&N schon zu Verzögerungen geführt hatte, fehlte für O und H die Zeit. Zusätzlich kamen

weitere technische Probleme in der Gasanlage des Labors hinzu, so dass OH-Messungen nicht über die Methodenentwicklung hinaus kamen.

Ergebnisse

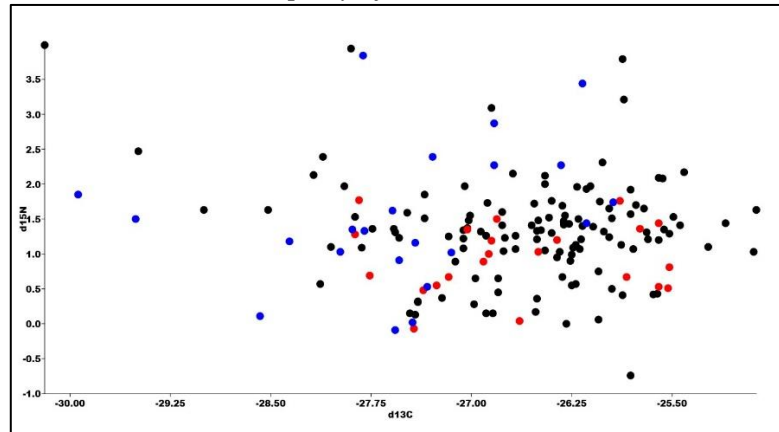
Zum Teil fanden sich statistisch signifikante Unterschiede bei den Mittelwerten zwischen verschiedenen Konzessionen einer Art. Die Abbildungen mit den $d^{13}\text{C}$ und $d^{15}\text{N}$ -Werten jeder Probe für die drei Baumarten zeigten jedoch in keinem Fall eine klare Abgrenzung der Proben auf der Ebene einzelner Forstkonzessionen (Abbildung 33). Die schwache Abgrenzung zwischen den Proben der einzelnen Konzessionen zeigte sich auch in den schwachen Erfolgsraten bei der statistischen Selbstzuordnung. Hier ergaben sich Durchschnittswerte von 52% für *Dipteryx* in Peru, 38% für *Hymenaea* in Brasilien und 52% für *Lophira* in Kamerun. 9 % aller Proben konnten keiner Konzession eindeutig zugeordnet werden (*Dipteryx* 6 %, *Hymenaea* 20 %, *Lophira* 5 %). Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sich zwischen den Isotopenverhältnissen für Kohlenstoff und Stickstoff für keine der vier Arten ein Zusammenhang mit geographischer Breite oder Länge erkennen ließ.

Diskussion

Vergleicht man die Ergebnisse der Projekterweiterung SmallScale und der Erweiterung der Referenzdaten auf Landesebene Brasilien kann festgehalten werden, dass sich die Aussagekraft mit vier Isotopenverhältnissen verbessert. Dies wird z.B. bei der Selbstzuordnung von *Hymenaea* deutlich: LargeScale 54 % und SmallScale 38 % Zuordnungserfolg. Möglich ist allerdings auch dass dieser Erfolg nicht nur durch eine verdoppelte Variablenzahl, sondern durch die größere Entfernung (>300km) der geographischen Gruppen zu einander entstanden ist. Für die Isotopenverhältnisse von Sauerstoff und Wasserstoff konnte ein Zusammenhang mit geographischer Lage nachgewiesen werden. Dieser unterstreicht, dass diese Isotopenverhältnisse für die Herkunftsidentifizierung wichtig sind, weshalb die Aussagekraft der bisherigen SmallScale Ergebnisse gering ist. Generell konnten wir keinen Zusammenhang der Stichprobengröße mit der Erfolgsquote der Selbstzuordnung finden. Die Isotopenverhältnisse der östlichsten geographischen Gruppe, der Gruppe 1 in der brasilienweiten Studie sowie die Daten der Konzession EF für *Lophira alata* in Kamerun unterschieden sich signifikant von den anderen Gruppen und Konzessionen. Dieser Unterschied könnte durch die relative Nähe beider Probenahmeregionen zum Meer erklärt werden (Förstel et al. 2011). Das stimmt überein mit der Tatsache, dass das Isotopenverhältnis von Sauerstoff bedeutend für die geographische Zuordnung ist. Hier spiegelt sich unter anderem der von Craig and Gordon (1965) beschriebene Kontinentaleffekt wider, mit zunehmendem Abstand zur Küste sinkt der Delta-Wert von Sauerstoff im Wasser. Stickstoff als bestimmender Vektor für die geographische Zuordnung bedingt sich zum einen durch die geologische Bodenbeschaffenheit und zum anderen vermutlich bedeutender, durch den anthropogenen Einfluss von Stickstoffemissionen (Savard et al. 2009).

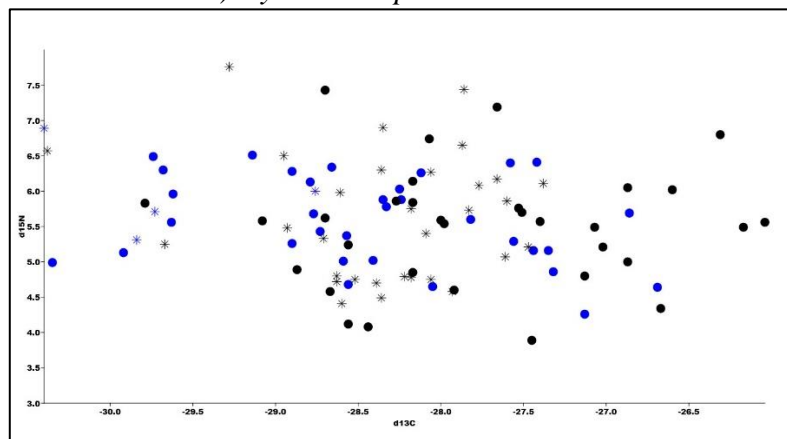
Im Hinblick auf die Methodenentwicklung wird deutlich, dass diese noch nicht vollkommen ausgereift sind. Besonders für Stickstoff und Wasserstoff in Holz traten hier größere Unsicherheiten und Abweichungen auf. Dies wird im Vergleich der Standardabweichungen von Stickstoff bis zu 3 ‰ und Wasserstoff um die 10 ‰ mit den Standardabweichungen der Referenzmaterialien USGS 54, USGS 55 und USGS 56 von 0,32 ‰ und 1,1 ‰, 0,4 ‰ und 1,7 ‰ sowie 0,4 ‰ und 1,8 ‰ deutlich. Für die Stickstoffmessungen in SmallScale wurden die Daten zum Teil unterschiedlich aufbereitet und dieser Unterschied könnte sich auch in den Daten niederschlagen, das ist noch nicht abschließend untersucht. Für einen Aufbau von weitreichenden Referenzdaten ist es somit wichtig, dass nicht nur die Vorbereitung der Probe als auch die Messung möglichst gleich ist.

a) *Dipteryx ferrea* aus Peru



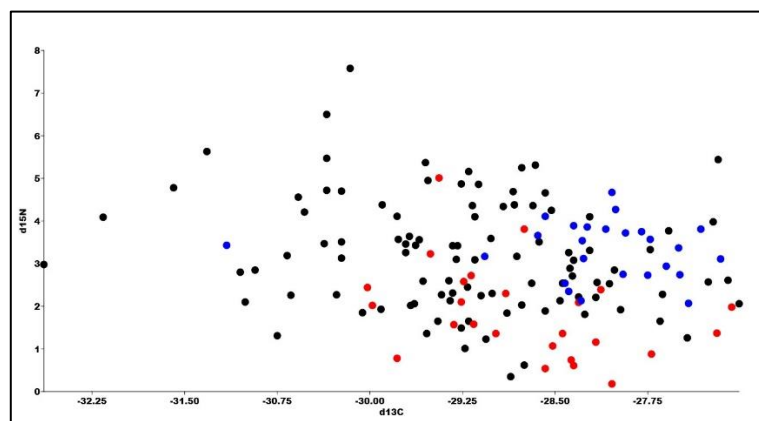
Konzessionen Maderacre (schwarz), Pietra Forestal (rot) und Tres Chimbadas (blau)

b) *Hymenaea spec.* in Brasilien



Konzession 1/Süd (schwarz), Konzession 2/Nord (blau), H. courbaril Punkt, H. jutai Stern

c) *Lophira alata* in Kamerun



Konzession LN (schwarz), Konzession EF (rot), Konzession MN (blau)

Abbildung 33: $d^{13}C$ und $d^{15}N$ -Werten jeder Probe in den Forstkonzessionen der drei Pilotstudien in Peru, Brasilien und Kamerun

2.1.8 Blindtest mit genetischen Referenzdaten

Stichprobennahme

Für den Blindtest sollten für jede Baumart Proben von 20 Bäumen gesammelt werden. Idealerweise sollten dabei von jedem Baum die drei verschiedenen Gewebearten Blatt, Kambium und Holz beprobt werden. Da die DNA im Holz deutlich stärker degradiert ist, kann ein Fehler beim Blindtest nicht nur an einer unzureichenden Referenzdatenbank sondern auch von der DNA-Qualität herrühren. Die Erfolgsquote getrennt nach Gewebetyp sollte hierüber Auskunft geben. Eine weitere Vorgabe war, dass ein Teil der Proben aus Regionen stammen sollte, für die keine Referenzproben gesammelt wurden. Die Koordination der Probennahme, das anonymisierte Verschicken der Proben für die Untersuchung zum Thünen-Institut und die Auswertung der Ergebnisse des Blindtests übernahm der Projektpartner CEH (UK). So sollte die Unabhängigkeit beim Blind-Test sichergestellt werden.

Es konnten für jede Baumart bis auf *Manilkara* über 20 Proben für den Blindtest gesammelt werden (Tabelle 22). Die Dreifachbeprobung derselben Bäume mit verschiedenen Gewebearten gelang jedoch nur unvollständig

Kontinent/ Gattung/Art	Kambium	Blatt	Holz	Gesamt
Südamerika				
<i>Carapa sp.</i>	19	1	28	48
<i>Cedrela sp.</i>	26	8	53	87
<i>Dipteryx sp.</i>	18	6	40	64
<i>Handroanthus sp.</i>	6	6	18	30
<i>Hymenaea courbaril</i>	15	5	22	42
<i>Jacaranda copaia</i>	21		34	55
<i>Manilkara huberi</i>	5		11	16
<i>Simarouba amara</i>	16	3	35	54
<i>Swietenia macrophylla</i>	9		16	25
Summe	130	29	246	405
Afrika				
<i>Aukoumea klaineana</i>	11	10	11	32
<i>Cylicodiscus gabunensis</i>	19	14	18	51
<i>Entandrophragma utile</i>	64	46	44	154
<i>Khaya sp.</i>	46	39	45	130
<i>Lophira alata</i>	25	22	24	71
<i>Nauclea diderrichii</i>	30	29	28	87
<i>Pterocarpus soyauxii</i>	13	13	13	39
Summe	208	173	183	580

Tabelle 22: Übersicht zu dem eingesammelten Material des Blindtests

Der Projektpartner CEH bekam die gesammelten Blindtestproben direkt von den Sammelteams aus Afrika und Südamerika. Dann bereitete CEH die Proben zum Versand an das Thünen-Institut vor. Hierbei wurde jede Probe mit einer Deklaration zur Herkunft (Land, Population) versehen. Ein Teil dieser Deklarationen war korrekt und ein Teil war falsch (26% Land, 45% Population). Für einen Teil der Proben beinhaltete die Deklaration zur Herkunft auch geographische

Koordinaten. Bei Mehrfachbeprobung des gleichen Baumes (unterschiedliche Gewebearten: Holz, Blatt Kambium) wurde jede Probe einzeln und in den meisten Fällen mit unterschiedlichen Herkunftsdeklarationen versehen. Am Thünen-Institut wurde die DNA jeder Probe insgesamt zweimal mit zwei verschiedenen Extraktionsprotokollen gewonnen und dann zur SNP-Genotypisierung zum Projektpartner INRA in Bordeaux geschickt. Bei der Auswertung der Daten am Thünen-Institut wurden die Genotypen der Blindtestproben mit den Referenzproben jeder Art verglichen. Bei der Überprüfung der geographischen Zuordnung wurden zwei verschiedene statistische Verfahren eingesetzt (Rannala and Mountain 1997, Degen et al. 2017). Die Zuordnung erfolgt einmal für die genetisch definierte Gruppe, die in den Abbildungen 2 bis 19 durch gleiche Farben markiert sind und einmal nach genetisch definierten Regionen. Die Zuordnung erfolgte nur für Blindtestproben, bei denen für mindestens 50% der SNP-Genorte ein Ergebnis aus der Laboranalyse vorlag. Ebenso wurden Blindtestproben nicht analysiert, wenn für die deklarierte Holzherkunft nicht ausreichend Referenzproben in der Datenbank vorhanden waren. Das Ergebnis der Zuordnung und Bewertung der Herkunftsdeklarationen wurde dann dem Projektpartner CEH für den Abgleich mit den tatsächlichen Ursprungsangaben übermittelt.

Das Ergebnis dieses Abgleichs findet sich in Tabelle 23. Bei der Bewertung der genetischen Analyseergebnisse sind vier verschiedene Fälle zu unterscheiden:

1. Die Deklaration war richtig und wurde nicht abgelehnt
2. Die Deklaration war richtig wurde aber abgelehnt
3. Die Deklaration war falsch wurde aber nicht abgelehnt
4. Die Deklaration war falsch und wurde abgelehnt

Gewebe	Land			Population		
	Holz	Kambium	Blatt	Holz	Kambium	Blatt
Ohne Ergebnis (%)	9,3	12,7	19,3	13,2	17,0	19,3
Richtige Bewertung (%)	91,9	90,1	87,4	79,4	79,9	76,2
Falsche Bewertung (%)	8,1	9,9	12,6	20,6	20,1	23,8
Fall 1: Richtige Deklaration /nicht abgelehnt (%)	70,8	71,3	61,6	50,0	53,7	46,4
Fall 2: Richtige Deklaration / abgelehnt (%)	5,7	4,6	7,9	5,4	3,0	5,3
Fall 3: Falsche Deklaration / nicht abgelehnt (%)	2,4	5,3	4,6	15,3	17,2	18,5
Fall 4: Falsche Deklaration / abgelehnt (%)	21,1	18,8	25,8	29,4	26,1	29,8

Tabelle 23: Ergebnisse des Blindtest über alle Arten

Für die Fälle 1 und 4 galt der Blindtest als erfolgreich bestanden und die Fälle 2 und 3 waren als Fehler anzusehen (Tabelle 23). Hierbei ist der Fall 2 (richtige Deklaration / abgelehnt) als besonders kritisch zu bewerten, da dies im praktischen Testfall bedeuten würde, dass ein korrekt handelnder Marktteilnehmer zu Unrecht einer Falschdeklaration bezichtigt würde. Entgegen der

ursprünglichen Erwartung, war der Anteil Blindtestproben mit unzureichenden genetischen Daten beim Holz mit 9,3% bzw. 13,2 % am geringsten. Offensichtlich war die DNA-Qualität der Blätter und des Kambiums nicht besser. Das mag zum einen an unserem deutlich verbesserten Laborprotokoll zur Extraktion von DNA aus Holz gelegen haben und zum anderen war das Holz des Blindtests in vielen Fällen relativ frisch. Das bedeutet, dass Holz war nicht anderweitig behandelt worden. Die Fehlerrate des Blindtests (Fall 2 + Fall 3) lag bei den Deklarationen zum Ursprungsland je nach Gewebeart zwischen 8,1 % und 12,6 % und bei den Angaben zur Population zwischen 20,1 % und 23,8%. Die Ungenauigkeit war damit bei Angaben zur Population ungefähr doppelt so groß. Der besonders kritische Fehler (Fall 2: Richtige Deklaration abgelehnt) lag insgesamt zwischen 3% und 8%.

2.1.9 Zusätzliche Genmarker /Sequenzierungen zur Artunterscheidung

Insbesondere bei den beiden Gattungen *Hymenaea* und *Handroanthus* (vormals *Tabebuia*) hatten wir mit dem ursprünglich entwickelten Satz an SNP-Genmarkern erhebliche Probleme, in den genetischen Referenzdaten geographische Muster und genetische Unterschiede zwischen verschiedenen Arten zu unterscheiden. Ebenso war für einen bedeutenden Teil der Individuen in den Referenzdaten die Artzuordnung fragwürdig. Zur Verbesserung der Referenzdaten unternahmen wir in Absprache mit dem Projektträger in der Endphase des Projekts daher noch einen weiteren Anlauf, um hier mehr Klarheit über die Artenzusammensetzung und deren innerartliche räumlich-genetische Muster zu gewinnen. In den Ländern Brasilien, Peru und Französisch Guayana sammelten wir zusätzlich 485 Individuen mit genauerer taxonomischer Zuordnung für fünf bzw. sechs verschiedene Arten innerhalb der beiden Gattungen ein (Tabelle 24). Von diesen Individuen wählten wir 95 Proben aus, die wir dann mit der modernen DNA-Sequenzierungsmethode GRAS-Di (Hosoya et al. 2019) sehr intensiv auf Sequenzunterschiede zwischen Arten untersuchten.

Art	Brasilien	Französisch Guayana	Peru	Gesamt
<i>Handroanthus chrysanthus</i>			10	10
<i>Handroanthus chrysotrichus</i>	30			30
<i>Handroanthus impetiginosus</i>	24	30	19	73
<i>Handroanthus incanus</i>			24	24
<i>Handroanthus obscurus</i>			9	9
<i>Handroanthus serratifolius</i>	27	41	8	76
<i>Handroanthus sp.</i>			3	3
<i>Hymenaea courbaril</i>	60	52	26	138
<i>Hymenaea oblongifolia</i>			20	20
<i>Hymenaea oblongifolia var palustris</i>			22	22
<i>Hymenaea martiana</i>	40			40
<i>Hymenaea stigoncarpa</i>	40			40
Gesamt	221	123	141	485

Tabelle 24: Anzahl neu eingesammelter Proben für DNA-Sequenzierungen zur Artunterscheidung in den Gattungen *Handroanthus* und *Hymenaea*

Je Gattung hatten wir dann als ersten Schritt 190 der neu eingesammelten Individuen mit dem bereits entwickelten SNP-Satz analysiert. So wollten wir überprüfen, ob in einer Analyse mit dem Programm STRUCTURE Individuen mit derselben taxonomischen Bezeichnung auch in dieselbe genetische Gruppe eingeteilt wurden. Das war nur zu einem Teil der Fall. Ein Teil der neu eingesammelten Proben war daher vermutlich taxonomisch falsch zugeordnet.

Unsere bioinformatische Auswertung der Sequenzdaten lieferte zunächst für die Gattung *Handoanthus* fast 3 Millionen potentielle SNPs zur Artunterscheidung und für *Hymenaea* etwas mehr als 43500 SNPs. Die deutlich höhere Anzahl an potentiellen SNPs für *Handoanthus* erklärt sich daher, dass es für diese Gattung bereits ein komplettes Referenzgenom gab und für *Hymenaea* nicht. Nach verschiedenen Filterschritten mit dem Ziel, möglichst gute SNPs zur Artunterscheidung für die MassArray-Genotypisierung zu bekommen, blieben davon am Ende für *Handoanthus* 170 SNPs (Abbildung 34) und für *Hymenaea* 126 SNPs (Abbildung 35) übrig.

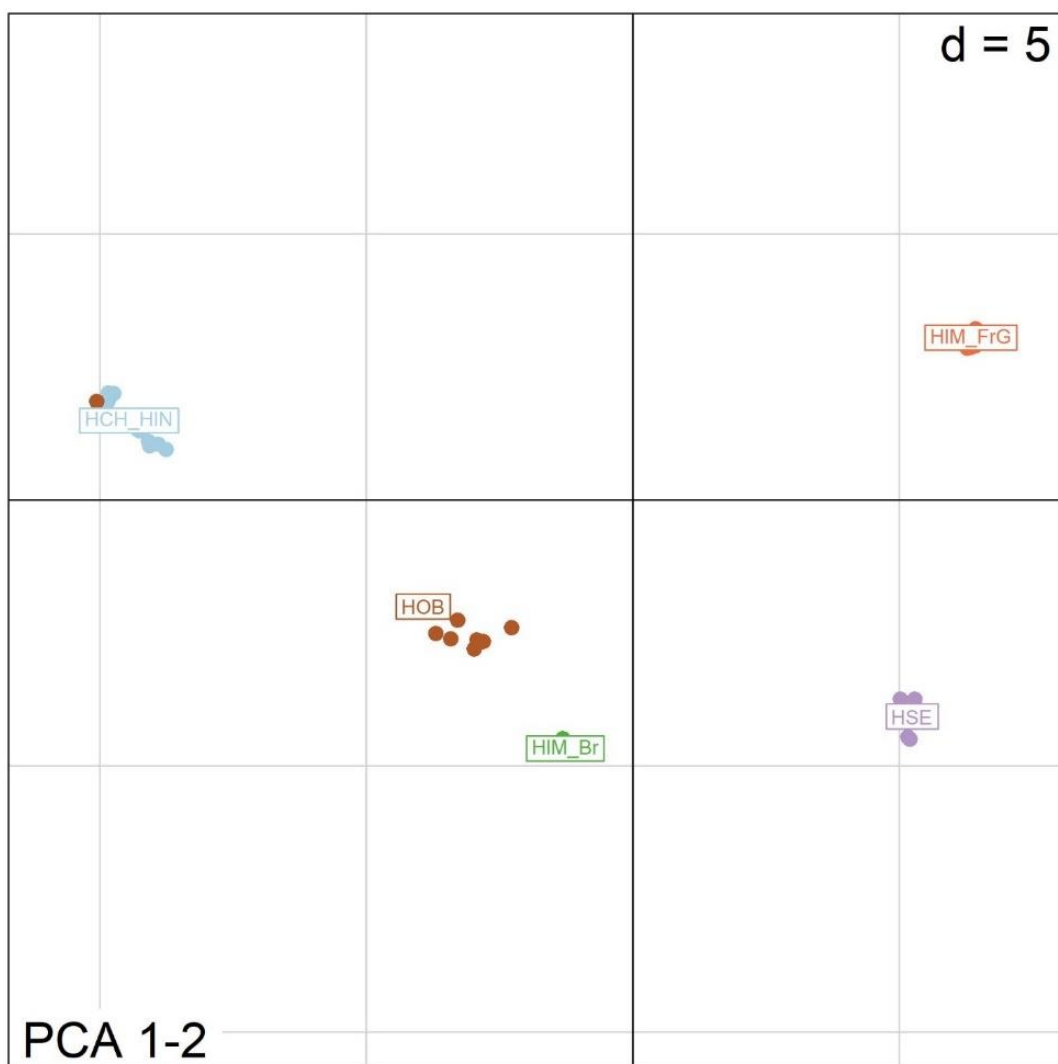


Abbildung 34: Hauptkomponentenanalyse (PCA) mit den ausgewählten 170 SNPs für *Handoanthus*, Individuen gemäß STRUCTURE-Ergebnissen farblich markiert (N=48) Gruppen: HCN_HIN (*H. chrysanthus*, *H. chrysotrichus*, *H. incanus*), HIM_FrG (*H. impetiginosus*, Französisch Guayana), HIM_Br (*H. impetiginosus*, Brasilien), HSE (*H. serratifolius*), HOB (*H. obscurus*).

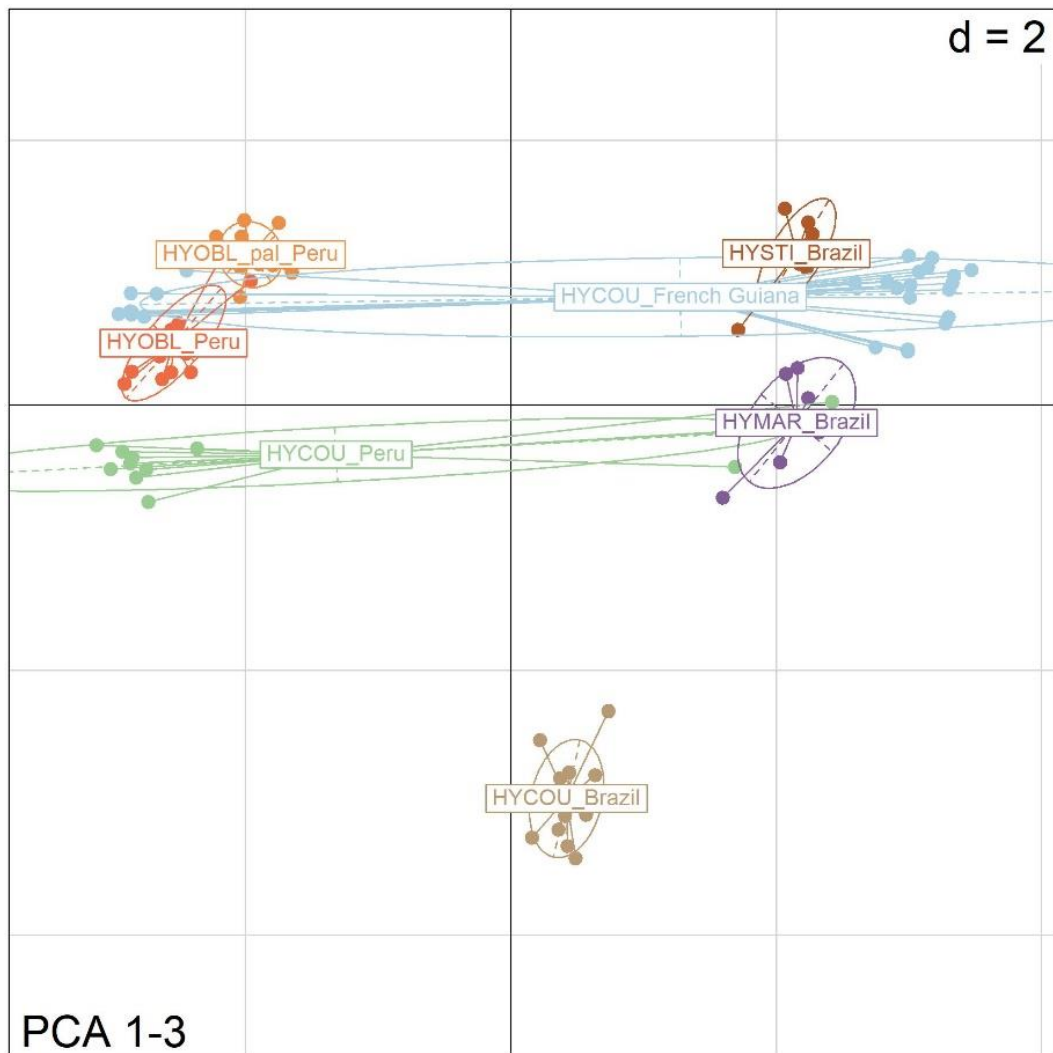


Abbildung 35: Hauptkomponentenanalyse (PCA) mit 126 SNPs für die Proben von *Hymenaea* sp. Gruppen: HYOBL_pal_Peru (*H. oblongifolia* var *palustris* Peru), HYOBL_Peru (*H. oblongifolia* Peru), HYCOU_Peru (*H. courbaril* Peru), HYCOU_French Guiana (*H. courbaril* Französisch Guayana), HYCOU_Brazil (*H. courbaril* Brasilien), HYMAR (*H. martiana* Brasilien), HYSTI_Brazil (*H. stigoncarpa* Brasilien)

Auch bei *Hymenaea* halfen die neuen SNPs, die Arten besser voneinander zu trennen und falschklassifizierte Individuen zu identifizieren.

2.1.10 Technologietransfer

Der Wissens- und Technologietransfer zur Holzidentifizierung hin zu den tropenholzproduzierenden Ländern war ein wichtiges Ziel des Projekts. Dieses Ziel sollte zum einen durch die schwerpunktmäßige Unterstützung von einem Regionallabor in Afrika [Forest Research Institute of Ghana (FORIG) in Kumasi, Ghana] und einem Labor in Südamerika [Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), Iquitos, Peru] realisiert werden. Zum anderen sollte Personal aus verschiedenen tropischen Ländern hierfür geschult werden.

Zur Unterstützung der beiden Labore wurden insgesamt mehr als 200.000 Euro in die Beschaffung von Laborausrüstung und Chemikalien investiert. Zu den größten Posten gehörten die Beschaffung einer Solaranlage zur Sicherstellung der Stromversorgung und ein DNA-Sequenzierer in Kumasi (Abbildung 36).

a)



b)



Abbildung 36: a) DNA-Sequenzierer und b) Solaranlage und Speicherbatterien für eine unterbrechungsfreie Stromversorgung im Labor von FORIG in Kumasi

Die Schulung erfolgte in Form von Trainingsworkshops vor Ort. Zu Beginn des Projekts lag hierbei der Schwerpunkt auf der Wissensvermittlung zur richtigen Probennahme der Referenzproben im Wald (Abbildung 37).



Abbildung 37: Training zur Probennahme von Referenzproben in Kumasi (Ghana) im März 2015

Während die Teams in Südamerika bereits über umfangreiche Erfahrungen bei der Probennahme verfügten, mussten die Teams in Afrika hierzu erst noch geschult werden. Hierfür fanden insgesamt vier Workshops statt:

- 02.03.2015-06.03.2015, Ghana
- 04.01.2016-10.01.2016, Kamerun
- 29.01.2016-12.02.2016, Nigeria
- 11.07.2016-24.07.2016, Liberia

Ein weiterer Schwerpunkt der Schulung vor Ort war das Erlernen der richtigen Labormethode, um aus Blatt- und Kambiumgewebe DNA zu extrahieren. Das Training hierfür fand in Afrika und in Südamerika während insgesamt dreier Workshops statt:

- 20.04.2015 - 24.04.2015, Peru
- 21.11.2016 - 02.12.2016, Ghana
- 23.01.2017 - 03.02.2017, Brasilien

Vor Ort in Ghana wurde die Nutzung des mit Mitteln des Projekts beschafften DNA-Sequenzierers zweimal in Schulungsreisen geübt:

- 21.11.2016-02.12.2016

- 28.10.2018-8.11.2018

Schließlich wurde in Workshops die Datenauswertung geübt:

- 11.04.2016 - 15.04.2016, Piracicaba, Brasilien
- 24.01.2017 - 30.01.2017, Kourou, Französisch Guayana
- 27.04.2017 - 30.04.2017, Lima, Peru
- 06.11.2018 - 08.11.2018, Iquitos, Peru
- 11.02.2019 – 13.02.2019, Accra, Ghana

Neben den Schulungen vor Ort bildeten wir am Thünen-Institut und beim Projektpartner CEH in Großbritannien und an der Universität Adelaide insgesamt acht Personen (Wissenschaftler und Techniker) aus den tropischen Partnerländern zur Holzidentifizierung aus (Tabelle 25). In den meisten Fällen wurde der Aufenthalt zum Teil mit Mitteln des Projekts und zum anderen Teil mit einer Finanzierung aus den entsendenden Instituten ermöglicht.

Name	Institut	Land	Dauer Aufenthalt	Ausbildungsgegenstand
Camila Lucas Chaves	Universität Sao Paulo	Brasilien	09.07.2015-22.06.2016	Markerentwicklung und Screening für <i>Hymenaea courbaril</i>
Marius Ekué	Bioersity International	Kamerun	01.08.2015-04.09.2015	Entwicklung Referenzdaten für <i>Khaya senegalensis</i>
Gael Bouka Dipelet	Universität Kongo	Kongo	01.10.2015-30.11.2015	Entwicklung Referenzdaten für <i>Khaya sp.</i>
Barbara Rocha Mayer Sand	Universidade Estadual Paulista „Júlio de Mesquita filho“	Brasilien	4.10.2016-13.03.2017	Masterarbeit <i>Handroanthus serratifolius</i>
Euridice Honorio	Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana	Peru	27.02.2017-10.03.2017	Schulung SNaPSHOT Verfahren, <i>Swietenia macrophylla</i>
Carmen Davila	Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana	Peru	27.02.2017-10.03.2017	Schulung SNaPSHOT Verfahren, <i>Swietenia macrophylla</i>
Sandra Owuso	FORIG	Ghana	12.06.2017-12.07.2017	Schulung SNaPSHOT Verfahren, <i>Khaya sp.</i>
Euridice Honorio	Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana	Peru	07.04.2019-27.04.2019	Datenauswertung <i>Dipteryx sp.</i> und <i>Swietenia macrophylla</i>
Niklas Tysklind	INRA Ecofog	Französisch Guayana	25.11.2019-29.11.2019	Datenauswertung

Tabelle 25: Übersicht zu Personen, die während des Projekts am Thünen-Institut geschult wurden

Als weitere Form der Wissensvermittlung wurden mehrere Seminare zu den Projektergebnissen und zur Methode der Holzherkunftsidentifizierung mit externen Teilnehmern aus Wissenschaft, Forst- und Holzwirtschaft und den Ministerien in den tropischen Zielländern durchgeführt:

- 02.03.2015 - 06.03.2015, Kumasi, Ghana
- 20.04.2015 - 24.04.2015, Iquitos, Peru
- 11.04.2016 - 15.04.2016, Piracicaba, Brasilien
- 24.01.2017 - 30.01.2017, Kourou, Französisch Guayana
- 27.04.2017 - 30.04.2017, Lima, Peru

- 06.11.2018 - 08.11.2018, Iquitos, Peru
- 11.02.2019 – 13.02.2019, Accra, Ghana

Insgesamt muss ein unterschiedliches Resümee zum Erfolg des Wissenstransfers in den beiden Laboren gezogen werden. Durchweg positiv und nachhaltig waren unsere Bemühungen im Labor der IIAP in Iquitos (Peru). Dort gab es bereits zu Beginn des Projekts ein funktionsfähiges Labor und gut geschultes Personal einschließlich einer kompetenten und motivierten Leiterin (Dr. Carmen Garcia Davila). Zudem war das Labor bereits seit vielen Jahren im Rahmen einer engen französisch-peruanischen Kooperation auf die Anwendung verschiedener molekulargenetischer Methoden zur Untersuchung der genetischen Vielfalt von Fischarten im Amazonas geschult. Das französische Entwicklungshilfeeinstitut (IRD - Institut de Recherche pour le Développement) hatte ständig Wissenschaftler vor Ort in Iquitos. Deutlich bescheidener ist hingegen der Erfolg unserer Bemühungen beim Labor von FORIG in Kumasi (Ghana). Ein Problem war der ständige Wechsel des Personals einschließlich der Leitung im Labor. Zudem gab es keine Synergieeffekte mit anderen Forschungsaktivitäten. Teilweise fanden über Monate keinerlei Arbeiten im Labor statt. Darunter litten auch die Geräte im Labor, die regelmäßig gewartet werden müssen.

2.2 Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Insgesamt wurden im Projekt rund 4,3 Millionen Euro verausgabt. Der größte Teil (2,637 Millionen Euro) entfiel dabei auf die Position 0835 (Aufträge Dritte). Damit wurde im Wesentlichen die Probennahme in den verschiedenen Ländern in Südamerika und Afrika, die DNA-Sequenzierung zur Genmarkerentwicklung, die SNP-Genotypisierung und die Unterstützung der beiden Regionallabore FORIG in Kumasi (Ghana) und IIAP in Iquitos (Peru) finanziert. Der zweitgrößte Posten waren mit 1,05 Millionen Euro die Kosten für Personal (0812 Wissenschaftler, 0817 Technische Kräfte) am Thünen-Institut. Der Projektwissenschaftler koordinierte in der ersten Hälfte des Projekts die Probennahme und später wurde wissenschaftliches Personal zur Auswertung von DNA-Daten eingesetzt. Eine Fremdsprachensekretärin unterstützte die Verwaltung des Projekts und half bei der Kommunikation mit den Projektpartnern. Eine technische Assistentin arbeitete schließlich im Laborbereich insbesondere bei der Registrierung und Aufbereitung der Proben, der DNA-Extraktion und der Entwicklung, Anwendung und Schulung von Methoden für die genetischen Analysen in den Regionallaboren der Projektpartner IIAP und FORIG. Die Kosten für Verbrauchsmaterial schlugen mit rund 360 Tausend Euro zu Buche. Hiermit wurden Chemikalien und sonstiges Verbrauchsmaterial für die genetischen Analysen und Untersuchungen an den stabilen Isotopen bezahlt. Das Budget in Höhe von 125 Tausend Euro für Investitionen (Pos. 0850) wurde zur Anschaffung eines leistungsfähigen Computerservers für die Verarbeitung der bioinformatischen Projektdaten, für die Beschaffung einer -70°C Tiefkühltruhe zur langfristigen Einlagerung und Sicherung des Probenmaterials und für Notebooks für die Dienstreisen der Projektmitarbeiter verwendet. Die rund 101 Tausend Euro für Reisekosten (Position 0846) wurden für Reisen zur Probennahme und zu den Projektpartnern sowie für die Finanzierung der Abschlusskonferenz genutzt.

2.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Im Projekt konnten für insgesamt 17 tropische Baumarten bzw. Gattungen in Afrika und Südamerika genetische Referenzdaten zur Holzherkunftsidentifizierung entwickelt werden. Damit verbesserten sich ganz erheblich die technischen Prüfmöglichkeiten, um den illegalen Holzeinschlag bei diesen Baumarten aufzudecken und damit einzudämmen. Der illegale

Holzeinschlag ist ein sehr bedeutendes ökologisches und ökonomisches Problem. Die jährlichen Schäden hierdurch werden auf mehrere Milliarden US Dollar geschätzt. Vor diesem Hintergrund sind die Ausgaben für das Projekt mit rund 4.2 Millionen Euro vertretbar und angemessen.

2.4 Voraussichtlicher Nutzen der Ergebnisse

Nun am Ende des Projekts stehen für 17 weitere Baumarten aus Afrika und Südamerika genetische Referenzdaten und die entsprechenden Genmarker zu Verfügung. Diese Daten und Genmarker werden vom Thünen-Kompetenzzentrum für Holzherkünfte für die Überprüfung von Angaben zur Herkunft und zum Teil auch zur Artunterscheidung von Holzproben genutzt. Damit kann das Thünen-Institut für noch mehr Baumarten, Prüfaufgaben aus dem Holzhandelssicherungsgesetz wahrnehmen.

Holzproben zur Herkunftsüberprüfung, werden dem Institut unter anderem von deutschen und ausländischen Behörden, die mit der Überwachung von Gesetzen zur Bekämpfung des illegalen Holzeinschlages und CITES-Bestimmungen beauftragt sind (u.a. BLE in Deutschland, NMO in UK), von Holzhändlern und von Umweltverbänden geschickt. Das Thünen-Institut für Forstgenetik untersucht so jährlich zwischen 200 und 500 Holzproben. Auch die Projektpartner insbesondere die beiden im Projekt unterstützten Genetik-Labore in Afrika und Südamerika sind nun in der Lage, solche Überprüfungen zur Holzherkunft durchzuführen. Die genetischen Referenzdaten wurden dem „Global Timber Tracking Network (GTTN)“ übermittelt. Die entwickelten Genmarker wurden in zahlreichen Publikationen der breiten Öffentlichkeit zugänglich gemacht.

2.5 Fortschritt anderer Stellen auf dem Gebiet während des Projekts

In den letzten fünf Jahren war das LargeScale-Projekt nach unserem Kenntnistand zwar das größte aber nicht das einzige Forschungsvorhaben, in dem Referenzdaten zur Holzherkunftskontrolle entwickelt wurden. Über unsere Beteiligung am „Global Timber Tracking Network“ (GTTN) hatten wir einen wissenschaftlichen Austausch mit Personen der anderen Projekte. Sofern, dieselben Baumarten bearbeitet wurden, bemühten wir uns um eine Kooperation. So lief für die Baumgattung *Khaya* ein Projekt von Bioversity International und die Promotion von Gael Bouka-Diplelet an der Universität in Montpellier. Hier hatten wir eine weitgehende Kooperation vereinbart, die zu vielfältigen Synergien bei der Entwicklung der Genmarker, der Probennahme, der Auswertung der Daten und der Publikation der Ergebnisse führte. In ähnlicher Weise kooperierten wir für die Untersuchung der Baumart *Hymenaea* mit der Universität Londrina in Brasilien, die den Gastaufenthalt von Camila Chaves am Thünen-Institut im Rahmen ihrer Dissertation finanzierte. Weitere Kooperationen hatten sich bei der Baumart- und Herkunftskontrolle von *Cedrela* mit Wissenschaftlern in den USA und Kolumbien ergeben.

Während der Projektlaufzeit wurden in Asien von Arbeitsgruppen in China, Taiwan, Malaysia und Dänemark für verschiedene Baumarten genetische Referenzdaten zur Holzherkunftskontrolle entwickelt (Hartvig et al. , Ng et al. 2016, Hung et al. 2017, Ng et al. 2017, Nuroniah et al. 2017, Ng et al. 2020). Ebenso gab es einige Arbeiten zu dem Thema in Afrika (Vlam et al. 2018, Vanden Abeele et al. 2019). Nur sehr wenig wurde zur Holzherkunftsidentifizierung mit stabilen Isotopen (Gori et al. 2015, Horacek et al. 2018, Vlam et al. 2018) oder anderen chemischen Verfahren wie z.B. DART publiziert (Espinoza et al. 2015, Evans et al. 2017, Paredes-Villanueva et al. 2018).

2.6 Erfolgte und geplante Veröffentlichungen

Bisher (Stand Juni 2020) wurden zu Ergebnissen des Projekts die folgenden 13 Publikationen in internationalen Fachzeitschriften veröffentlicht:

- Blanc-Jolivet, C., M. Mader, H. N. Bouda, E. Guichoux, G. Yene, E. Opuni-Frimpong, and B. Degen. 2020. Development of SNP markers for the African timber species *Nauclea diderrichii*. Conservation Genetics Resources.
- Chaves, C. L., C. Blanc-Jolivet, A. M. Sebbenn, M. Mader, B. R. V. Meyer-Sand, K. Paredes-Villanueva, E. N. H. Coronado, C. Garcia-Davila, N. Tysklind, V. Troispoux, M. Massot, and B. Degen. 2019. Nuclear and chloroplastic SNP markers for genetic studies of timber origin for *Hymenaea* trees. Conservation Genetics Resources 11:329-331.
- Chaves, C. L., B. Degen, B. Pakull, M. Mader, E. Honorio, P. Ruas, N. Tysklind, and A. M. Sebbenn. 2018. Assessing the Ability of Chloroplast and Nuclear DNA Gene Markers to Verify the Geographic Origin of Jatoba (*Hymenaea courbaril* L.) Timber. Journal of Heredity 109:543-552.
- Coronado, E. N. H., C. Blanc-Jolivet, M. Mader, C. R. Garcia-Davila, A. M. Sebbenn, B. R. V. Meyer-Sand, K. Paredes-Villanueva, N. Tysklind, V. Troispoux, M. Massot, and B. Degen. 2019. Development of nuclear and plastid SNP markers for genetic studies of *Dipteryx* tree species in Amazonia. Conservation Genetics Resources 11:333-336.
- Degen, B., C. Blanc-Jolivet, K. Stierand, and E. Gillet. 2017. A nearest neighbour approach by genetic distance to the assignment of individual trees to geographic origin. Forensic Science International-Genetics 27:132-141.
- Garcia-Davila, C., D. A. Gomero, J. F. Renno, R. D. Soria, G. H. Pizango, G. F. Llampazo, D. Castro-Ruiz, E. M. de Loayza, C. A. Chavez, M. Mader, N. Tysklind, K. Paredes-Villanueva, D. D. Torres, B. Degen, and E. N. H. Coronado. 2020. Molecular evidence for three genetic species of *Dipteryx* in the Peruvian Amazon. Genetica 148:1-11.
- Mader, M., B. Pakull, C. Blanc-Jolivet, M. Paulini-Drewes, Z. H. N. Bouda, B. Degen, I. Small, and B. Kersten. 2018. Complete Chloroplast Genome Sequences of Four *Meliaceae* Species and Comparative Analyses. International Journal of Molecular Sciences 19.
- Meyer-Sand, B. R. V., C. Blanc-Jolivet, M. Mader, K. Paredes-Villanueva, N. Tysklind, A. M. Sebbenn, E. Guichoux, and B. Degen. 2018. Development of a set of SNP markers for population genetics studies of Ipe (*Handroanthus* sp.), a valuable tree genus from Latin America. Conservation Genetics Resources 10:779-781.
- Pakull, B., M. R. M. Ekue, U. G. B. Dipelet, C. Doumenge, D. B. McKey, J. J. Loumeto, E. Opuni-Frimpong, S. N. Yorou, B. M. Y. Nacoulma, K. A. Guelly, L. Ramamonjisoa, D. Thomas, E. Guichoux, J. Loo, and B. Degen. 2019. Genetic diversity and differentiation among the species of African mahogany (*Khaya* spp.) based on a large SNP array. Conservation Genetics 20:1035-1044.
- Pakull, B., M. Mader, B. Kersten, M. R. M. Ekue, U. G. B. Dipelet, M. Paulini, Z. H. N. Bouda, and B. Degen. 2016. Development of nuclear, chloroplast and mitochondrial SNP markers for *Khaya* sp. Conservation Genetics Resources 8:283-297.
- Paredes-Villanueva, K., C. Blanc-Jolivet, M. Mader, E. N. H. Coronado, C. Garcia-Davila, A. M. Sebbenn, B. R. V. Meyer-Sand, H. Caron, N. Tysklind, S. Cavers, and B. Degen. 2020. Nuclear and plastid SNP markers for tracing *Cedrela* timber in the tropics. Conservation Genetics Resources 12:239-244.
- Sebbenn, A. M., C. Blanc-Jolivet, M. Mader, B. R. V. Meyer-Sand, K. Paredes-Villanueva, E. N. H. Coronado, C. Garcia-Davila, N. Tysklind, V. Troispoux, A. Delcamp, and B. Degen. 2019. Nuclear and plastidial SNP and INDEL markers for

genetic tracking studies of *Jacaranda copaia*. Conservation Genetics Resources 11:341-343.

- Tysklind, N., C. Blanc-Jolivet, M. Mader, B. R. V. Meyer-Sand, K. Paredes-Villanueva, E. N. H. Coronado, C. R. Garcia-Davila, A. M. Sebbenn, H. Caron, V. Troispoux, E. Guichoux, and B. Degen. 2019. Development of nuclear and plastid SNP and INDEL markers for population genetic studies and timber traceability of *Carapa* species. Conservation Genetics Resources 11:337-339.

Für die folgenden vier Publikationen sind die Manuskripte zur Veröffentlichung eingereicht:

- Development of nuclear and plastid SNP markers for genetic studies and assessment of timber origin of *Simarouba amara* Aubl.
- SNP markers as a successful molecular tool for assessing species identity and geographic origin of trees in the economically important South American legume genus *Dipteryx*
- Development of nuclear SNP markers for Mahogany (*Swietenia spp.*)
- Development of new SNP and INDEL loci for the valuable African timber species *Lophira alata*

Weitere 16 Manuskripte sind in Vorbereitung:

- Primer Note Entandrophragma
- Primer Note Cylicodiscus gabunensis
- Comparison of various genome markers (nuclear, chloroplast and mitochondrial) for the genetic structure of lophira.
- Comparison of marker sets from RADseq and ddRADseq for the genetic structure of Aucoumea klaineana
- Multispecies analysis South America
- Multispecies analysis Africa
- Species ID and biogeography of Handroanthus
- Conservation and genetic tracking of Ipe
- Species ID and biogeography of Hymeneae
- Technical paper on assignment methods
- Policy brief
- Genetic structure of *Jacaranda copaia*
- Timber tracking with stable isotopes data
- Genetic tracking for tree species (review - summary - overview)
- Comparison of nuclear SSR and SNP markers in estimating genetic diversity and population genetic structure in *Swietenia macrophylla* King, an endangered tree species in the Peruvian Amazon
- *Carapa* population structure and individual assignment (methods in R).

Die Publikationen erfolgten jeweils in enger Absprache und unter Beteiligung der involvierten Projektpartner. Das Projekt liefert mit den bereits getätigten und den aktuell erstellten Publikationen sehr umfangreiche Veröffentlichungen.

3 Erfolgskontrollbericht

3.1 Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen

Das LargeScale-Projekt war Teil des vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) unterstützten Förderprogramms "Förderung der Forschungs Kooperation und des Wissensaustausches für internationale nachhaltige Waldbewirtschaftung". Durch das Förderprogramm sollten Forschungsprojekte gefördert werden, die weltweit mögliche Lösungsansätze für eine nachhaltigere Waldbewirtschaftung erforschten. Darüber hinaus sollte der internationale Austausch zwischen Forstwissenschaftlern gefördert werden. Ein besonders dringendes Problem ist dabei die fortschreitende Zerstörung und Degradierung von Waldflächen.

Um der Entwaldung und der Degradierung entgegen zu wirken, förderte das BMEL internationale Forschungsprojekte sowie den Wissensaustausch zwischen deutschen und ausländischen Forstexperten und Forstexpertinnen.

Das LargeScale-Projekt erarbeitete genetische Referenzdaten tropischer Baumarten in Afrika und Südamerika. Diese Referenzdaten und die entwickelten Genmarker können eingesetzt werden, um die Einhaltung rechtlicher Vorgaben zur Reduzierung des illegalen Holzeinschlages zu überprüfen.

3.2 Das wissenschaftlich-technische Ergebnis des Vorhabens

Siehe hierzu Kapitel 2.1

3.3 Fortschreibung des Verwertungsplans

Nun am Ende des Projekts stehen für 17 weitere Baumarten aus Afrika und Südamerika genetische Referenzdaten und die entsprechenden Genmarker zu Verfügung. Diese Daten und Genmarker werden vom Thünen-Kompetenzzentrum für Holzherkünfte für die Überprüfung von Angaben zur Herkunft und zum Teil auch zur Artunterscheidung von Holzproben genutzt. Damit kann das Thünen-Institut für noch mehr Baumarten, Prüfaufgaben aus dem Holzhandelssicherungsgesetz wahrnehmen.

Holzproben zur Herkunftsüberprüfung werden dem Institut unter anderem von deutschen und ausländischen Behörden, die mit der Überwachung von Gesetzen zur Bekämpfung des illegalen Holzeinschlages und CITES-Bestimmungen beauftragt sind (u.a. BLE in Deutschland, NMO in UK), von Holzhändlern und von Umweltverbänden geschickt. Das Thünen-Institut für Forstgenetik untersucht so jährlich zwischen 200 und 500 Holzproben. Auch die Projektpartner insbesondere die beiden im Projekt unterstützten Genetik-Labore in Afrika und Südamerika sind nun in der Lage sein, solche Überprüfungen zur Holzherkunft durchzuführen. Die genetischen Referenzdaten wurden dem „Global Timber Tracking Network (GTTN)“ zugänglich gemacht. Die entwickelten Genmarker wurden in zahlreichen Publikationen der breiten Öffentlichkeit zugänglich gemacht.

3.4 Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Das Hauptziel des Projekts - der Aufbau der genetischen Referenzdaten zur Holzherkunftskontrolle von 14 tropischen Baumarten in Afrika und Südamerika - konnte realisiert werden. Es wurden sogar für 17 Baumarten Referenzdaten generiert. Der Technologietransfer war allerdings, wie im Kapitel 2.1.9 aufgeführt, nur teilweise erfolgreich. Während das Labor in Iquitos

in Peru nun die Ergebnisse und Methoden zur Holzherkunftskontrolle nutzen kann, ist dies im Labor der FORIG in Kumasi (Ghana) nur eingeschränkt der Fall. Trotz erheblichen zeitlichen und finanziellen Aufwands ist nicht gelungen, am Thünen-Institut für Agrarklimaschutz routinemäßig für vier stabile Isotope Holzuntersuchungen durchzuführen. Dies gelingt bisher nur für zwei stabile Isotope (C, N).

3.5 Präsentationsmöglichkeiten

Im Laufe des Projekts wurden mehrere Seminare und Konferenzen zu den Projektergebnissen und zur Methode der Holzherkunftsidentifizierung mit externen Teilnehmern aus Wissenschaft, Forst- und Holzwirtschaft und den Ministerien in den tropischen Zielländern durchgeführt:

- 02.03.2015 - 06.03.2015, Kumasi, Ghana
- 20.04.2015 - 24.04.2015, Iquitos, Peru
- 11.04.2016 - 15.04.2016, Piracicaba, Brasilien
- 24.01.2017 - 30.01.2017, Kourou, Französisch Guayana
- 27.04.2017 - 30.04.2017, Lima, Peru
- 06.11.2018 - 08.11.2018, Iquitos, Peru
- 11.02.2019 – 13.02.2019, Accra, Ghana

Am Ende des Projekts fand vom 03.-04.12.2019 in Ahrensburg (Deutschland) eine Abschlusstagung zu den Projektergebnissen statt.

3.6 Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung

Ursprünglich war eine Projektlaufzeit vom 01.10.2014 bis 31.12.2017 geplant. Es sollten dabei Ausgaben in Höhe von 2.582 Millionen Euro entstehen. Tatsächlich lief das Projekt zwei Jahre länger bis zum 31.12.2019 und es wurden ca. 2 Millionen Euro mehr ausgegeben als ursprünglich geplant. Mindestens einmal jährlich wurden die Zeit- und Kostenpläne in Absprache mit dem Projektträger angepasst.

Die Hauptgründe für die deutlich längere Projektlaufzeit waren:

1. Für die Stichprobennahme in Afrika und Südamerika hatten wir deutlich mehr Zeit benötigt als ursprünglich geplant. Unsere Nachschulungen vor Ort und regelmäßige Kontrollbesuche erbrachten den gewünschten Effekt, so dass die Qualität der meisten Proben zufriedenstellend war und die Informationen zu den Proben (Baumart, geographische Koordinaten) am Ende richtig waren. Die Probennahme konnte erst im Jahr 2017 abgeschlossen werden. Einige Beprobungen mussten mehrfach durchgeführt werden, da z. B. Material bei der Zollabfertigung im Kongo „verloren“ ging.
2. Mit den Projektpartnern in Peru und Brasilien hatten wir vereinbart, dass die DNA-Extraktion der Proben aus diesen Ländern vor Ort erfolgen sollte. Ein wichtiger Grund hierfür waren Ausfuhrbeschränkungen für das Probenmaterial. Die DNA-Qualität der Proben aus Brasilien und anfangs auch aus Peru war jedoch unzureichend – sodass dort mehrere Vorortschulungen durch erfahrenes Personal des Thünen-Instituts durchgeführt werden mussten.
3. Die verspätete Bereitstellung der Proben verzögerte alle folgenden Schritte. Der Projektpartner INRA-Bordeaux konnte aus Kapazitätsgründen das genetische

Screening nicht im Jahr 2017 vollständig abschließen und benötigt dafür noch bis Anfang 2019.

4. In ähnlicher Weise verspäten sich die Arbeiten für die Entwicklung von Genmarkern für das vereinfachte Screening und das entsprechende Training des Personals in den Referenzlaboren in Kumasi (Ghana) und Iquitos (Peru). Die Arbeiten des australischen Partners zur Genmarkerentwicklung mit einem alternativen Verfahren hatten sich auch erheblich verzögert, sodass auch Anfang 2018 das zusätzliche genetische Screening durch dieses Team noch nicht abgeschlossen werden konnte.
5. Im Laufe des Projekts hatten sich drei sinnvolle inhaltliche Ergänzungen zu den ursprünglichen Projektzielen ergeben:
 - a. Mit Hilfe von Untersuchungen an stabilen Isotopen und den SNP-Genmarkern sollte in drei Pilotstudien die Genauigkeit der Holzherkunftskontrolle auf der kleineren räumlichen Ebene von Forstkonzessionen getestet werden (SmallScale)
 - b. Für die beiden Baumarten *Carapa guianensis* und *Hymenaea courbaril* bauten wir für das Land Brasilien Referenzdaten mit vier stabilen Isotopen zur Holzherkunftskontrolle auf. Die Genauigkeit der Isotopenmethode sollte hierbei mit der der genetischen Untersuchungen verglichen werden.
 - c. Bei den Baumarten in Südamerika hatten wir für mehrere Gattungen erhebliche Probleme, das Probenmaterial eindeutig einer Baumart zuzuordnen. Diese mangelnde Zuordnung hat großen Einfluss auf die Genauigkeit der genetischen Referenzdaten für die Holzherkunftskontrolle. Daher führten wir für die Baumgattungen *Hymenaea* und *Handroanthus* in erheblichen Umfang zusätzliche Arbeiten bei der DNA-Sequenzierung und der anschließenden Entwicklung von SNP-Genmarkern durch. Hierdurch konnte für diese Gattungen die Artzuordnung deutlich verbessert werden.

Der Mehraufwand bei der Stichprobennahme und Schulung des Personals sowie die genannten drei zusätzlichen Arbeiten führten zu den Mehrausgaben.

4 Kurzfassung

Zielsetzung

Hauptziel des Vorhabens war es, für sieben Baumarten in Afrika und für sieben Baumarten in Lateinamerika genetische Referenzdaten zur Holzherkunftsbestimmung aufzubauen. Ferner sollte das Projekt zum Technologietransfer mit zusätzlicher Ausrüstung sowie durch Ausbildung von Personal das genetische Labor des „Forest Research Institute of Ghana“ (FORIG in Kumasi und das Labor des „Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana“ (IIAP) in Iquitos Peru unterstützen. In ergänzenden Pilotstudien sollte die Genauigkeit der genetischen Holzherkunftskontrolle und der Herkunftskontrolle mit Hilfe von stabilen Isotopen auf der kleineren räumlichen Ebene von Forstkonzessionen untersucht werden. Für Proben zweier Baumarten (*Carapa guianensis*, *Hymenaea courbaril*) aus Brasilien sollten zusätzlich zu den genetischen Referenzdaten auch Referenzdaten zur Holzherkunftskontrolle anhand von vier stabilen Isotopen aufgebaut werden. Schließlich sollten mit Hilfe umfangreicher DNA-Sequenzierarbeiten Genmarker zur besseren Artunterscheidung in den Baumgattungen *Handroanthus* und *Hymenaea* erarbeitet werden.

Das Vorhaben wurde im Zeitraum vom 01.10.2014 bis 31.12.2019 vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) im Rahmen des Förderbereichs „Internationale nachhaltige Waldwirtschaft“ finanziert. An dem Projekt nahmen Partner aus vier europäischen, acht afrikanischen und vier lateinamerikanischen Ländern teil.

Ergebnisse

Insgesamt sammelten wir in Kooperation mit den Projektpartnern von über 18.000 Bäumen Referenzproben. Hinzu kamen nochmal rund 1000 Proben für den Blindtest. Die DNA-Sequenzierarbeiten lieferten für jede Baumart mehrere Tausend Einzelnukleotid-Genmarker (SNPs). Hiervon testeten wir für jede Art in einem ersten Screening zwischen 195 und 482 SNPs an rund 100 Referenzproben. Für das genetische Screening wählten wir dann für jede Baumart zwischen 84 und 136 SNPs aus. So erstellten wir für neun Baumarten in Afrika (*Aucoumea klaineana*, *Cylicodiscus gabunensis*, *Entandrophragma utile*, *Khaya anthotheca*, *Khaya ivorensis*, *Khaya grandifoliola*, *Khaya senegalensis*, *Lophira alata*, *Nauclea diderrichii*) und acht Baumarten bzw. Gattungen in Südamerika (*Carapa* sp., *Cedrela* sp., *Dipteryx* sp., *Handroanthus* sp., *Hymenaea* sp., *Jacaranda copaia*, *Simarouba amara*, *Swietenia macrophylla*) genetische Referenzdaten zur Holzherkunftskontrolle. Für alle Baumarten fanden wir an den SNPs signifikante genetische Unterschiede zwischen verschiedenen geographischen Gebieten. Die gefundenen genetischen Gruppen deckten sich allerdings nur zu einem geringen Teil mit den politischen Grenzen von Ländern. Als Maß für die Brauchbarkeit der genetischen Referenzdaten für die Holzherkunftskontrolle führten wie Selbstzuordnungstests (self-assignment) durch. Auf der Ebene der Länder variierte die erfolgreiche Zuordnung mit einem Mittelwert von 71% je nach Baumart und Land sehr stark. Auf der Ebene der Regionen hatten wir für die erfolgreiche Selbstzuordnung einen Mittelwert von 83%. Daher muss bei der Anwendung der genetischen Referenzdaten zur Holzherkunftskontrolle die unterschiedliche Genauigkeit je nach Baumart und Zielregion berücksichtigt werden.

Für mehrere Gattungen erarbeiteten wir hochinformativ Genmarker zur Artunterscheidung (*Khaya*, *Dipteryx*, *Cedrela*, *Handoanthus* und *Hymenaea*). Diese Genmarker wurden für ein vereinfachtes Verfahren (Snap-Shot-Methode) weiterentwickelt, so dass sie in den beiden Laboren IIAP (Peru) und FORIG (Ghana) mit den dortigen DNA-Sequenzierern analysiert werden können.

Der britische Projektpartner (CEH) koordinierte den Blindtest. Dabei wurden rund 1000 Proben der Zielbaumarten mit teils falschen Herkunftsangaben (26% mit falschen Angaben zum

Ursprungsland, 45% mit falschen Angaben zum Ort im richtigen Land) zur genetischen Untersuchung an das Thünen-Institut geschickt. Das Probenmaterial beinhaltete hierbei verschiedene Gewebearten (Holz, Blatt, Kambium), um auch Effekte aufgrund unterschiedlicher DNA-Qualität abschätzen zu können. Die genetischen Untersuchungen im Blindtest führten bei den Holzproben in 92%, bei den Kambiumproben in 90% und bei den Blattproben in 87% der Fälle zu einer richtigen Bewertung bezüglich des deklarierten Ursprungslandes.

Jeweils mit den beiden stabilen Isotopen C und N und mit SNPs wurde die Genauigkeit der Zuordnung von Holzproben zu Forstkonzessionen in Peru für *Dipteryx ferrea*, in Brasilien für *Hymenaea* und für *Lophira alata* in Kamerun an 100 bis 190 Proben je Art getestet (SmallScale). Das Material stammte dabei jeweils zum größten Teil aus einer ca. 50 km x 50 km großen Zielregion und zwei anderen Orten: jeweils ein Ort im Abstand von weniger als 100 km und ein Ort mit einem Abstand von deutlich über 100 km zu der Zielregion. In Brasilien konnten jedoch nur zwei Bereiche derselben Forstkonzession mit einem Abstand von 70 km voneinander untersucht werden. Die Erfolgsraten lagen bei den stabilen Isotopen dabei für *Dipteryx* bei 52%, für *Hymenaea* bei 38% und bei *Lophira* bei 52% und für die SNPs erhielten wir Werte von 60%, 58% und 73%. Zumindest mit nur zwei Isotopen war der Ansatz damit zu ungenau. Die Ergebnisse der genetischen Untersuchung mit SNPs zeigten, dass eine sichere Trennung von Proben nur möglich war, wenn diese mehr als 100km voneinander entfernt beprobt wurden.

Bessere Ergebnisse als die SmallScale-Isotopenuntersuchung lieferte die landesweite Studie in Brasilien für die beiden Arten *Carapa guianensis* und *Hymenaea courbaril*. Hierbei wurden je Baumart 150 Proben aus fünf bzw. sechs unterschiedlichen Regionen in Brasilien an den vier Isotopen C, N, H und O untersucht. Die Erfolgsquote bei der Selbstzuordnung für diese Regionen lag im Mittel bei 59% für *Carapa guianensis* und für *Hymenaea courbaril* bei 54%. Eine Varianzanalyse ergab, dass die stabilen Isotope O und N besonders deutliche geographische Unterschiede aufzeigten, während beim Wasserstoff (H) Artunterschiede auffällig waren. C-Isotope trugen kaum zu einer räumlichen Unterscheidung bei.

Technologietransfer

Zur Unterstützung der beiden Labore IIAP in Iquitos (Peru) und FORIG in Kumasi (Ghana) wurden in die Beschaffung von Laborausrüstung und Chemikalien investiert. Zu den größten Posten gehörten die Bereitstellung einer Solaranlage zur Sicherung der Stromversorgung und ein DNA-Sequenzierer in Kumasi. Die Schulung des Personals erfolgte in Form von Trainingsworkshops vor Ort. Neben den Schulungen vor Ort bildeten wir am Thünen-Institut und beim Projektpartner CEH in Großbritannien und an der Universität Adelaide (Australien) insgesamt acht Personen aus.

5 Abstract

Objectives

The main objective of the project was the development of genetic reference data for timber tracking of seven tropical tree species in Africa and seven tree species in South-America. The technology transfer was another objective. For this the lab of the „Forest Research Institute of Ghana” (FORIG) in Kumasi (Ghana) and the lab of the „Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana” (IIAP) in Iquitos (Peru) have been supported with lab equipment, lab consumables and training of staff. Additional pilot studies should check the accuracy of timber tracking on the level of forest concessions using genetic data and data on stable isotopes. Another pilot study with samples of the two tree species *Carapa guianensis* and *Hymenaea courbaril* should test the performance of stable isotopes for timber tracking on the country level of Brazil. Finally intensive Next-Generation-DNA-Sequencing should be applied in order to develop gene markers for a better tree species identification within the tree genera *Handroanthus* and *Hymenaea*.

In the period 01/10/2014 to 31/12/2019 the German Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) financially supported the project as part of the program “International sustainable Forestry”. Partners from four European, eight African and four Latin-American countries contributed to the project.

Results

We collected together with the project partner reference samples of 18,000 trees. In addition about 1000 samples were sampled for the blind test. By Next-Generation-Sequencing we got for each tree species several thousand Single-Nucleotide-Polymorphisms (SNPs). From them we selected per species between 195 to 482 SNPs for a pre-screening of about 100 samples. Using these results we selected per species between 84 and 136 SNPs for the genetic screening of all reference samples. In this way we generated genetic reference data for timber tracking of nine tree species in Africa (*Aucoumea klaineana*, *Cylicodiscus gabunensis*, *Entandrophragma utile*, *Khaya anthotheca*, *Khaya ivorensis*, *Khaya grandifoliola*, *Khaya senegalensis*, *Lophira alata*, *Nauclea diderrichii*) and eight tree species or genera in South-America *Carapa* sp., *Cedrela* sp., *Dipteryx* sp., *Handroanthus* sp., *Hymenaea* sp., *Jacaranda copaia*, *Simarouba amara*, *Swietenia macrophylla*). We observed for all tree species significant genetic differences among various geographic regions. But these genetic groups did not fit very well with the country borders. We applied self-assignment tests to check the performance of the genetic reference data for timber tracking. We found a mean success-rate of 71% on the country level. But there was a strong variation among species and countries. Further we got a mean success-rate of self-assignment of 83% for regions. Thus the application of the genetic reference data for timber tracking should consider the different precision of the method depending on the tree species and target region.

We developed highly informative gene markers for tree species identification for five genera (*Khaya*, *Dipteryx*, *Cedrela*, *Handoanthus* und *Hymenaea*). These gene markers have been adapted for the application with a simple screening method (Snap-Shot approach). So the gene markers can be applied using the DNA-sequencer at the two supported labs of FORIG in Ghana and IIAP in Peru.

The British partner CEH coordinated the blind test. CEH sent about 1000 samples of the project target species together with correct and false declarations on the origin to the Thünen-Institute for the genetic testing. 26% of the declarations had false information on the country of origin and 45% had wrong statements on the location within the countries of origin. The samples consisted of different tissue types (wood, leaves, cambium). This should enable to identify the potential error rate caused by different DNA-qualities. The genetic screening came out with 92% correct results

on the justification on the declarations of origin for the wood samples and 87% for the leaf-material.

We used the two stable isotopes C and N and the SNP-gene markers to check the performance of timber tracking on the level of forest concessions (SmallScale). This was done for *Dipteryx ferrea* in Peru, *Hymenaea* in Brazil and *Lophira alata* in Cameroon. For each species between 100 and 190 samples have been analysed. The samples came for each species from a target forest concession (50 km x 50 km area) and from two other locations: one location within a radius of 100 km and another one farer away (distance > 100 km). In Brazil the samples could only be collected at two locations with a distance of about 70 km within the same forest concession. For the stable isotopes we got success-rates of self-assignment of 52% for *Dipteryx*, 38% for *Hymenaea* and 52% for *Lophira* with the stable isotopes and 60%, 58% and 73% for the SNPs. Thus two stable isotopes were not sufficient for timber tracking on this scale. The genetic analysis could successfully distinguish the samples that were more than 100km apart. But samples that were collected within a radius of 100km could not securely assigned.

We observed a better performance of stable isotopes for timber tracking on the country level in a case study for the two tree species *Carapa guianensis* and *Hymenaea courbaril* in Brazil. In this study samples of 150 trees from five and six geographic regions in Brazil have been collected for each of the two species. The samples were analyzed at the four stable isotopes C, N, H and O. We found a success rate of self-assignment of 59% for *Carapa guianensis* and 54% for *Hymenaea courbaril*. An analysis of variance came up with a strong geographic pattern for the stable isotopes O and N. Hydrogen (H) showed strong differences among tree species and C had nearly no geographic pattern.

Technology transfer

We supported the two labs IIAP in Iquitos (Peru) and FORIG in Kumasi (Ghana) with lab equipment and lab consumables. The biggest investment was a solar system with batteries for power supply and a DNA-sequencer for the lab in Kumasi. The staff has been trained in serval involved countries and a total of eight persons were trained at the Thünen-Institute, CEH in the UK and at the University of Adelaide (Australia).

6 Literaturverzeichnis

- Besnard, G., F. Juhling, E. Chapuis, L. Zedane, E. Lhuillier, T. Mateille, and S. Bellaifiore. 2014. Fast assembly of the mitochondrial genome of a plant parasitic nematode (*Meloidogyne graminicola*) using next generation sequencing. *Comptes Rendus Biologies* **337**:295-301.
- Blanc-Jolivet, C., Y. Yanbaev, B. Kersten, and B. Degen. 2018. A set of SNP markers for timber tracking of *Larix* spp. in Europe and Russia. *Forestry* **91**:614-628.
- Chaves, C. L., C. Blanc-Jolivet, A. M. Sebbenn, M. Mader, B. R. V. Meyer-Sand, K. Paredes-Villanueva, E. N. Honorio Coronado, C. Garcia-Davila, N. Tysklind, V. Troispoux, M. Massot, and B. Degen. 2018. Nuclear and chloroplastic SNP markers for genetic studies of timber origin for *Hymenaea* trees. *Conservation Genetics Resources*.
- Craig, H., and L. I. Gordon. 1965. Deuterium and oxygen 18 variations in the ocean and the marine atmosphere.
- Cullings, K. W. 1992. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology* **1**:233-240.
- de Medeiros, B. A. S., and B. D. Farrell. 2018. Whole-genome amplification in double-digest RADseq results in adequate libraries but fewer sequenced loci. *PeerJ* **6**:27.
- Degen, B., C. Blanc-Jolivet, K. Stierand, and E. Gillet. 2017. A nearest neighbour approach by genetic distance to the assignment of individual trees to geographic origin. *Forensic Science International-Genetics* **27**:132-141.
- Degen, B., and H. Bouda. 2015. Verifying timber in Africa. *ITTO Trop Forest Update* **24**:8-10.
- Degen, B., S. E. Ward, M. R. Lemes, C. Navarro, S. Cavers, and A. M. Sebbenn. 2013. Verifying the geographic origin of mahogany (*Swietenia macrophylla* King) with DNA-fingerprints. *Forensic Science International-Genetics* **7**:55-62.
- Dormontt, E. E., M. Boner, B. Braun, G. Breulmann, B. Degen, E. Espinoza, S. Gardner, P. Guillery, J. C. Hermanson, G. Koch, S. L. Lee, M. Kanashiro, A. Rimbawanto, D. Thomas, A. C. Wiedenhoeft, Y. F. Yin, J. Zahnen, and A. J. Lowe. 2015. Forensic timber identification: It's time to integrate disciplines to combat illegal logging. *Biological Conservation* **191**:790-798.
- Efron, B. 1983. ESTIMATING THE ERROR RATE OF A PREDICTION RULE - IMPROVEMENT ON CROSS-VALIDATION. *Journal of the American Statistical Association* **78**:316-331.
- Espinoza, E. O., M. C. Wiemann, J. Barajas-Morales, G. D. Chavarria, and P. J. McClure. 2015. FORENSIC ANALYSIS OF CITES-PROTECTED DALBERGIA TIMBER FROM THE AMERICAS. *Iawa Journal* **36**:311-325.
- Evanno, G., S. Regnaut, and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**:2611-2620.
- Evans, P. D., I. A. Mundo, M. C. Wiemann, G. D. Chavarria, P. J. McClure, D. Voin, and E. O. Espinoza. 2017. Identification of selected CITES-protected *Araucariaceae* using DART TOFMS. *Iawa Journal* **38**:266-+.
- Förstel, H., M. Boner, A. Höltnen, M. Fladung, B. Degen, and J. Zahnen. 2011. Fighting illegal logging through the introduction of a combination of the isotope method for identifying the origins of timber and DNA analysis for differentiation of tree species. *Deutsche Bundesstiftung Umwelt*.
- Garcia-Davila, C., D. A. Gomero, J. F. Renno, R. D. Soria, G. H. Pizango, G. F. Llampazo, D. Castro-Ruiz, E. M. de Loayza, C. A. Chavez, M. Mader, N. Tysklind, K. Paredes-Villanueva, D. D. Torres, B. Degen, and E. N. H. Coronado. 2020. Molecular evidence for three genetic species of *Dipteryx* in the Peruvian Amazon. *Genetica* **148**:1-11.
- Gori, Y., R. Wehrens, N. La Porta, and F. Camin. 2015. Oxygen and Hydrogen Stable Isotope Ratios of Bulk Needles Reveal the Geographic Origin of Norway Spruce in the European Alps. *Plos One* **10**:14.

- Gregorius, H. R. 1987. THE RELATIONSHIP BETWEEN THE CONCEPTS OF GENETIC DIVERSITY AND DIFFERENTIATION. *Theoretical and Applied Genetics* **74**:397-401.
- Hammer, Ø., D. A. Harper, and P. D. Ryan. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica* **4**:9.
- Hartvig, I., T. So, S. Changtragoon, H. T. Tran, S. Bouamanivong, R. Ogden, H. Senn, F. G. Vieira, F. Turner, R. Talbot, I. Theilade, L. R. Nielsen, and E. D. Kjaer. Conservation genetics of the critically endangered Siamese rosewood (*Dalbergia cochinchinensis*): recommendations for management and sustainable use. *Conservation Genetics*:16.
- Hayes, J. M. 2004. An introduction to isotopic calculations. Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, MA **2543**.
- Holtken, A. M., H. Schroder, N. Wischniewski, B. Degen, E. Magel, and M. Fladung. 2012. Development of DNA-based methods to identify CITES-protected timber species: a case study in the Meliaceae family. *Holzforschung* **66**:97-104.
- Honorio Coronado, E. N., C. Blanc-Jolivet, M. Mader, C. R. García-Dávila, A. M. Sebbenn, B. R. V. Meyer-Sand, K. Paredes-Villanueva, N. Tysklind, V. Troispoux, M. Massot, and B. Degen. 2019. Development of nuclear and plastid SNP markers for genetic studies of *Dipteryx* tree species in Amazonia. *Conservation Genetics Resources*.
- Horacek, M., G. Rees, M. Boner, and J. Zahnen. 2018. Comment on: Developing forensic tools for an African timber: ... , by Vlam et al., 2018. *Biological Conservation* **226**:333-334.
- Hosoya, S., S. Hirase, K. Kikuchi, K. Nanjo, Y. Nakamura, H. Kohno, and M. Sano. 2019. Random PCR-based genotyping by sequencing technology GRAS-Di (genotyping by random amplicon sequencing, direct) reveals genetic structure of mangrove fishes. *Molecular Ecology Resources* **19**:1153-1163.
- Hung, K.-H., C.-H. Lin, and L.-P. Ju. 2017. Tracking the geographical origin of timber by DNA fingerprinting: a study of the endangered species *Cinnamomum kanehirae* in Taiwan. *Holzforschung* **71**:853-862.
- Janes, J. K., J. M. Miller, J. R. Dupuis, R. M. Malenfant, J. C. Gorrell, C. I. Cullingham, and R. L. Andrew. 2017. The K=2 conundrum. *Molecular Ecology* **26**:3594-3602.
- Jardine, D. I., C. Blanc-Jolivet, R. R. M. Dixon, E. E. Dormontt, B. Dunker, J. Gerlach, B. Kersten, K. J. van Dijk, B. Degen, and A. J. Lowe. 2016. Development of SNP markers for Ayous (*Triplochiton scleroxylon* K. Schum) an economically important tree species from tropical West and Central Africa. *Conservation Genetics Resources* **8**:129-139.
- Jolivet, C., and B. Degen. 2012. Use of DNA fingerprints to control the origin of sapelli timber (*Entandrophragma cylindricum*) at the forest concession level in Cameroon. *Forensic Science International-Genetics* **6**:487-493.
- Kopelman, N. M., J. Mayzel, M. Jakobsson, N. A. Rosenberg, and I. Mayrose. 2015. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources* **15**:1179-1191.
- Lowe, A. J., E. E. Dormontt, M. J. Bowie, B. Degen, S. Gardner, D. Thomas, C. Clarke, A. Rimbawanto, A. Wiedenhoef, Y. F. Yin, and N. Sasaki. 2016. Opportunities for Improved Transparency in the Timber Trade through Scientific Verification. *Bioscience* **66**:990-998.
- Mader, M., B. Pakull, C. Blanc-Jolivet, M. Paulini-Drewes, Z. H. N. Bouda, B. Degen, I. Small, and B. Kersten. 2018. Complete Chloroplast Genome Sequences of Four Meliaceae Species and Comparative Analyses. *International Journal of Molecular Sciences* **19**:14.
- Maroso, F., J. E. J. Hillen, B. G. Pardo, K. Gkagkavouzis, I. Coscia, M. Hermida, R. Franch, B. Hellemans, J. Van Houdt, B. Simionati, J. B. Taggart, E. E. Nielsen, G. Maes, S. A. Ciavaglia, L. M. I. Webster, F. A. M. Volckaert, P. Martinez, L. Bargelloni, R. Ogden, and C. AquaTrace. 2018. Performance and precision of double digestion RAD (ddRAD) genotyping in large multiplexed datasets of marine fish species. *Marine Genomics* **39**:64-72.

- McKernan, K., C. Fujii, J. Ziauddin, J. Malek, and P. McEwan. 2002. A high throughput and accurate method for SNP genotyping using Sequenom MassARRAY (TM) system. *American Journal of Human Genetics* **71**:454-454.
- Meyer-Sand, B. R. V., C. Blanc-Jolivet, M. Mader, K. Paredes-Villanueva, N. Tysklind, A. M. Sebbenn, E. Guichoux, and B. Degen. 2018. Development of a set of SNP markers for population genetics studies of Ipe (*Handroanthus* sp.), a valuable tree genus from Latin America. *Conservation Genetics Resources* **10**:779-781.
- Miller, M. R., J. P. Dunham, A. Amores, W. A. Cresko, and E. A. Johnson. 2007. Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. *Genome Research* **17**:240-248.
- Neale, D. B., and A. Kremer. 2011. Forest tree genomics: growing resources and applications. *Nature Reviews Genetics* **12**:111-122.
- Ng, C. H., S. L. Lee, L. H. Tnah, K. K. S. Ng, C. T. Lee, B. Diway, and E. Khoo. 2017. Geographic origin and individual assignment of *Shorea platyclados* (Dipterocarpaceae) for forensic identification. *Plos One* **12**.
- Ng, C. H., K. K. S. Ng, S. L. Lee, L. H. Tnah, C. T. Lee, and N. F. Zakaria. 2020. A geographical traceability system for Merbau (*Intsia palembanica* Miq.), an important timber species from peninsular Malaysia. *Forensic Science International-Genetics* **44**:10.
- Ng, K. K. S., S. L. Lee, L. H. Tnah, Z. Nurul-Farhanah, C. H. Ng, C. T. Lee, N. Tani, B. Diway, P. S. Lai, and E. Khoo. 2016. Forensic timber identification: a case study of a CITES listed species, *Gonystylus bancanus* (Thymelaeaceae). *Forensic Science International-Genetics* **23**:197-209.
- Nuroniah, H. S., O. Gailing, and R. Finkeldey. 2017. Development of a diagnostic DNA marker for the geographic origin of *Shorea leprosula*. *Holzforschung* **71**:1-10.
- Paetkau, D., W. Calvert, I. Stirling, and C. Strobeck. 1995. MICROSATELLITE ANALYSIS OF POPULATION-STRUCTURE IN CANADIAN POLAR BEARS. *Molecular Ecology* **4**:347-354.
- Pakull, B., M. R. M. Ekue, U. G. B. Dipelet, C. Doumenge, D. B. McKey, J. J. Loumeto, E. Opuni-Frimpong, S. N. Yorou, B. M. Y. Nacoulma, K. A. Guelly, L. Ramamonjisoa, D. Thomas, E. Guichoux, J. Loo, and B. Degen. 2019. Genetic diversity and differentiation among the species of African mahogany (*Khaya* spp.) based on a large SNP array. *Conservation Genetics* **20**:1035-1044.
- Pakull, B., M. Mader, B. Kersten, M. R. M. Ekue, U. G. B. Dipelet, M. Paulini, Z. H. N. Bouda, and B. Degen. 2016. Development of nuclear, chloroplast and mitochondrial SNP markers for *Khaya* sp. *Conservation Genetics Resources* **8**:283-297.
- Paredes-Villanueva, K., E. Espinoza, J. Ottenburghs, M. G. Sterken, F. Bongers, and P. A. Zuidema. 2018. Chemical differentiation of Bolivian *Cedrela* species as a tool to trace illegal timber trade. *Forestry* **91**:603-613.
- Piry, S., A. Alapetite, J.-M. Cornuet, D. Paetkau, L. Baudouin, and A. Estoup. 2004. GENECLASS2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity* **95**:536-539.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**:945-959.
- Pujolar, J. M., M. W. Jacobsen, T. D. Als, J. Frydenberg, E. Magnussen, B. Jonsson, X. Jiang, L. Cheng, D. Bekkevold, G. E. Maes, L. Bernatchez, and M. M. Hansen. 2014. Assessing patterns of hybridization between North Atlantic eels using diagnostic single-nucleotide polymorphisms. *Heredity* **112**:627-637.
- Qi, H. P., T. B. Coplen, and J. A. Jordan. 2016. Three whole-wood isotopic reference materials, USGS54, USGS55, and USGS56, for delta H-2, delta O-18, delta C-13, and delta N-15 measurements. *Chemical Geology* **442**:47-53.

- Rachmayanti, Y., L. Leinemann, O. Gailing, and R. Finkeldey. 2009. DNA from processed and unprocessed wood: Factors influencing the isolation success. *Forensic Science International-Genetics* **3**:185-192.
- Rannala, B., and J. L. Mountain. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:9197-9201.
- Savard, M. M., C. Bégin, A. Smirnoff, J. I. Marion, and E. Rioux-Paquette. 2009. Tree-ring nitrogen isotopes reflect anthropogenic NO_x emissions and climatic effects. *Environmental science & technology* **43**:604-609.
- Schroeder, H., R. Cronn, Y. Yanbaev, T. Jennings, M. Mader, B. Degen, and B. Kersten. 2016. Development of Molecular Markers for Determining Continental Origin of Wood from White Oaks (*Quercus* L. sect. *Quercus*). *Plos One* **11**:15.
- Sebbenn, A. M., C. Blanc-Jolivet, M. Mader, B. R. V. Meyer-Sand, K. Paredes-Villanueva, E. N. H. Coronado, C. Garcia-Davila, N. Tysklind, V. Troispoux, A. Delcamp, and B. Degen. 2019. Nuclear and plastidial SNP and INDEL markers for genetic tracking studies of *Jacaranda copaia*. *Conservation Genetics Resources* **11**:341-343.
- Straub, S. C. K., M. Parks, K. Weitemier, M. Fishbein, R. C. Cronn, and A. Liston. 2012. NAVIGATING THE TIP OF THE GENOMIC ICEBERG: NEXT-GENERATION SEQUENCING FOR PLANT SYSTEMATICS. *American Journal of Botany* **99**:349-364.
- Tnah, L. H., S. L. Lee, K. K. S. Ng, S. Bhassu, and R. Y. Othman. 2012. DNA extraction from dry wood of *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae) for forensic DNA profiling and timber tracking. *Wood Science and Technology* **46**:813-825.
- Tysklind, N., C. Blanc-Jolivet, M. Mader, B. R. V. Meyer-Sand, K. Paredes-Villanueva, E. N. Honorio Coronado, C. R. García-Dávila, A. M. Sebbenn, H. Caron, V. Troispoux, E. Guichoux, and B. Degen. 2019. Development of nuclear and plastid SNP and INDEL markers for population genetic studies and timber traceability of *Carapa* species. *Conservation Genetics Resources*.
- Urey, H. C. 1948. OXYGEN ISOTOPES IN NATURE AND IN THE LABORATORY. *Science* **108**:489-496.
- Vanden Abeele, S., O. J. Hardy, H. Beeckman, B. A. Ilondea, and S. B. Janssens. 2019. Genetic Markers for Species Conservation and Timber Tracking: Development of Microsatellite Primers for the Tropical African Tree Species *Prioria balsamifera* and *Prioria oxyphylla*. *Forests* **10**.
- Vlam, M., G. A. de Groot, A. Boom, P. Copini, I. Laros, K. Veldhuijzen, D. Zakamdi, and P. A. Zuidema. 2018. Developing forensic tools for an African timber: Regional origin is revealed by genetic characteristics, but not by isotopic signature. *Biological Conservation* **220**:262-271.
- Wassenaar, L., and K. Hobson. 2003. Comparative equilibration and online technique for determination of non-exchangeable hydrogen of keratins for use in animal migration studies. *Isotopes in Environmental and Health Studies* **39**:211-217.
- Weir, B. S., and C. C. Cockerham. 1984. ESTIMATING F-STATISTICS FOR THE ANALYSIS OF POPULATION-STRUCTURE. *Evolution* **38**:1358-1370.