



DIESER PROJEKT-
BERICHT IST ERGEBNIS
DER ZUSAMMENARBEIT
VON:



Projektabschlussbericht

Bekämpfung des illegalen Holzeinschlags durch Einführung einer Kombination der Isotopenmethode zur Herkunftsidentifizierung von Holz und der DNA-Analyse zur Artdifferenzierung von Holz

Projektnummer: AZ 26452/31

Gefördert durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt

Projektpartner:



TÜVRheinland®

agrois[®]lab

Genau. Richtig.



Universität Hamburg

Herausgeber: WWF Deutschland, Berlin

in Kooperation mit:

- TÜV Rheinland Agroisolab GmbH, Jülich
- Universität Hamburg; Institut für Weltforstwirtschaft
- Johann Heinrich von Thünen-Institut

Autoren: Prof. Hilmar Förstel, TÜV Rheinland Agroisolab GmbH

Dr. Markus Boner, TÜV Rheinland Agroisolab GmbH

Dr. Aki M. Höltnen Universität Hamburg

Dr. Matthias Fladung, Johann Heinrich von Thünen-Institut

Dr. Bernd Degen, Johann Heinrich von Thünen-Institut

Johannes Zahnen, WWF Deutschland

Redaktion: Johannes Zahnen, WWF Deutschland

Inhaltsverzeichnis

1	Anlass und Zielsetzung des Projekts	5
2	Antragsteller und Projektpartner	6
3	Kurzfassung des Projekts	8
4	Probennahme	10
4.1	Teak (<i>Tectona grandis</i>)	10
4.2	Mahagoni.....	10
4.3	MTA (Material Transfer Agreement)	12
5	Überprüfung der deklarierten Herkunft mittels Isotopenmethode (Prof. Hilmar Förstel, Dr. Markus Boner)	14
5.1	Grundlagen der stabilen Isotope.....	14
5.1.1	Begriff der stabilen Isotope	14
5.1.2	Messnotation	15
5.1.3	Internationale Referenz-Standards	16
5.1.4	Messung der stabilen Isotope	17
5.2	Anwendung der Stabilen Isotope zum Nachweis der geographischen Herkunft	18
5.2.1	Grundlagen der D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse.....	18
5.2.2	Grundlagen der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse	19
5.2.3	Grundlagen der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse.....	20
5.2.4	Grundlagen der $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse	20
5.2.5	Grundlagen der $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ Isotopenverhältnisse	20
5.3	Probennahmekonzept und Probenaufbereitung.....	21
5.3.1	Konzept der Probennahme der Holzproben	21
5.3.2	Aufarbeitung der Holzproben für die Stabil-Isotopen-Analytik	24
5.4	Ergebnisse der Isotopenverhältnisse von Teak	25
5.4.1	Detailanalyse Java	26

5.4.1.1	D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse in Java	26
5.4.1.2	Die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ und $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ Isotopenverhältnisse in Java	30
5.4.1.3	Die $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse in Java.....	31
5.4.1.4	Schwankungsbreite der D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse an den verschiedenen Beprobungsorten	32
5.4.2	Differenzierung von Teak aus Asien insbesondere Java, Birma, Laos und Indien.....	34
5.4.3	Weitergehende Differenzierung von Teak aus Asien unter Berücksichtigung von Indien und Indonesien, Papa-Neuguinea und Vietnam.....	36
5.4.4	Differenzierung von Teak aus Lateinamerika insbesondere Panama, Costa Rica, Honduras und Brasilien.....	40
5.4.5	Kombination von NIR und Stabil-Isotopen-Methode.....	47
5.4.6	Differenzierung von Teak aus Lateinamerika unter besonderer Berücksichtigung von Teak aus Ghana (Afrika).....	50
5.5	Differenzierung von Mahagoni-Arten aus Lateinamerika	54
5.5.1	Differenzierung von Mahagoni-Arten aus Mittelamerika unter besondere Berücksichtigung von Peru	55
5.5.2	Weitergehende Differenzierung von Mahagoni-Arten aus Mittelamerika unter Berücksichtigung von Kongo, Indien und Ghana	56
5.5.3	Vergleich der D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse von Teak und Mahagoni in einer kleinräumigen Region von Ghana.....	59
6	Artidentifizierung mittels Genmarker (Dr. Aki M. Höltken).....	61
6.1	Einleitung	61
6.2	Konzeptioneller Hintergrund.....	62
6.2.1	Methodische Herausforderungen bei der Analyse von DNA aus Holz	62
6.2.2	Primer-Design: Das komplett sequenzierte Chloroplasten-Genom der Westlichen Balsam-Pappel (<i>Populus trichocarpa</i> Torr. & Gray) als Ausgangsbasis für die Entwicklung von Barcoding-Sequenzen.....	63
6.2.3	Technologie-Transfer: Anpassung der Methoden für einen großen Nutzerkreis	64
6.3	Material und Methoden	66
6.3.1	Pflanzenmaterial.....	66

6.3.2	DNA-Isolierung.....	67
6.3.3	PCR.....	67
6.3.4	Sequenzierung und Sequenzanalyse.....	67
6.4	Ergebnisse Artidentifizierung mittels DNA Marker.....	67
6.4.1	Differenzierung <i>Swietenia</i> sp. – <i>Tectona grandis</i>	67
6.4.2	Differenzierung der nah verwandten Arten <i>Swietenia macrophylla</i> , <i>S. mahagoni</i> und <i>S. humilis</i>	69
6.4.2.1	Sequenzunterschiede.....	69
6.4.2.2	Die Schnelltest-Methode.....	70
7	Blindproben test / Praxistests	71
7.1	Blindproben test zur Überprüfung der deklarierten Herkunft mittels Isotopenmethode.....	71
7.2	Praxistest Isotopenmethode: Verifizierung der deklarierten Herkunft bei beschlagnahmtem Teak.....	73
7.3	Praxistest DNA-Artidentifizierung bei beschlagnahmtem Mahagoni.....	74
8	Internationale Referenz-Datenbank	76
9	Konferenzen	80
9.1	GIZ/WWF - Holz-Fingerprinting Konferenz; Eschborn (11/2010).....	80
9.2	Weltbank - Potomac Forum und WRI/eia – Legal Forest Alliance Meeting (5/2011).....	81
10	Veröffentlichungen und Öffentlichkeitsarbeit.....	82
10.1	Presse.....	82
10.2	Wissenschaftliche Veröffentlichungen.....	82
11	Zusammenfassung und Ausblick.....	84
11.1	Isotopen.....	84
11.2	Artidentifizierung mittels Genmarker.....	85
11.3	Ausblick.....	86
12	Abbildungsverzeichnis.....	87
13	Literatur	90

1 Anlass und Zielsetzung des Projekts

Wälder stabilisieren das ökologische Gleichgewicht unserer Erde. Die weltweite Nutzung und Vernichtung der Wälder schafft daher in mehrfacher Hinsicht ökologische Probleme. Zum einen wird damit Lebensraum vernichtet und das Aussterben von Arten stark beschleunigt. Zum anderen stellt die Abholzung großer Waldflächen einen zusätzlichen und massiven Eingriff in das Klima und in die Stoffkreisläufe dar. Der UN-Klimarat IPCC hat ermittelt, dass 15 bis 20 Prozent des Kohlendioxids weltweit durch die Entwaldung verursacht werden. Die tropischen Länder, in denen der größte Anteil an Wald verloren geht, haben in ihren Ökosystemen auch die höchste Vielfalt an Arten, gerade dort, wo bekanntermaßen der illegale Holzeinschlag diesen Lebensraum vernichtet.

Viele Länder, die Holz- und Holzprodukte nach Deutschland exportieren, haben direkt oder indirekt als Transitländer ein Problem mit illegalem Holz aus z.B. Russland, Südostasien, West- und Zentralafrika oder Südamerika. So ist Indonesien für Deutschland der wichtigste Handelspartner für Holz und seine Produkte außerhalb der EU. Dabei geht die OECD (2007) davon aus, dass rund 73 % des Holzes aus illegalem Einschlag stammen. Indonesien gehört durch den Verlust an Wald zu den größten Kohlendioxid-Emittenten der Welt.

Die Europäische Union hat sich zum Ziel gesetzt, den Import von illegalem Holz zu stoppen. Durch diesen 2003 gestarteten FLEGT-Prozess (Forest Law Enforcement, Governance and Trade), an dem sich auch Deutschland aktiv beteiligt, soll die Zerstörung von Waldregionen u.a. in den Tropen gebremst werden. Zu diesem Zweck wurde ein Aktionsplan gegen illegalen Holzeinschlag und gegen den Handel mit illegal eingeschlagenem Holz erarbeitet. Hierin ist u.a. vorgesehen, Legalitätsnachweise für in die EU importiertes Holz vorzuschreiben. Eine besondere Bedeutung hat dabei ein im Oktober 2010 vom EU-Rat verabschiedetes Holzhandelsgesetz (Verordnung (EU) 995/2010) erlangt. Nach diesem sollen beispielsweise Importeure zukünftig das Ursprungsland des Holzes ihrer Produkte benennen müssen.

Bis jetzt kann die **deklarierte Herkunft** z.B. von Behörden allerdings lediglich über Begleitdokumente und noch nicht über ein unabhängiges Prüfverfahren verifiziert werden. Der WWF sieht hier eine wichtige Lücke, da das Gesetz zwar vorschreibt, dass die Importeure den Ursprung des Holzes kennen müssen, die Umsetzung und die Kontrolle der Vorschrift aber ernsthaft nur dann durchgeführt werden kann, wenn es unabhängige Verfahren zur sicheren Überprüfung der deklarierten Holzherkunft gibt. Die hier beschriebene Isotopenmethode kann hierzu einen international wichtigen Beitrag leisten.

Illegaler Holzeinschlag, insbesondere der Handel mit CITES-geschützten tropischen Holzarten, macht die Entwicklung von eindeutigen **Artidentifikationssystemen** unumgänglich. Die Tatsache, dass viele geschützte Holzarten aufgrund ähnlicher holzanatomischer Eigenschaften sehr leicht mit nicht geschützten Handelshölzern verwechselt werden können, verlangt nach Verfahren, die innerhalb großer Teile der Holzhandelskette einsetzbar sind. Hier stellen die Methoden des genetischen Barcodings eine besonders interessante Möglichkeit dar, denn die DNA ist eine im Holz integrierte und fälschungssichere Informationsquelle.

2 Antragsteller und Projektpartner

Die Antragstellung erfolgte durch:

Umweltstiftung WWF Deutschland

Der WWF Deutschland ist eine unabhängige, gemeinnützige, überparteiliche und rechtsfähige Stiftung des bürgerlichen Rechts mit Sitz in Berlin. Die Adresse lautet:

Umweltstiftung WWF Deutschland;

Reinhardtstraße 14

10117 Berlin

Tel. 030-311777-0

Ansprechpartner ist Johannes Zahnen, Fachbereich Wald (Tel.: 030-311777-252;
e-mail: zahnen@wwf.de)

Projektpartner:

1. TÜV Rheinland Agroisolab GmbH

Die Agroisolab GmbH ist eine Ausgründung aus dem Forschungszentrum Jülich GmbH. Sie entstammt der Forschungsgruppe „Stabile Isotope“ unter der Leitung von Prof. Dr. H. Förstel, der sich nun seit 25 Jahren mit den verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten der stabilen Isotope beschäftigt.

TÜV Rheinland Agroisolab GmbH

Prof.-Rehm-Str. 6

52428 Jülich

Ansprechpartner ist Dr. M. Boner; Geschäftsführer; (Tel. +49 (2461) 931 34-19;
e-mail: markus.boner@de.tuv.com)

2. Universität Hamburg

Institut für Weltforstwirtschaft

Leuschnerstraße 91

D-21031 Hamburg

Ansprechpartner ist Aki M. Höltnen, (Tel.: +49 (4102) 696161;
e-mail: hoeltken@holz.uni-hamburg.de oder pgd-hoeltken@vodafone.de)

In Zusammenarbeit mit:

Johann Heinrich von Thünen-Institut

Institut für Forstgenetik

Sieker Landstr. 2

D-22927 Großhansdorf

Ansprechpartner sind Dr. Bernd Degen und Dr. Matthias Fladung (Tel.: e-mail:
bernd.degen@vti.bund.de; matthias.fladung@vti.bund.de)

3 Kurzfassung des Projekts

Ziel des hier beschriebenen Projekts ist es, die Kombination der Stabilisotopen-Methode zur Überprüfung der deklarierten Herkunft bei Holz mit der DNA-Analyse zur Artidentifizierung anhand von beispielhaften Anwendungen einzuführen. Als Initiator verfolgte der WWF das Ziel, allen interessierten Gruppen (Unternehmen, Behörden, NGOs etc.) eine einfache, schnelle und verhältnismäßig günstige Möglichkeit an die Hand zu geben, mit der die deklarierten Angaben zu Herkunft und Holzart überprüft werden können.

Der Partner TÜV-Rheinland Agroisolab konnte die **Stabilisotopen-Methode**, anknüpfend an den Ergebnissen des Vorläuferprojektes, konkret für die Holzarten Teak und Mahagoni noch weiter ausbauen und absichern. Damit konnte die praktische Anwendbarkeit der Methode für die **Überprüfung der deklarierten Herkunft auch für Tropenhölzer** belegt werden. Das DBU-geförderte Vorläuferprojekt konzentrierte sich auf Europa und Nordwest-Russland.

Dabei folgten fünf Arbeitsschritte aufeinander:

- Ausarbeitung der Rasterung der Konzessionen, d.h. Ausarbeitung der Probenahmen in mindestens vier verschiedenen Regionen der Hemisphäre;
- Weiterentwicklung der stabilen Isotopen Applikation unter Anwendung aller stabilen Isotope der Bioelemente: D/H, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ als auch der Strontiumisotope $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$;
- erste Messreihe zur Charakterisierung von ausgewählten Anbauflächen; zweite Messreihe zur Überprüfung der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Baumarten;
- Erweiterung der Applikation zur Darstellung von Messdaten auf Google Earth und Einbindung von Genetik und stabilen Isotopen;
- Überprüfung von Verdachtsproben / Blindproben

Am Ende des Projekts beauftragte der Deutsche Zoll beim TÜV Rheinland Agroisolab GmbH die Verifizierung der deklarierten Herkunft beschlagnahmter Teak-Proben. An diesem realen Beispiel konnten die im Projekt erarbeiteten neuen Möglichkeiten in der Praxis erfolgreich erprobt werden.

Im Rahmen dieses Projekts konnte die Universität Hamburg in Zusammenarbeit mit dem Thünen-Institut durch artspezifische **DNA-Marker** ein praxistaugliches Verfahren zur eindeutigen **Artdifferenzierung** der den CITES-Schutzbestimmungen unterliegenden drei Mahagonibaumarten *Swietenia macrophylla*, *S. mahagoni* und *S. humilis* und für Teak (*Tectona grandis*) bereitzustellen. Die Rasterung und weitere Spezifizierung für die Probenahme erfolgte in Zusammenarbeit mit den Projektpartnern.

Folgende Themenbereiche wurden angesprochen:

- Besondere Herausforderungen der DNA-Extraktion aus Holz und Holzprodukten

- Vorteile des Chloroplastengenoms (cpDNA) für den Nachweis informativer DNA-Sequenzen zum genetischen Barcoding
- die Verwendung des vollständig sequenzierten cpDNA-Genoms der Balsampappel (*Populus trichocarpa*) als Basis für das Design von neuen Primern (Erkennungsregionen)
- die Entwicklung von Barcoding-Sequenzen sowie die Etablierung einer möglichst schnellen und kostengünstigen Methode zur Bestimmung geschützter Arten aus der Gattung der echten Mahagonihölzer (*Swietenia macrophylla*, *S. mahagoni* and *S. humilis*) als auch von Teak (*Tectona grandis*)

An einem aktuellen und realen Beispiel konnten die neuen Genmarker in der Praxis an vom Zoll beschlagnahmtem Mahagoni erfolgreich getestet werden.

Ein vom WWF Deutschland koordinierter **Blindprobentest** zur Überprüfung der deklarierten Herkunft in der letzten Projektphase verlief sehr vielversprechend.

Über einen Stakeholderprozess wurde die Möglichkeit einer gemeinsamen **Datenbank** diskutiert, damit die Messdaten des Projekts aus beiden Verfahren und möglicherweise auch zukünftiger Daten gemeinsam verwaltet und interessierten Gruppen zugänglich gemacht werden können.

Durch eine internationale Fingerprinting-Konferenz in der letzten Phase des Projekts und anderen kommunikativen Maßnahmen wie der Durchführung eines Fachforums bei der CBD 2009 in Bonn konnten die **Projektergebnisse** wichtigen Stakeholdern zugänglich gemacht werden.

4 Probennahme

Das Projekt konzentrierte sich auf zwei Holzarten:

1. Teak
2. Mahagoni (echtes Mahagoni, afrikanisches Mahagoni)

4.1 Teak (*Tectona grandis*)

Gattung: *Tectona*

Familie: *Lamiaceae*

Geografische Verbreitung nach Richter, RICHTER, H G und DALLWITZ, M J: Indien, Pakistan, Sri Lanka, Birma/Myanmar, Thailand, Laos, Vietnam, Kambodscha, und tropisches Afrika (Plantage); Teak wird in mehreren Regionen in Plantagen angebaut (Java, Afrika, Mittelamerika)

Teak wurde als Holzart ausgewählt, weil es seit 2008 ein EU-Importverbot (EG) VO 194/2008) für Holz und andere Produkte aus Burma (Myanmar) gibt. Insbesondere Teak aus Burma spielt aufgrund seiner als besonders hochwertig eingestuften Qualität eine besondere Rolle. Interessierte Kunden in Europa sind bereit, hohe Preise für Teak aus diesem Land zu bezahlen (ca. 10.000 USD/m³). Im Zeitraum des Projekts wurde dem WWF Deutschland ein Fall bekannt, in dem ein deutsches Unternehmen mehrere m³ Burma Teak per Luftfracht nach Deutschland importierte. Das ist für Holz ein sehr ungewöhnlicher Transportweg, der sich nur durch den sehr hohen Preis erklären lässt.

Der WWF vermutet, dass hochwertiges Teak aus Burma über Falschdeklaration des Herkunftslandes in die EU und nach Deutschland importiert wird. Diese Vermutung wurde zum einen durch ein deutsches Holzhandelsunternehmen bestätigt, das dem WWF gegenüber vertraulich zugab, dass auch nach dem EU-Importverbot das Geschäft mit Burmateak nahezu unverändert – inzwischen aber verdeckt – weitergehen würde. Zum anderen bestätigte die Beschlagnahmung von Teak durch den Zoll am Ende dieses Projekts den vom WWF geäußerten Verdacht.

4.2 Mahagoni

1. *Swietenia macrophylla* (Internationale Handelsnamen: Big-Leaf Mahogany, Honduras Mahogany, Mahogany)
2. *Swietenia mahagoni* (Internationale Handelsnamen: Cuban Mahogany, Mahogany, Spanish Mahogany, West Indian Mahogany)
3. *Swietenia humilis*

Geographische Verbreitung nach RICHTER, H G und DALLWITZ, M J: Mexiko und Mittelamerika sowie tropisches Südamerika (außer Amazonas).

Mahagoni wurde als weitere Holzart ausgewählt, weil dem WWF durch die Auswertung von Eurostat-Zahlen bekannt wurde, dass im Zeitraum von Januar bis August 2007 fünfmal mehr Mahagoni aus Deutschland exportiert als importiert wurde. Und das obwohl der Import in den

Jahren davor konstant niedrig war. Diese Zahlen sind zwar kein Beweis für illegale Importe, so aber doch ein Indikator.

Schutzstatus unter CITES (Washingtoner Artenschutzabkommen): *S. humilis* und *S. mahagoni* in Annex II; *S. macrophylla* in Annex III (Costa Rica)

Auch bei Mahagoni handelt es sich um eine sehr teure Holzart. Der WWF vermutet, dass echtes Mahagoni z.B. durch Falschdeklaration der Holzart illegal nach Deutschland importiert wird. Dazu können optisch verwechselbare Holzarten (meist Afrikanisches Mahagoni) zur Falschdeklaration vorgetäuscht werden. Der Verdacht, dass echtes Mahagoni illegal nach Deutschland importiert wird, bestätigte sich durch einen realen Fall am Ende dieses Projekts (siehe Kapitel 7.3)

Verwechselbare afrikanische Holzarten sind:

- *Khaya spp.* (internationale Handelsnahmen: Khaya, African Mahogany)
- *Entandrophragma cylindricum* (internationale Handelsnahmen: Sprague, Sapeli)
- *Entandrophragma utile* (internationale Handelsnahmen: Dawe & Sprague, Sipo)

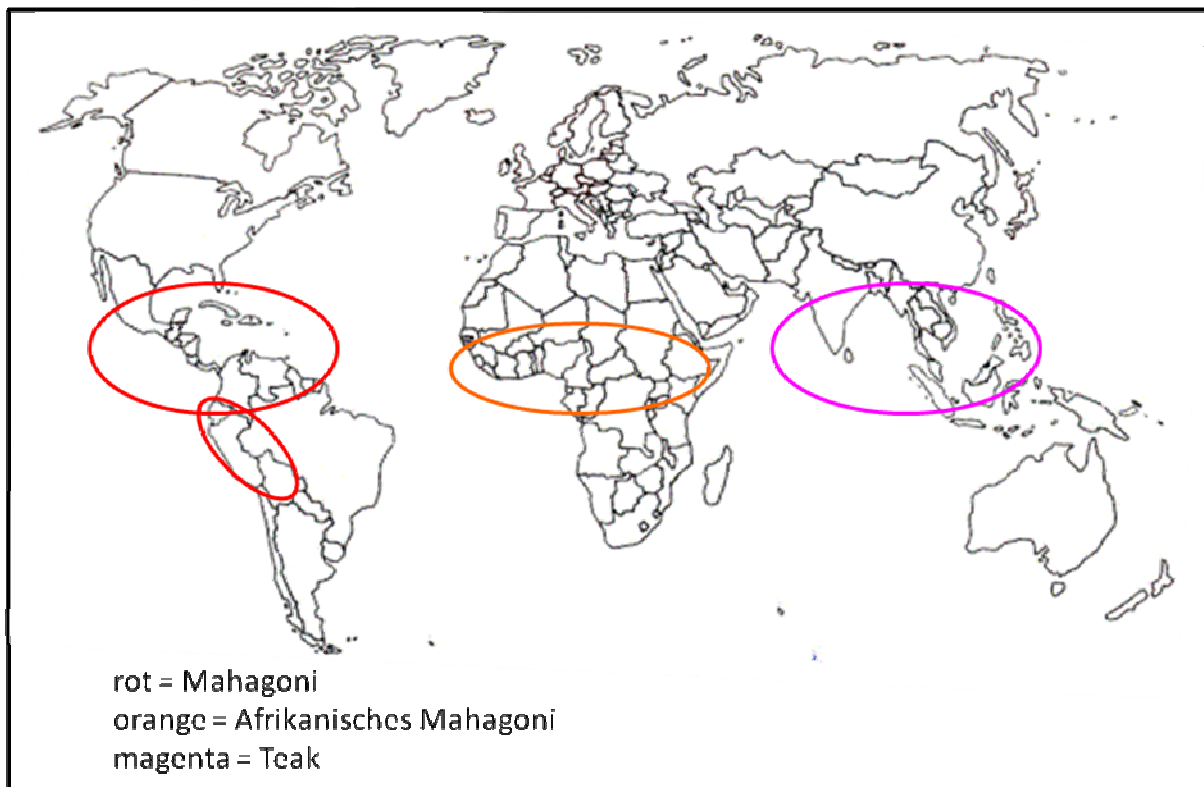


Abbildung 1: Natürliches Verbreitungsgebiet Teak, Mahagoni, afrikanisches Mahagoni

Von Beginn des Projekts gab es das gemeinsame Verständnis, dass die Holzproben in Kooperation mit Unternehmen oder mit dem Einverständnis der zuständigen Behörden gesammelt und exportiert werden sollten.

Region	Anzahl Standorte	Anzahl Holzproben
Birma / Myanmar	15	24
Brasilien	6	31
Costa Rica	5	25
Ecuador	21	21
Ghana		339
Guatemala	2	2
Honduras	35	74
Indien	7	34
Indonesien	2?	7
Java	27	124
Kongo	26	37
Laos	7	35
Mexiko	2	2
Panama	141	141
Papua-Neuguinea	4	18
Peru	70	70
Thailand	3	3
Vietnam	4?	18
Summe:		1005

Abbildung 2: Während des Projekts gesammelte Holzproben

Insgesamt gestaltete sich die Probensammlung als sehr schwierig. Zum Teil musste mehrere Monate Überzeugungsarbeit geleistet werden, bis einzelne Unternehmen für die Mitarbeit in dem Projekt gewonnen werden konnten.

Auch behördliche Ausfuhrgenehmigungen nahmen zum Teil mehrere Monate in Anspruch und setzten zusätzlich das Ausfüllen unzähliger Formulare voraus.

Aus diesen Gründen blieb die tatsächlich gesammelte Probenanzahl von 1.005 deutlich hinter der geplanten Probenanzahl von 2.000 Stück zurück.

Während der letzten Projektphase erhielt das Projekt die Möglichkeit, Holzproben aus Ecuador und Kolumbien erhalten zu können. Der wissenschaftliche Beirat beschloss bei seiner letzten Sitzung, dass die Proben trotz des späten Zeitpunkts gesammelt werden sollten, auch wenn die Analyse der Proben innerhalb des Projekts nicht mehr sichergestellt werden kann. Die Holzproben sollten für die spätere Analyse und ggf. für den Aufbau einer internationalen Datenbank zur Verfügung stehen. Bis zum Projektabschluss waren noch nicht alle Proben eingetroffen (noch ca. 80 Proben werden erwartet).

Damit standen am Ende des Projekts über 1.000 Holzproben aus 18 Ländern zur Verfügung.

4.3 MTA (Material Transfer Agreement)

Das "Material Transfer Agreement" (MTA) wurde entwickelt, um beiden Vertragsseiten (Unternehmen, das die Proben zur Verfügung stellt und auf der anderen Seite die Projektpartner) eine sichere Grundlage für die Zusammenarbeit zu geben. Im MTA wurde

festgelegt, dass die Projektpartner die zur Verfügung gestellten Holzproben nur für den im Projekt beschriebenen Zweck verwenden dürfen.

Folgende Unternehmen unterzeichneten ein MTA mit dem Projekt:

1. Cooperacion para el Dessaralló Agraindustrial (Panama)
2. Ecoforest S.A. (Panama)
3. Floresteca S.A. (Brasilien)
4. Forest Finance Panama S.A. (Panama)
5. Reforestadora de la Cuenca Hidrografica del Rio Tapagrilla (Panama)
6. Geo Forestal S.A. (Panama)
7. Interholco AG (Kongo; Schweiz)
8. Juan Pausa (Panama)
9. Norma Betzaida Solis Batista (Panama)
10. Perum Perhutani (Indonesien)
11. Precious Woods (Costa Rica; Schweiz)

5 Überprüfung der deklarierten Herkunft mittels Isotopenmethode (Prof. Hilmar Förstel, Dr. Markus Boner)

5.1 Grundlagen der stabilen Isotope

5.1.1 Begriff der stabilen Isotope

Die Elemente des Periodensystems sind aus verschiedenen Atomarten (Nukliden) aufgebaut, die zwar die gleiche Protonenzahl besitzen, aber verschiedene Neutronenzahlen aufweisen. Dies spiegelt sich im Atomgewicht wider. Derartige Nuklide werden als Isotope bezeichnet (griech. *iso* = gleich, *topos* = Ort). Aus chemischer Sicht hat diese Tatsache keine weitere Bedeutung, da letztlich die chemischen Eigenschaften nur auf die Protonen und Elektronen des Elements zurückzuführen sind. Jedoch führt in der Regel die erhöhte bzw. eine erniedrigte Neutronenzahl zu instabilen Elementen, die einem radioaktiven Zerfall unterliegen. Einige wenige zeigen diesen Kernzerfall nicht, sie werden deshalb als stabile Isotope bezeichnet, entsprechend gehören radioaktive Elemente zu den instabilen Isotopen.

In der Natur kommen die meisten chemischen Elemente als Isotopengemische vor, lediglich 21 Elemente bestehen aus nur einem stabilen Isotop. In der Tendenz zeigen die Elemente mit höherer Ordnungszahl eine Zunahme an Isotopen. Bei Elementen mit niedriger Ordnungszahl, wie zum Beispiel den „Bioelementen“, sind nur wenige stabile Isotope vorhanden.

Die Verteilung bzw. die Häufigkeit der stabilen Isotope, ausgedrückt in Atomprozent, ist besonders bei den Bioelementen nicht konstant, sondern unterliegt in der Natur geringen Schwankungen, die auf geochemische, geophysikalische, biochemische und biophysikalische Fraktionierungsprozesse zurückzuführen sind. Bei der Angabe der natürlichen Häufigkeit der stabilen Isotope ist deshalb auf die Angabe der Herkunft zu achten. Die erwähnte Besonderheit der Bioelemente (nur zwei Isotope mit einem überwiegenen Isotop) ermöglicht es, die natürliche Varianz der Isotopenhäufigkeit in einer Kennzahl anzugeben, die im Folgenden erläutert und in den weiteren Erörterungen angewendet wird.

5.1.2 Messnotation

Die isotope Zusammensetzung der Bioelemente variiert nur in geringem Maße, so dass Unterschiede erst auf der zweiten bzw. dritten Kommastelle der Zusammensetzung, ausgedrückt in Atomprozent vorkommen.

Verbindung	relative Häufigkeit in Atom-%		δ PDB [‰]
	^{12}C	^{13}C	
PDB	98,8887	1,1112	0
NBS-Kalkstein Nr. 20	98,8899	1,1100	-1,1
Teplitz, CSSR, Kalkstein	98,8920	1,1079	-2,9
Atmosphäre CO_2	98,8972	1,1027	-7,7
C3 – Zucker	98,9173	1,0826	-26,0

Abbildung 3: Die relative Häufigkeit von ^{12}C und ^{13}C in Atomprozent in Abhängigkeit von der Matrix. Am Beispiel des Kohlenstoffs werden geringe Abweichungen des ^{13}C Gehaltes in verschiedenen Matrices dargestellt. Eine Abweichung um +0,001 Atom-% entspricht etwa einer Anreicherung um 1 ‰.

Als Maßzahl dieser Variation hat sich seit über 60 Jahren die Delta-Notation durchgesetzt, die die Abweichung von einem internationalen Referenzstandard (für $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: PDB) angibt. Die Isotopenzusammensetzung des internationalen Referenzstands dient als Bezugspunkt bzw. Nullwert der Skalierung.

Am Beispiel des Sauerstoffs wird dies dargestellt:

$$\delta^{18}\text{O} = \left(\frac{R_{pr} - R_{ref}}{R_{ref}} \right) * 1000$$

mit $R_{pr} = [\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}] / [\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}]$ in der Probe
 und $R_{ref} = [\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}] / [\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}]$ im Internationalen Standard

In der wissenschaftlichen Literatur hat sich die Angabe dieser Abweichung in Promill [‰] durchgesetzt und wird entsprechend auch für die übrigen Bioelemente angewendet.

5.1.3 Internationale Referenz-Standards

Als Bezugsstandards der Delta-Notation werden internationale Referenzmaterialien genutzt, die bei der IAEA (International Atomic Energy Agency, Wien) erhältlich sind. Diese Primärstandards [Gonfiantini 1978] legen mit ihrer spezifischen isotopen Zusammensetzung als Bezugspunkt die Delta-Skalierung fest.

Name	Isotope	δ in [‰]	Bemerkung
Primärstandards			
PDB	$^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$	0	Fossiler Tintenfisch (<i>Bellemnitella americana</i>) aus South Carolina, USA, (nicht mehr erhältlich)
SMOW	$^{18}\text{O} / ^{16}\text{O}$	0	Standard Mean Ocean Water (nur noch Restbestände)
	D / H	0	
VSMOW	$^{18}\text{O} / ^{16}\text{O}$	0	Vienna-SMOW 2, nachgemischter SMOW-Standard
	D / H	0	
CDT	$^{34}\text{S} / ^{32}\text{S}$	0	Mineralischer Triolite vom Canyon Diabolo Meteorit
IAEA-N ₂	$^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$	0	Atmosphärischer Stickstoff
Sekundärstandards			
IAEA-CH-7	$^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$	-31,8 v.s. PDB	Polyethylenfolie (PEF)
IAEA-CH-6	$^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$	-10,4 v.s. PDB	Rohrzucker
GISP	$^{18}\text{O} / ^{16}\text{O}$	-24,8 v.s. VSMOW	Greenland Ice Sheet Precipitation
	D / H	-189,5 v.s. VSMOW	
SLAP	$^{18}\text{O} / ^{16}\text{O}$	-55,5 v.s. VSMOW	Standard Light Antarctic Precipitation
	D/H	-428,0 v.s. VSMOW	
IAEA-S1	$^{34}\text{S} / ^{32}\text{S}$	-0,3 v.s. CDT	Silbersulfid
IAEA-N-1	$^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$	+20,3 v.s. IAEA-N ₂	Ammoniumsulfat
IAEA-N-2	$^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$	+4,7 v.s. IAEA-N ₂	Ammoniumsulfat

Abbildung 4: Beispielhafte Aufzählung verschiedener Isotopenstandards für die stabilen Isotope der Bioelemente. Die Primärstandards, bis auf den atmosphärischen Stickstoff, sind nur noch in Restbeständen vorhanden. Der VSMOW (Vienna-Snow) stellt dabei eine Besonderheit dar, er wird von der IAEA angeglichen am SMOW nachgemischt. Die nachfolgenden Standards wurden in internationalen Ringtests gegen diese Primärstandards kalibriert und können als Alternativen bei der IAEA erworben werden.

Aus Abbildung 4 ist zu ersehen, dass zwei „SMOW“ Standards in Gebrauch sind. Der VSMOW ist ein nachbereiteter, auf den Wert des originären SMOW gemischter Standard.

Hier liegt im Übrigen eines der Hauptprobleme der Delta-Notation. Diese „Null“-Standards sollten in ausreichender Menge vorliegen, so dass diese über einen langen Zeitraum zur Verfügung stehen. Leider sind verschiedene Nullstandards heute nicht mehr erhältlich (PDB, SMOW), so dass heute Folgestandards genutzt werden müssen.

Für die Bestimmung der Isotopenverhältnisse von Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel reicht für die Kalibrierung der Analytik ein „Null-Standard“ aus. Die D/H Isotopenverhältnisse zeigen jedoch eine enorme Varianz, so dass stark abweichende Proben bei einer Einpunktkalibrierung stark fehlerbehaftet sind. Gelöst wurde dieses Problem durch die Etablierung einer VSMOW-SLAP Skalierung [GONFIANTINI 1978]. Dabei dient der VSMOW weiterhin als „Null“-Standard, daran angeglichen wurden die Messungen eines stark abgereicherten Standards (SLAP) und eines „Mittel“-Standards (GISP), d.h. eines Standards, welcher Isotopenverhältnisse aufweist, die etwa in der Mitte zwischen SLAP und GISP liegen.

5.1.4 *Messung der stabilen Isotope*

Als Methode zur Messung von stabilen Isotopen hat sich die Massenspektrometrie, neben der NMR, besonders bewährt. Massenspektrometer sind in fast allen Feldern der Naturwissenschaft etabliert und verbreitet.

Der hier untersuchte Einsatzbereich liegt in der Messung stabiler Isotope, die im Wesentlichen mit drei Arten von Massenspektrometern durchgeführt wird (TIMS, ICP-MS mit Multikollektor und IRMS), da diese die stabilen Isotope mit der nötigen Genauigkeit und Reproduzierbarkeit detektieren können. Die beiden ersteren können zur Bestimmung der höheren stabilen Isotope eingesetzt werden.

In einer externen Zusammenarbeit mit dem Forschungszentrum Jülich wurden entsprechend die stabilen Isotope des Strontiums (^{87}Sr / ^{86}Sr) mit Hilfe von ICP-MS bestimmt.

Das Anwendungsgebiet der IRMS-Systeme (Isotope Ratio Mass Spectrometer) liegt in der Bestimmung der „leichten“ Elemente, besonders der stabilen Isotope der Bioelemente. Zur Detektion im Massenspektrometer ist es notwendig, die stabilen Isotope der Bioelemente (N_2 , CO_2 , SO_2 , H_2 , CO) dem Massenspektrometer in Gasform zuzuführen, weshalb gelegentlich der Zusatz (GIRMS = gasIRMS) verwendet wird.

Einen detaillierten Einblick über die Technik der IRMS und deren Besonderheiten sind in verschiedenen Arbeiten verfügbar [POSSER 1993].

Folgende Gerätekonfigurationen wurden für die Vermessung der stabilen Isotope der Bioelemente eingesetzt.

D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ organisch	Hochtemperaturofen (Gero, 1550°C)	Isotopenmassenspektrometer (Isoprime)
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	Elementanalysator NA 1500 (Carlo Erba)	Isotopenmassenspektrometer (Optima)
$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	Semi-Elementanalysator Vario Isotope Cube (Elementar)	Isotopenmassenspektrometer (NU Instruments)
$^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$	Elementanalysator EA 3000 CN (Euro Vector)	Isotopenmassenspektrometer (Optima)
$^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$	Mikrowellenaufschluss	ICP-Massenspektrometer (Elan 6100)

Abbildung 5: Gerätekombination zur Analyse der stabilen Isotope der Bioelemente und der stabilen Isotope von Strontium.

5.2 Anwendung der Stabilen Isotope zum Nachweis der geographischen Herkunft

Die stabilen Isotope der Bioelemente bieten verschiedenste Möglichkeiten, die Herkunft aufzuschlüsseln. Die D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse liefern großräumige Trennvektoren. Die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse sind im Informationsgehalt diffus und können sowohl zur lokalen (kleinräumig) als auch zur regionalen Differenzierung genutzt werden. Die $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse sind insbesondere bei Holz als geologische Parameter aufzufassen, die in der Regel lokale Gegebenheiten beschreiben. Im Rahmen des Projektes war die Zielsetzung, alle erwähnten stabilen Isotope einzubinden, so dass ein derzeit optimaler Informationsgehalt für einen Herkunftsnachweis zur Verfügung steht.

Die Grundlagen dieser Anwendungsmöglichkeiten werden im Folgenden kurz dargestellt.

5.2.1 Grundlagen der D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse

Wasser ist ein Grundbaustein des Lebens, doch nur ein geringer Anteil des Wasservorkommens, ca. 0,002 %, ist direkt als Oberflächensüßwasser nutzbar. Der weitaus größte Anteil ist mit einem Volumen von $1.37 \cdot 10^9 \text{ km}^3$ in den Weltmeeren zu finden. Aus stabil-isotoper Sicht sind die Weltmeere hinsichtlich der Isotope $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H als weitgehend homogen anzusehen. So schwanken die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ bzw. D/H Isotopenverhältnisse nur unwesentlich um Null [CRAIG 1965]. Dagegen zeigt das Süßwasser erhebliche Varianzen, die im $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenwert einen Bereich von +4 bis -55 ‰ und im D/H Isotopenwert einen Bereich von +40 bis -500 ‰ abdecken können.

Die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse sind dabei korreliert mit den D/H Isotopenverhältnissen. Diese Korrelation etablierte sich als „meteoric water line“ [CRAIG 1961] mit der mathematischen Darstellung:

$$\delta D = 8\delta^{18}\text{O} + 10$$

Physikalische Grundlage dieser Varianz ist die Rayleigh-Fraktionierung, die die Isotopenvarianz in den Niederschlägen bewirkt. Im Kern regnet das schwere Wasser früher ab als das leichte mit einer gleichzeitigen Verarmung der Wolke an schwerem Wasser.

Der mittlere Isotopenwert im Wasser kann dabei streng korreliert sein mit der mittleren Jahrestemperatur an einem bestimmten Ort.

Da eine direkte Korrelation der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse der Cellulose zum Wasser vorliegt, wurden die Isotopenverhältnisse der Baumringe ebenfalls für paleoklimatische Studien verwendet [BURK 1981, YAPP 1982].

Andererseits beeinflussen neben der Temperatur noch weitere Einflussgrößen die Isotopenverhältnisse des Wassers. So ist der Kontinentaleffekt ein weiterer wichtiger Effekt, der beschreibt, dass die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse im Wasser mit zunehmendem Abstand von der Küste durch Abregnung stetig abgereicherte Werte annehmen [CRAIG 1956]. Weitere Einflussgrößen für den Grad der Abreicherung des Wassers sind in der Höhe über dem Meeresspiegel (Höheneffekt), der geographischen Breite (Breiteneffekt) und der Niederschlagsmenge (Mengeneffekt) zu finden. Dies ergibt für die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse im globalen Wasserkreislauf ein differenziertes Bild.

Die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse der Cellulose spiegeln zwar das Wasser wider, jedoch unterliegen diese verschiedenen biochemischen und destillativen Fraktionierungen und Einflüssen. So sind die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse der Cellulose in der Regel um +27 ‰ angereichert aufgrund des Eintrages von angereichertem Sauerstoff aus dem atmosphärischen Kohlendioxid. Die D/H Isotopenverhältnisse in der Cellulose werden sogar noch stärker beeinflusst. Die Signatur zum Wasser bleibt generell erhalten, jedoch mit unterschiedlichen Offsets, die z.B. abhängig vom Photosynthesepfad (C3, C4-Pflanzen) sind [ZIEGLER 1976].

5.2.2 Grundlagen der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse

Der Kohlenstoff der Biomasse ist im Wesentlichen ein Produkt der Photosynthese der Pflanzen und damit ein Resultat des atmosphärischen Kohlendioxids. Das Kohlendioxid zeigt gegenüber dem internationalen Referenzstandard eine Abreicherung von -8 ‰ [KEELING 1995]. Dieser Wert ist nicht konstant, sondern wurde aufgrund des abgereicherteren Prozesskohlendioxids der Industrialisierung in den letzten 200 Jahren von -6,5 ‰ [LEUENBERGER 1992] stetig abgereichert.

Die Isotopenverhältnisse des atmosphärischen Kohlendioxids werden in der Pflanze nicht wieder gefunden, sondern die gebildete Biomasse zeigt in ihren $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnissen deutliche Abreicherungen. Das Maß der Abreicherungen variiert im Wesentlichen durch die Art des Photosynthesystems und durch die klimatischen Bedingungen.

Letztere ist das Gas-Wasser-Problem der Pflanzen: Werden die Stomata weit geöffnet, um die CO_2 -Aufnahme für die Photosynthese möglichst wenig zu behindern, nimmt zwangsläufig die Transpiration und damit die Gefahr des Austrocknens der Pflanze zu. Schließt die Pflanze jedoch die Stomata, um dieser Gefahr zu begegnen, so wird auch die CO_2 -Aufnahme

blockiert. Die Folge ist, dass das vorhandene CO₂ in den Interzellularen nahezu vollständig umgesetzt wird, die ¹³C/¹²C Isotopenverhältnisse der Photosyntheseprodukte werden angereicherter.

Deshalb zeigen Pflanzen einer Art in ariden Gebieten angereichertere ¹³C/¹²C Isotopenverhältnisse in der Biomasse als in gemäßigten Gebieten [KÖRNER 1991, TREYDTE 2001].

5.2.3 Grundlagen der ¹⁵N/¹⁴N Isotopenverhältnisse

Der Stickstoffpool in der Pflanzenbiomasse und damit der Bäume ist abhängig von den Verhältnissen zweier Stickstoffpools, denen des Bodens und der Atmosphäre. Der Stickstoff wird in der Regel als Nitrat von der Pflanze aufgenommen und schon in der Wurzel bzw. in den Blättern durch die Nitrat-Reduktion dem Glutamatsynthese-Zyklus nutzbar gemacht.

Die Aufnahme des Nitrats zeigt keine Isotopenfraktionierungen [YONEYAMA 1989], so dass verallgemeinert davon ausgegangen werden kann, dass die Isotopenverhältnisse der Pflanze die Isotopenverhältnisse des Bodennitrats widerspiegeln [YONEYAMA 1990; TURNER 1987].

Natürliche Baumbestände spiegeln häufig abgereicherte ¹⁵N/¹⁴N Isotopenverhältnisse wider, da der einzige Stickstoffeintrag durch abgereicherten Stickoxid-Fallout erfolgt.

Anthropogene Einflüsse, wie sie durch die Düngung bei Pflanzen bekannt sind [DOUGHTON 1991], äußern sich bei natürlichen Baumbeständen ebenfalls nur durch dieses Stickoxid-Fallout in der Pflanze [SAVARD 2009].

5.2.4 Grundlagen der ³⁴S/³²S Isotopenverhältnisse

Schwefel weist in der Natur 4 stabile Isotope auf: ³²S (95%), ³³S (0,75%), ³⁴S (4,21%) und ³⁶S (0,002%). Analytisch von Bedeutung ist derzeit nur das ³⁴S/³²S Isotopenverhältnis. In der Regel binden Pflanzen die Hauptmenge des Schwefels in den Aminosäuren Cystein (Cystin) und Methionin. Dafür wird der verfügbare Sulfatpool des Bodens genutzt. Ähnlich wie bei der Stickstoffassimilierung ist keine bzw. nur eine geringe Fraktionierung (< 1 ‰) des biogen gebundenen Schwefels gegen den des bioverfügbaren Sulfats feststellbar [CHUKHROV 1980]. Daher spiegeln die Isotopenverhältnisse des Schwefels im Holz weitgehend die geologischen Verhältnisse eines Ortes wider. Anthropogen können die Isotopenverhältnisse des Schwefels im Boden durch Ablagerung bzw. Auswaschung von Schwefelverbindungen aus der Atmosphäre stark beeinflusst werden. So zeigen industrielle Verbrennungsgase angereicherte Schwefelisotopenverhältnisse von bis zu +30 ‰. Der „Fallout“ kann anhand der Isotopenänderung der Pflanze und des Bodens verfolgt werden [WINNER 1978, KAWAMURA 2006].

5.2.5 Grundlagen der ⁸⁷Sr/⁸⁶Sr Isotopenverhältnisse

Generell weisen die höheren stabile Isotope kaum nutzbare Isotopenmuster zur Rückverfolgung der Herkunft auf. Aufgrund der nur geringen Massenunterschiede der

höheren stabilen Isotope kommt es in der Natur nicht zu wesentlichen kinetischen Isotopenfraktionierungen, also zu Isotopenmustern aufgrund unvollständiger Prozesse. Ein Sonderfall stellt das schwere Isotope des Strontium: ^{87}Sr dar. Es wird in Natur aus dem radioaktiven Zerfall des langlebigen Rubidiumisotops ^{87}Rb gebildet. Dadurch spiegelt das $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ Isotopenverhältnis vereinfacht das Alter der Geologie wider, was wiederum zu unterschiedlichen regionalen Isotopenmustern dieser Strontiumisotope in der Natur führt.

Entsprechend kann dies für eine Herkunftsbestimmung von Agrarprodukten [SWOBODA 2007] als auch Holz genutzt werden, da dieses Strontium als Spurenelement von der Pflanze mit aufgenommen wird.

5.3 Probennahmekonzept und Probenaufbereitung

5.3.1 Konzept der Probennahme der Holzproben

Sowohl für Teak (*Tectona grandis*) als auch für Mahagoni (*Meliaceae*) wurde das identische Probenahmeprotokoll verwendet. In der Regel war angestrebt, Bohrproben von den beiden Baumarten aus einer Höhe von 50 cm über dem Erdreich zu ziehen. Im Vorprojekt: "Fichte" wurde schon das Prinzip umgesetzt, von den verschiedenen Referenzproben mindestens 10 Jahresringe zu untersuchen. Es trägt dem Rechnung, dass innerhalb der Jahresringe Variationen auftreten und diese, wie in den Grundlagen dargestellt, als Index für den Klimaverlauf genutzt werden können. Jedoch besteht die Arbeitshypothese, dass die Summe von mehreren Jahresringen einen mehr oder weniger robusten Mittelwert der stabilen Isotope für eine Region ergibt.

Jahresringe sind in der Regel für tropische Hölzer nicht zu erwarten, entsprechend wurde eine Bohrtiefe bzw. eine Länge des Bohrkerns von mindestens 10 cm vorausgesetzt.

Kombiniert mit den GPS-Koordinaten waren diese Vorbedingungen die wichtigsten Regeln für die Probenahme. In vielen Beprobungsregionen, insbesondere Java, konnte dies umgesetzt werden (siehe Abbildung 6). Zusätzlich wurde ebenfalls angestrebt, von definierten Beprobungsorten mehr als eine Probe zu ziehen. Ein kompletter Überblick über definierte Beprobungsorte werden folgend in den Abbildung 7 bis in **Panama** Abbildung 14 dargestellt. Von den Ländern Vietnam, Indonesien, Peru, Costa Rica und Brasilien stehen keine GPS-Koordinaten zur Verfügung.



Abbildung 6: Orte der Probenziehung von Teak und Mahagoni in Java



Abbildung 7: Probenorte von Teak in Papua-Neuguinea

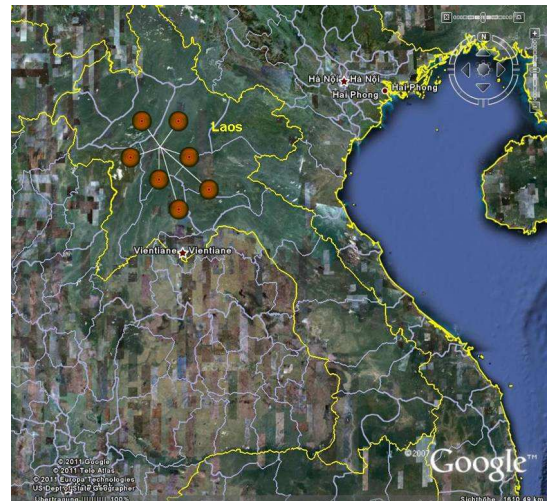


Abbildung 8: Probenorte von Teak in Laos

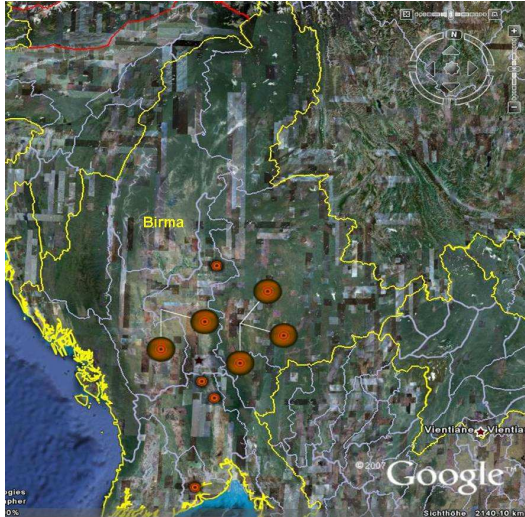


Abbildung 9: Probenorte von Teak in Birma



Abbildung 10: Probenorte von Teak in Indien

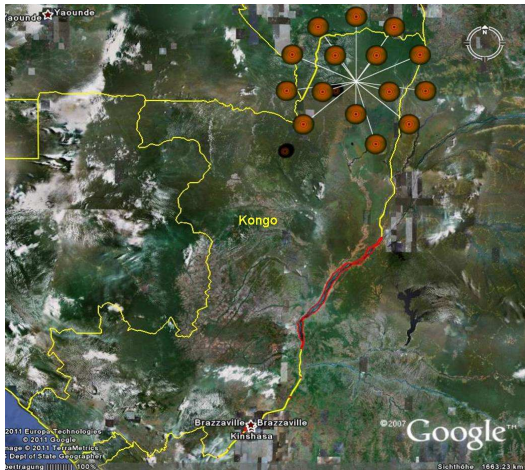


Abbildung 11: Probenorte von Mahagoni im Kongo



Abbildung 12: Probenorte von Mahagoni und Teak in Ghana

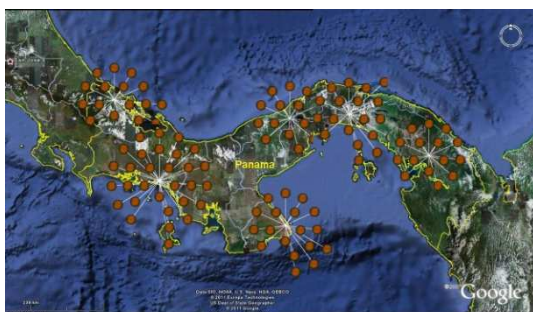


Abbildung 13: Probenorte von Teak und Mahagoni in Panama

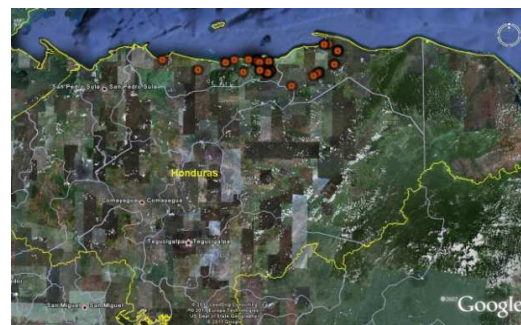


Abbildung 14: Probenorte von Teak in Panama

5.3.2 Aufarbeitung der Holzproben für die Stabil-Isotopen-Analytik

Die grundlegende Vorgehensweise der Aufarbeitung wurde aus dem ersten DBU-Projekt zu diesem Thema, bei dem die Holzart „Fichte“ im Mittelpunkt stand, übernommen. Diese wird nachfolgend noch einmal skizziert. Jedoch bestand der Bedarf eine Optimierung der Vorvermahlung, da die tropischen Hölzer, insbesondere Teak und Mahagoni, im Vergleich zur Fichte eine hohe Härte aufweisen. So weist Teak eine Härte nach Brinell von 63 bis 71 N/mm² gegenüber 12 N/mm² für Fichte auf.

Deshalb wurde im Rahmen des Projektes die Holzaufarbeitung durch eine Schlagmühle Retsch SM100 erweitert. Die Holzproben werden entsprechend nach einer Trocknung bei 103°C für die Aufarbeitung mit der Schlagmühle Retsch SM100 grob vermahlen. Aliquots von ca. 5g werden nach der Vermahlungen mit apolaren (Dichlormethan) und polaren (Methanol) Lösungsmitteln im Soxhlet über 5 Stunden extrahiert. Diese Vorreinigung dient der vollständigen Konditionierung der Holzproben, da z.B. Teak unterschiedliche Öl-Gehalte aufweisen kann.

Nach einer weiteren Trocknung bei 103°C werden die Proben in Kugelmöhlen feinstvermahlen, so dass eine homogene Einwaage von ca. 1 bis 2 mg gewährleistet werden kann. Aus dieser Probenvorbereitung werden die D/H, ¹⁸O/¹⁶O und ¹³C/¹²C und ¹⁵N/¹⁴N Isotopenverhältnisse direkt ermittelt. Dabei stellt die Vermessung der ¹⁵N/¹⁴N Isotopenverhältnisse aufgrund der äußerst geringen Menge von Stickstoff (<0,1 %) eine hohe Hürde für die Vermessung der stabilen Isotope dar.

Nach dem derzeitigen Kenntnissstand konnte bis zum diesen Projekt auf keine Stabil-Isotopen-Literatur verwiesen werden, die die Vermessung von Holzproben aufgezeigt hat. In der Regel wurde in der Thematik der Baumuntersuchung auf stickstoffreiche Teile des Baumes, wie Blätter oder Nadeln zurückgegriffen.

Für die Messung der ¹⁵N/¹⁴N Isotopenverhältnisse wurde deshalb eine neue Generation von Isotopen-Massenspektrometern: NU-Horizon eingesetzt, welche auch bei geringsten Mengen an Stickstoff eine hohe Linearität der Isotopenmessung gewährleisten.

Dieses Isotopenmassenspektrometer wurde mit einem Semi-Elementanalysator verbunden, der bis zu 100 mg Probenmaterial umsetzen kann. Dies entspricht ca. der 10-fachen Menge der Kapazität eines „regulären“ Elementanalysators. Ziel war es, durch die höhere Probenmenge eine messbare Menge an Stickstoff ins Isotopenmassenspektrometer zu überführen. Problematisch ist jedoch, dass bei dieser hohen Verbrennungsmenge ebenfalls unvollständige Verbrennungsprodukte von Kohlenmonoxid entstehen können, die als Isobare ebenfalls die relevante Masse 28 von Stickstoff belegen und damit die Messung verfälschen. Das Kohlenmonoxid entsteht nicht nur durch die Verbrennung, sondern auch direkt durch



Abbildung 15: Schlagmühle SM100 zur Vorzerkleinerung der Holzproben

die Zerlegung von Kohlendioxid im Massenspektrometer, deshalb muss ebenfalls das gesamte Kohlendioxid vor der Messung entfernt werden.

Diese Voraussetzungen wurden durch die Abtrennung von Kohlendioxid mit dem patentierten Trapping-System von der Firma Elementar gewährleistet, als auch andererseits durch die Nutzung gepackter Säulen zur Trennung von Kohlenmonoxid und Stickstoff.

Die Vermessung der $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse war mit einer Aufkonzentrierung verbunden, indem eine 1:2 Verreibung von Kupferoxid und Holzpulver in der Regel mit einer Einwaagemenge von 1 g über Nacht im Muffelofen bei 350°C unter Sauerstoffdosierung verascht wird. Einerseits unterstützt das Kupferoxid als Oxidans die Verbrennung und andererseits bindet das entstehende Schwefeldioxid den Schwefel als Kupfersulfat. Das lösliche Kupfersulfat kann im Fortgang mit Wasser eluiert werden und nach Trocknung direkt im Elementanalysator vermessen werden.

Die Strontiumisotope wurden nach einem Mikrowellenaufschluss mit konz. Salpetersäure aus dem verdünnten Eluent ermittelt. Für den Mikrowellenaufschluss wurde eine Verbrennungstemperatur von 750°C für ca. 400 mg Holzprobe genutzt.

Ein Teilaspekt des Projektes war ebenfalls der Vergleich der Wasserstoff-Isotopenverhältnisse der gesamten Cellulose gegenüber der nitrirten Cellulose der Holzproben. Für diesen Teilaspekt wurden verschiedene Vergleichsproben gemäß der Vorschrift von Brendel [BRENDDEL, 2000] aufgearbeitet.

5.4 Ergebnisse der Isotopenverhältnisse von Teak

Für die Untersuchung von Teak konnten aus 14 verschiedenen Ländern Referenzproben zur Verfügung gestellt werden (Abbildung 2). Insgesamt teilten sich die Referenzproben in 7 Länder aus dem asiatischen, 5 Länder aus dem amerikanischen und 2 Länder aus dem afrikanischen Raum auf.

Eine optimale Beprobung konnte in Java erzielt werden (Abbildung 6). Neben der nahezu vollständigen Abdeckung der Insel mit Referenzproben mit einem Umfang von 124 Holzproben, konnten auch noch weitergehende Informationen zur Lage, wie zum Beispiel Abstand vom Meer, zur Verfügung gestellt werden.

Dies ermöglicht eine weitergehende detaillierte Betrachtung der Region. Von vielen anderen Regionen konnten nur in Teilbereichen von Ländern Probenziehungen durchgeführt werden. Alle Ergebnisse der Differenzierungen beziehen sich entsprechend auf diese regionalen Herkünfte.

Als statistisches Auswertungsmodell zur Erfassung der Möglichkeit der Differenzierung wird die Diskriminanzanalyse (DA) verwendet. Ziel dieser Diskriminanzanalyse ist es, Variablen bzw. Merkmale linear so zu kombinieren, dass vorgegebene unabhängige Gruppen optimal voneinander getrennt werden. Die Trennung erfolgt durch Erfassung einer bestimmten Anzahl von messbaren Merkmalen dieser Objekte und durch Aufstellung einer so genannten Trennfunktion (Diskriminanzfunktion). Das Aufstellen bzw. das Abschätzen der Diskriminanzfunktion hat Ähnlichkeiten mit der Schätzung einer Regressionsfunktion in der Regressionsanalyse. Die Diskriminanzanalyse ordnet dann eine Probe aufgrund ihrer Messwerte einer von mehreren alternativen Gruppen zu.

Anhand der folgenden Abbildung kann dies beispielhaft dargestellt werden:

von \ nach	Birma	Java	Laos	Gesamtwert	% korrekt
Birma	11	3	1	15	73,33%
Java	0	128	0	128	100,00%
Laos	0	0	30	30	100,00%
Gesamtwert	11	131	31	173	97,69%

Abbildung 16: Statistische Kenndaten von Teak aus Birma, Java und Laos; Übereinstimmung der Proben (Zeilen) mit den Referenzen aus den Regionen (Spalten)

Insgesamt stehen 15 Proben aus der Region Birma, 128 Proben aus Java und 30 Proben aus der Region Laos zur Verfügung (Gesamtwert). Aus diesen Proben wird die Diskriminanzfunktion errechnet und diese durch die nachfolgenden Zuordnung (Clusteranalyse) der einzelnen Proben zu den drei möglichen Probenkollektiven getestet. Dadurch können sich Fehlzuordnungen ergeben, d.h. 3 Proben aus dem Birmakollektiv können aufgrund der Ähnlichkeit nur dem Probenkollektiv aus Java zugeordnet werden. Im Ergebnis wird entsprechend daraus die Wahrscheinlichkeit der korrekten Zuordnung errechnet.

5.4.1 Detailanalyse Java

5.4.1.1 D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse in Java

Mit einer Fläche von 127.000 km² entspricht die Ausdehnung der Insel Java ca. 1/3 der Fläche von Deutschland. Die Insel erstreckt sich dabei im Wesentlichen zwischen dem 105° bis zu dem 115° östlichen Längengrad. Die Ausdehnung zwischen den südlichen Breitengrad von 6° bis 8° ist gering.

Schon aufgrund dieser geringen Breitengradausdehnung ist unter Berücksichtigung des „Breiteneffektes“ keine große Variationen der D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse im Wasser zu erwarten.

Direkte Wasser-Referenzen aus der Region Java lagen leider nicht vor. Aus diesem Grund wurde auf die Modelldaten der OIPC-Datenbank zurückgegriffen. Diese Datenbank basiert auf Daten und Algorithmen, erstellt von Bowen et al. [BOWEN 2002, 2003, 2005], die geeignet sind, die mittleren $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse im Wasser für bestimmte Orte zu interpolieren (Abbildung 17).

Auf dieser Basis kann für die gesamte Region Java gefolgert werden, dass die D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse des Wassers nur in einem geringen Rahmen von 1 ‰ in den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ bzw. 9 ‰ in den D/H Isotopenverhältnissen



Abbildung 17: Errechnete D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse von Grundwasser in der Region Java

schwanken.

Dem entsprechen die Ergebnisse der D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse der Proben in Java (Abbildung 18, Abbildung 19). Die Mittelwerte ($n=5$) für $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ der Cellulose weisen an den verschiedenen Standorten mit einem R^2 von 0,23 nahezu keinen signifikanten geographischen Trend zu an- oder abgereicherten Isotopenverhältnissen entlang des östlichen Längengrades auf. Dagegen ist für die D/H Isotopenverhältnisse mit einem R^2 von 0,53 von einer erkennbaren Tendenz zu angereicherten D/H Isotopenverhältnissen entlang des östlichen Längengrades auszugehen (Abbildung 20).

Entlang des südlichen Breitengrades lagen sowohl für D/H als auch für $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ keine Korrelationen vor. Jedoch kann dies ebenfalls durch die Lage dieser Referenzproben beeinflusst sein, denn gerade in dieser östlichen Region sind eher zentrale Beprobungsorte zu finden.

Den Ergebnissen kommt eine besondere Bedeutung zu, da gerade für diese Probenahme als zusätzliche Information bei der überwiegenden Anzahl der Proben der Abstand vom Meer mit angegeben worden war.

Damit keine Einzeleffekte überbewertet werden, wurde eine Clusterung der Proben über den Abstand unter Mittelwertbildung der Einzelproben des jeweiligen Clusters durchgeführt. Daraus ergaben sich vier Cluster in unterschiedlichen Abständen von der Küste (Abbildung 21).

Diese vier Einzelmittelwerte werden mit dem Gesamtmittelwert normalisiert, so dass lediglich die Abweichung betrachtet wird. Außerdem werden die D/H Isotopenverhältnisse der Cellulose ebenfalls mit einem Divisor von 8 belegt, so dass die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse direkt miteinander verglichen werden können. Der Divisor 8 ist aus der „meteoric water line“ abgeleitet (Kapitel 5.2.1), der die Korrelation der D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse im Grundwasser beschreibt.

Unter Berücksichtigung der D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse ist dabei eine signifikante Abreicherung zu den küstenfernen Regionen gut nachvollziehbar. Die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse verbleiben dagegen nahezu konstant bzw. zeigen keine Tendenz zu an- bzw. abgereicherten Isotopenverhältnissen.

Auffallend ist die gute Korrelation $R^2 = 0,99$ der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse zu den D/H Isotopenverhältnissen in der Cellulose (Abbildung 22). Die Korrelation spiegelt jedoch nicht mehr die Korrelation der „meteoric water line“ wider, sondern der Steigungsfaktor hat sich auf 6,5 erniedrigt. Diese Veränderung der Korrelation ist schon in verschiedenen anderen Pflanzen nachgewiesen [DUNBAR 1983] worden.

Die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse werden durch Effekte bei der Evaporation (Verdunstung) stärker angereichert als die D/H Isotopenverhältnisse, sodass anstelle der Steigung 8 eine von 2,5 beobachtet wird [EPSTEIN 1977]. Für die Pflanze ergeben sich aufgrund der Morphologie und der Physiologie des Wasserhaushaltes sowie der klimatischen Bedingungen unterschiedliche Korrelationslinien zwischen der „meteoric water line“ und der Evaporationslinie, hier mit der Steigung 6,5 (Abbildung 22).

Daraus ist ebenfalls zu folgern, dass die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse zwar signifikant korreliert sind (Abbildung 22), jedoch der Informationsgehalt für die geographische Herkunftsaussage unterschiedlich ist. So ist gerade diese Korrelation sehr

nützlich, da sie losgelöst vom Ausgangswasser ebenfalls eine klimatische Herkunftsinformation beinhaltet.



Abbildung 18. D/H Isotopenverhältnisse von Teak (Cellulose) in Java



Abbildung 19: $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse von Teak (Cellulose) in Java

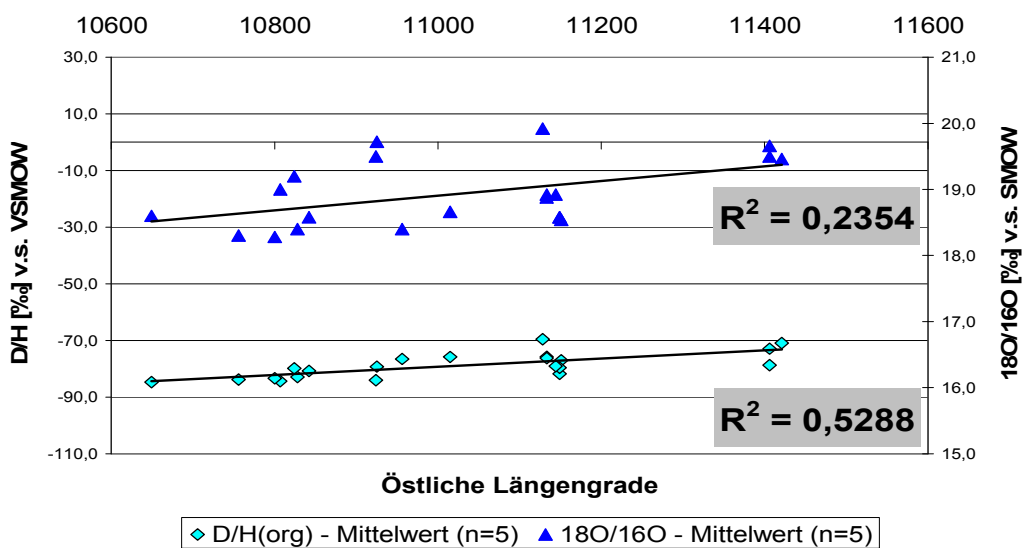


Abbildung 20: Abhängigkeit der D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse von Teak (Cellulose) vom Längengrad

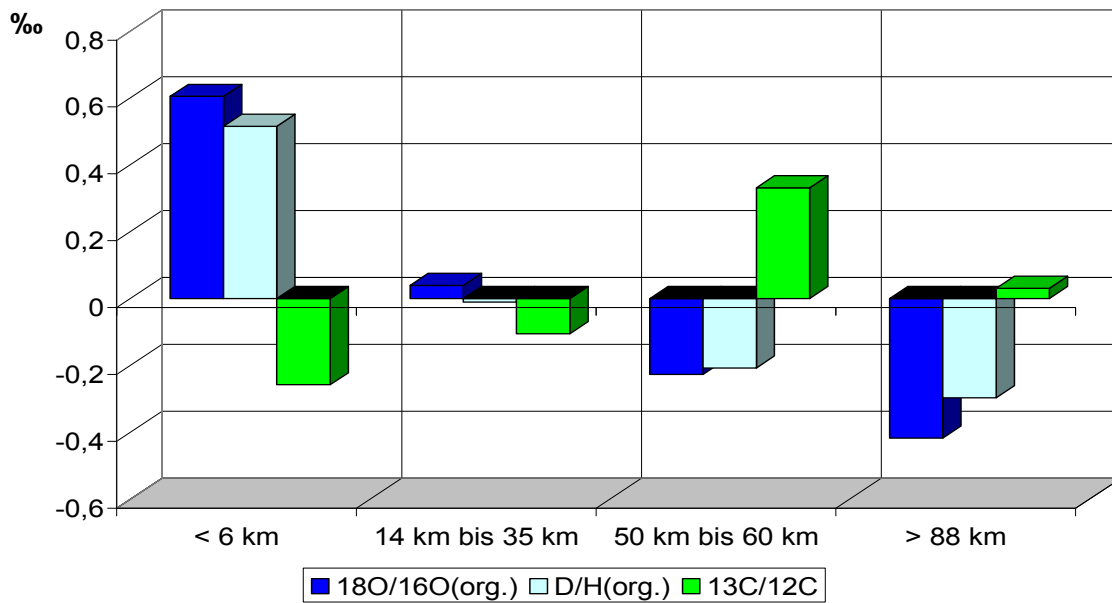


Abbildung 21: Abhängigkeit der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, D/H und $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse in Teak (Cellulose) im Abstand zum Meer in Java

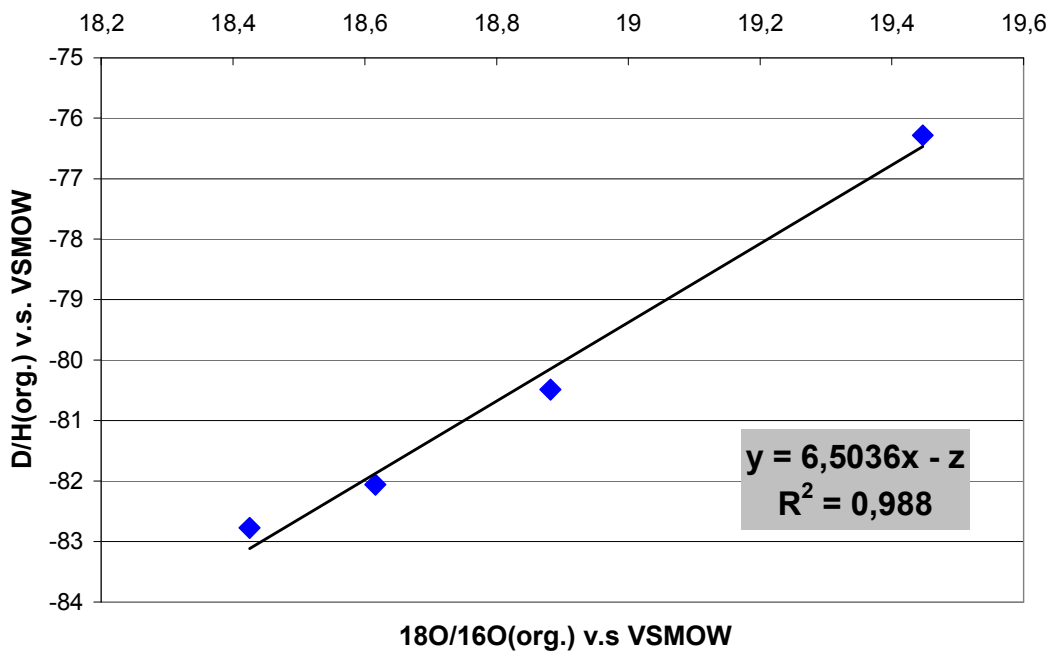


Abbildung 22: Korrelation der D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse der vier Probenkollektive unter Berücksichtigung des Abstandes zum Meer in Java

5.4.1.3 Die $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse in Java

Die Stickstoff und Schwefel-Isotopenverhältnisse spiegeln im Wesentlichen geologische Gegebenheiten des Bodens wider.

Insbesondere Schwefel weist in Java eine erhebliche Variation auf, so dass eine große Spannweite der $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse vorliegt. Entsprechend liegen sowohl sehr abgereicherte $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnissen von -5‰ bis hin zu signifikant angereicherten $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnissen von bis zu $13,8\text{‰}$ vor (Abbildung 25). Derartige Anreicherungen sind insbesondere typisch für Holz aus Südamerika.

Einerseits ist diese Variation für eine mögliche Herkunftsbestimmung hinderlich, da hiermit kein eindeutiges, einmaliges Muster für Java gegeben ist. Andererseits kann Java stärker in Gebiete aufgeteilt werden und eine kleinräumige Zuordnung innerhalb von Java erfolgen.

Die Möglichkeit der kleinräumigen Zuordnung ist außerdem dadurch gegeben, dass sich die an- oder abgereicherten Signaturen ebenfalls kontinuierlich in den verschiedenen Referenzen der jeweiligen Region widerspiegeln (siehe Abbildung 25).

Eine derartige enorme Spannweite der Isotopenverhältnisse von über 19‰ ist bei den $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnissen nicht wieder zu finden (Abbildung 26), es liegen im Gegenteil über die gesamte Region von Java signifikant abgereicherte, bzw. negative $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse vor. Ohne die Ausnahme der Küstenreferenz bei Semarang mit einem $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenwert von $+1,2\text{‰}$, liegt nur eine enge Spannweite von signifikant abgereicherten $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnissen zwischen $-2,9\text{‰}$ bis $-0,1\text{‰}$ vor. Ein regionenspezifischer Trend liegt, bis auf die erwähnte lokale Besonderheit, nicht vor.

Im Gesamtmittel ist in Java von abgereicherten $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnissen von $-1,2 \pm 0,8\text{‰}$ auszugehen.

Die abgereicherten $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse ergeben damit für Java eine besondere Signatur, die für eine Herkunftsbestimmung sehr hilfreich ist, siehe: Unterscheidung von Java und Birma.



Abbildung 25: Isotopenverhältnisse von Schwefel ($^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) in Java



Abbildung 26: Isotopenverhältnisse von Stickstoff ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) in Java

5.4.1.4 Schwankungsbreite der D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse an den verschiedenen Beprobungsorten

Eine der Vorgaben der Probenahme war die Ziehung von bis zu fünf Referenzproben an einem Ort. Insbesondere in Java konnte diese Vorgabe vollständig erfüllt werden.

Diese Vorgabe ist hilfreich für das Abschätzen der Schwankungsbreite der Isotopenverhältnisse, insbesondere für D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$.

Die $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse können dagegen schon lokal große Schwankungen aufweisen. Diese Isotopenverhältnisse sind gerade im Bezug eines großflächigen Trennparameters interessant, wie es schon im letzten Abschnitt erläutert wurde.

Insgesamt lagen für Teak unter Berücksichtigung der 26 Beprobungsorte enge D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Verteilungen vor (Abbildung 27, Abbildung 28).

Annähernd 50 % der Proben wiesen D/H Standardabweichungen an den Beprobungsorten zwischen ± 3 bis ± 4 ‰ auf. Eine entsprechende Anzahl wiesen $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Standardabweichungen zwischen $\pm 0,2$ und $\pm 0,4$ ‰ auf. Berücksichtigt man den Fehler der Reproduzierbarkeit, der für D/H bei ± 2 und für $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ bei $\pm 0,2$ liegt, so wird leicht deutlich, dass ein Großteil der Proben innerhalb des Messfehlers liegt und regional sehr konstante Isotopensignaturen zu erwarten sind.

Dabei ist die Schwankungsbreite der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse geringfügig größer als die der D/H Isotopenverhältnisse. Die maximale Standardabweichung der D/H Isotopenverhältnisse eines Beprobungsortes liegt unterhalb von $+6$ ‰, dagegen der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse unterhalb von $+1$ ‰. Setzt man die übliche Korrelation der „meteoric water line“ voraus, so kann unter Bezug zu den maximalen D/H Isotopenverhältnissen eine maximale $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Standardabweichung von kleiner $0,8$ ‰ erwartet werden. Entsprechend sind die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse als geringfügig schlechter in der Aussagekraft einzuschätzen.

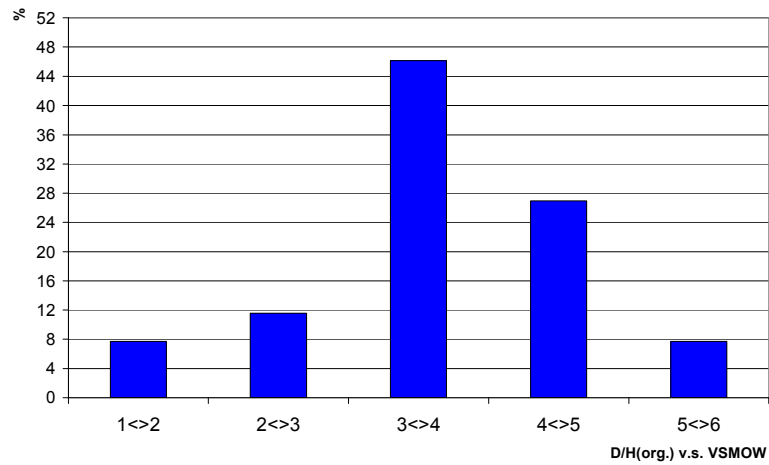


Abbildung 27: Standardabweichung der D/H Isotopenverhältnisse von Teak (Cellulose) der 26 Probenkollektive

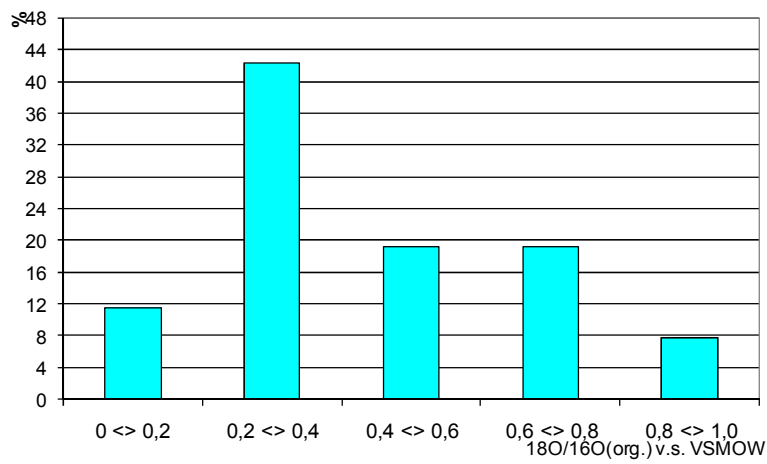


Abbildung 28: Standardabweichung der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse von Teak (Cellulose) der 26 Probenkollektive

5.4.2 Differenzierung von Teak aus Asien insbesondere Java, Birma, Laos und Indien

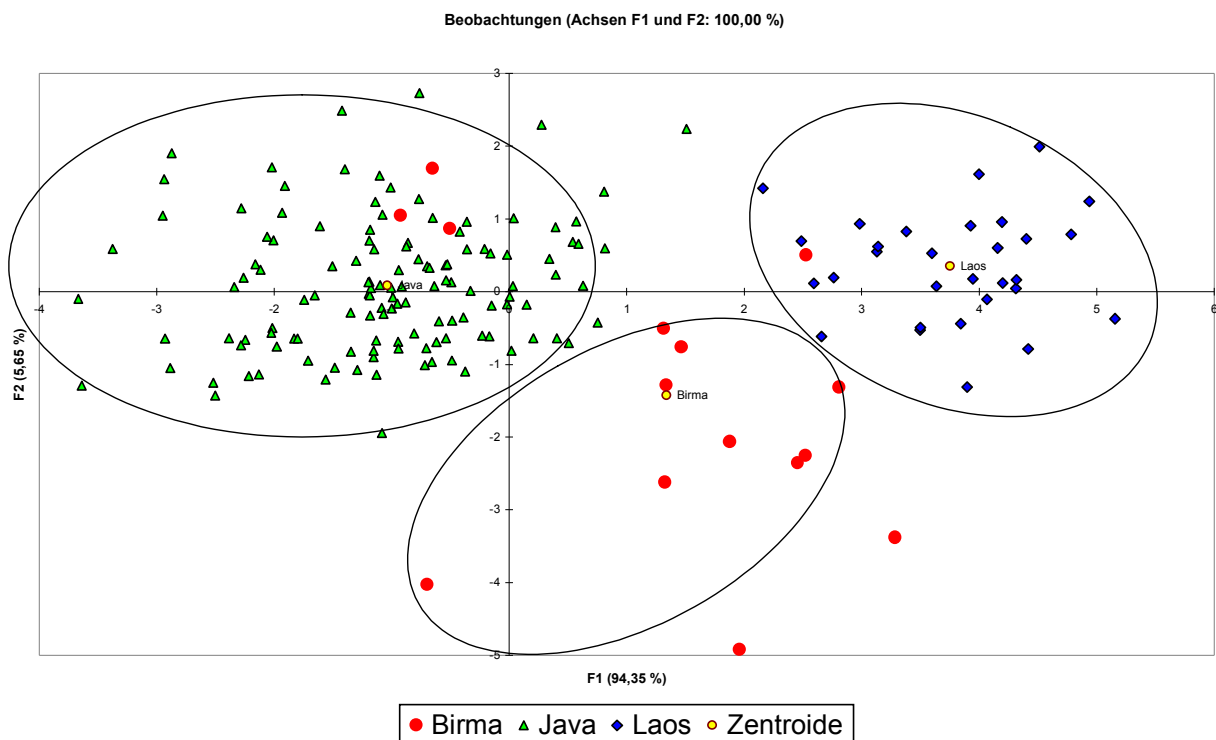
Neben den Referenzen aus Java wurde die Probennahme für Teak auf weitere Regionen und relevante Anbauländer aus Asien ausgedehnt.

Ein wichtiges Anwendungsbeispiel der Möglichkeiten bieten die Differenzierung und der Nachweis von Proben aus Birma.

Gemäß der Verordnung (EG) 194/2008 des Rates vom 25. Februar 2008 ist die Einfuhr insbesondere von Holz aus Birma in die europäische Union nicht mehr erlaubt. Altbestände in Deutschland können jedoch vermarktet werden. Es liegt nahe, dass ein Dreiecksverkehr z.B. über Laos oder Java den Absatz von Birma-Holz weiterhin in der europäischen Union garantieren kann.

Zur Differenzierung stehen derzeit aus Laos 30 Referenzen zur Verfügung. Aus Birma konnten 11 Proben zur Verfügung gestellt werden und aus Java stehen die schon erwähnten 128 Teak-Proben zur Verfügung.

Unter Anwendung der stabilen Isotope der fünf Elemente von Wasserstoff, Stickstoff, Kohlenstoff, Sauerstoff und Schwefel ist dabei eine weitgehende Differenzierung gegeben (Abbildung 28).



von \ nach	Birma	Java	Laos	Gesamtwert	% korrekt
Birma	11	3	1	15	73,33%
Java	0	128	0	128	100,00%
Laos	0	0	30	30	100,00%
Gesamtwert	11	131	31	173	97,69%

Abbildung 29: Differenzierung (DA) und statistische Kenndaten von Teak aus den Regionen Birma, Java und Laos mit Hilfe der stabilen Isotope der Bioelemente

Die in Abbildung 28 angehängte Tabelle sagt aus, dass die Proben aus Java und Laos jederzeit signifikant von einander zu differenzieren sind. Dagegen weisen die Proben aus Birma drei Fehlzusordnungen zu Java und eine Fehlzusordnung zu Laos auf.

Derzeit kann von einer Differenzierungsgüte von Proben aus Birma unter Berücksichtigung von Laos und Java von ca. 74 % ausgegangen werden. Diese Differenzierung ist einerseits auf die signifikant angereicherten D/H Isotopenverhältnisse der Proben aus Birma gegenüber denen aus Laos zurückzuführen. So liegen in Birma im Mittel D/H Isotopenverhältnisse von -84 ± 5 ‰ vor, gegenüber abgereicherten D/H Werten in Laos von ca. -93 ± 5 ‰.

Andererseits sind jedoch die D/H Isotopenverhältnisse in Java und Birma weitgehend ähnlich. Deshalb muss auf die Unterschiede der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse hingewiesen werden. In Java sind, wie schon vorab dargestellt, abgereicherte $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse zu erwarten. Dagegen sind die $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse der Proben aus Birma wesentlich positiver bzw. angereicherter (Abbildung 30). Dies kann entsprechend zur weitergehenden Unterscheidung der beiden Länder herangezogen werden.

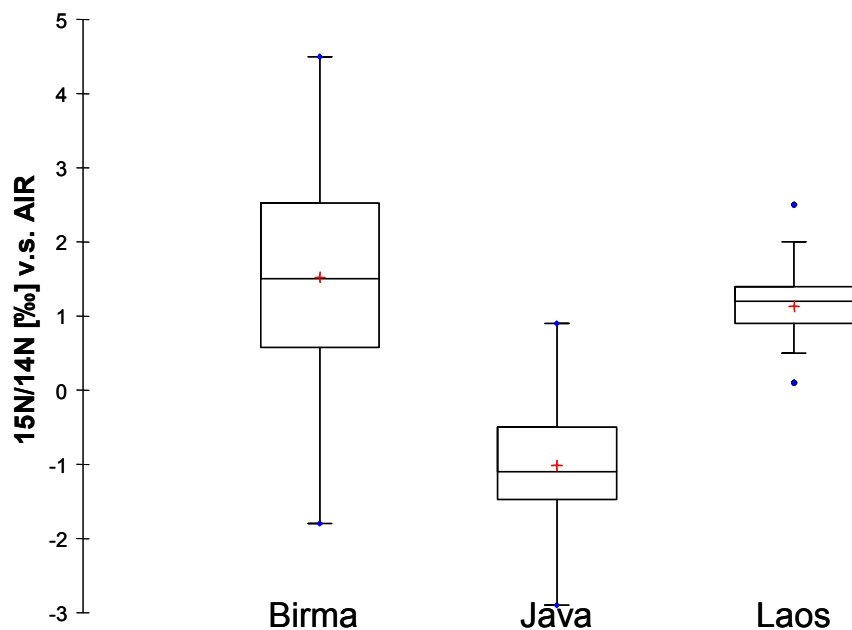
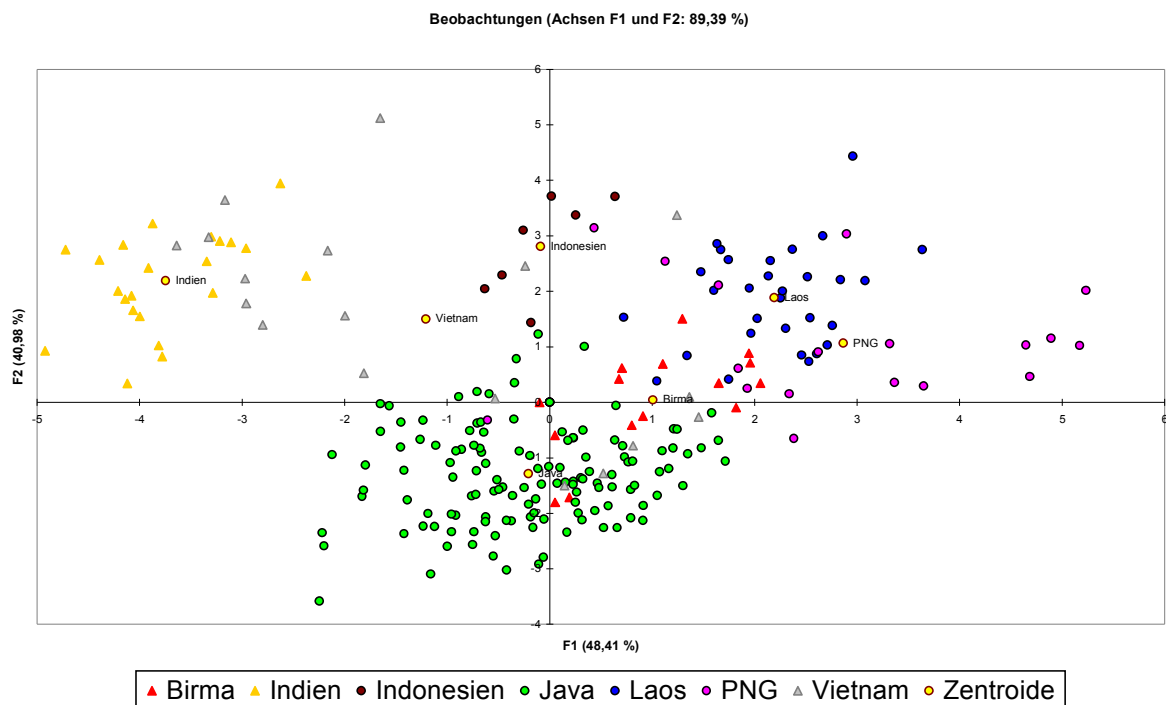


Abbildung 30: Boxplots der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse von Teak in Birma, Java, und Laos

5.4.3 Weitergehende Differenzierung von Teak aus Asien unter Berücksichtigung von Indien und Indonesien, Papa-Neuguinea und Vietnam

Weitet man die Differenzierung ohne Einschränkung aus, so ergeben sich zwangsläufig Überschneidungen der Muster (Abbildung 31). Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Isotopenmuster Gaußverteilungen der einzelnen Regionen widerspiegeln. Dadurch ergeben sich für die einzelnen Isotope Überschneidungen zwischen den unterschiedlichen Regionen. Ein wesentlicher Bestandteil der Isotopenanalyse und der Bewertung ist deshalb immer die Verknüpfung mit Zusatz- bzw. Herkunftsinformationen.

Davon abgesehen ist jedoch hervorzuheben, dass zumindest 5 der 7 beprobten Länder signifikante Isotopenmuster aufweisen, die eine gute Differenzierung gewährleisten (siehe Abbildung 31).



von \ nach	Birma	Indien	Indonesien	Java	Laos	PNG	Vietnam	Gesamtwert	% korrekt
Birma	6	0	0	6	1	2	0	15	40,00%
Indien	0	22	0	0	0	0	0	22	100,00%
Indonesien	0	0	6	0	1	0	0	7	85,71%
Java	0	0	0	127	1	0	0	127	99,25%
Laos	0	0	0	0	30	0	0	30	100,00%
PNG	1	0	1	1	1	14	0	18	77,78%
Vietnam	2	4	1	3	0	0	8	18	44,44%
Gesamtwert	9	26	8	142	34	16	8	238	89,50%

Abbildung 31: Differenzierung (DA) und statistische Kenndaten von Teak aus 7 unterschiedlichen asiatischen Regionen

Neben Laos und Java ist insbesondere auf Indien hinzuweisen, welches eine Differenzierungsgüte gegenüber den weiteren Ländern von 100 % aufweist.

Relevant für dieses Ergebnis sind insbesondere die $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse der beprobten Region in Indien. Sie weisen mit angereicherten $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Werten im Mittel von $+10,7 \pm 0,7 \text{ ‰}$ ein signifikantes Muster auf. Dies ermöglicht es zum Beispiel, Proben aus der Region Indien signifikant von Proben aus Vietnam zu differenzieren (Abbildung 32). Auch gegenüber den weiteren 5 asiatischen Regionen stellen diese angereicherten $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse eine Besonderheit dar und sind entsprechend hilfreich für eine Differenzierung.

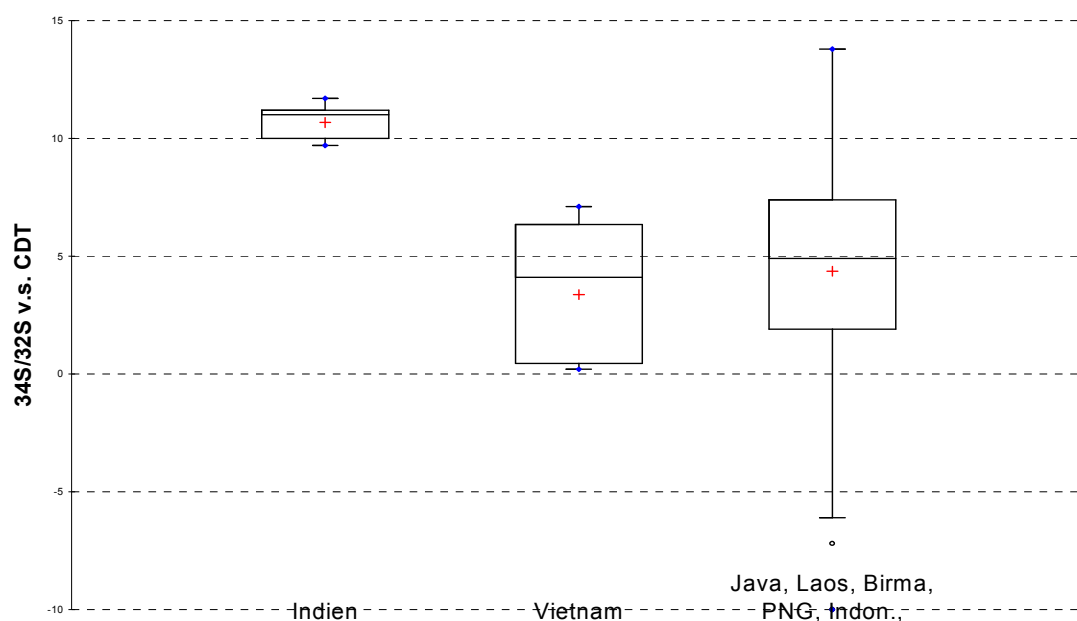
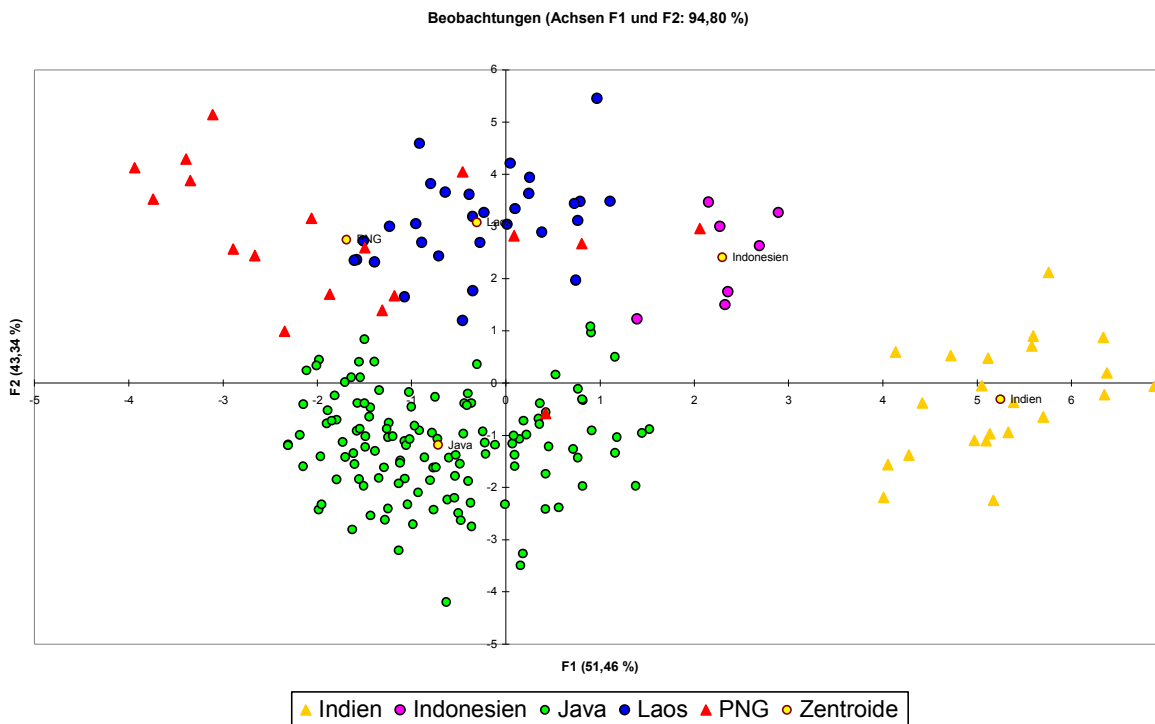


Abbildung 32: Boxplots der $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse von Indien und Vietnam und anderer asiatischer Länder

Neben diesen drei angeführten Regionen von Laos, Java und Indien liegen ebenfalls in Indonesien und Papua-Neuguinea gute Differenzierungsmuster mit Wahrscheinlichkeiten von annähernd 78 % (Papua-Neuguinea) und 86 % (Indonesien) vor.

Engt man eine mögliche Bewertung lediglich auf diese fünf Länder bzw. Regionen ein, so liegt eine sehr hohe Differenzierungsgüte von ca. 98 % vor (Abbildung 33).



von \ nach	Indien	Indonesien	Java	Laos	PNG	Gesamtwert	% korrekt
Indien	22	0	0	0	0	22	100,00%
Indonesien	0	7	0	0	0	7	100,00%
Java	0	0	127	1	0	128	99,22%
Laos	0	0	0	29	1	30	96,67%
PNG	0	1	1	1	15	18	83,33%
Gesamtwert	22	8	128	31	16	205	97,56%

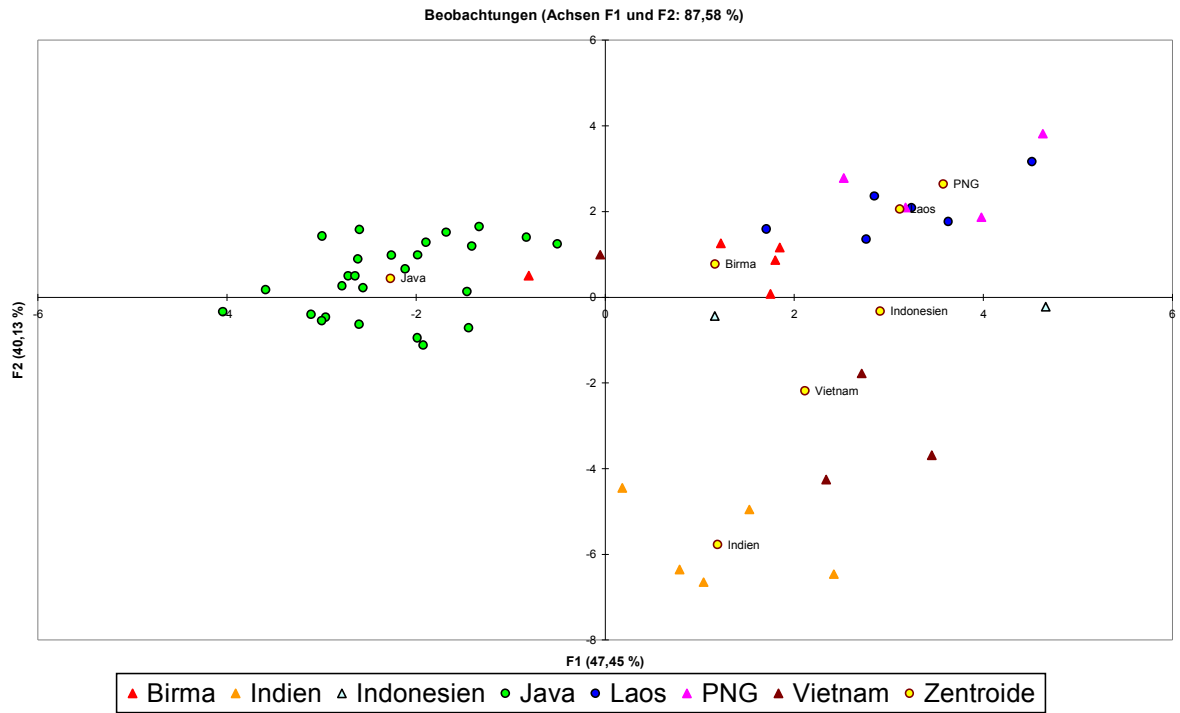
Abbildung 33: Differenzierung (DA) und statistische Kenndaten von Teak unter Einengung auf 5 Regionen aus Asien

Derzeit problematisch bzw. fehleranfälliger verbleiben die Isotopenmuster von Vietnam und von Birma. Beide weisen mit den unterschiedlichsten Regionen Überschneidungen bzw. Ähnlichkeiten auf (Abbildung 33).

Jedoch ist darauf hinzuweisen, dass durch Einengung der möglichen Herkunftsgebiete die Differenzierung wesentlich optimiert werden kann. Um die Differenzierung zu verbessern, können Einzelproben zu Mittelwerten zusammengefasst werden. Aus diesem Grund wurde angestrebt, aus den verschiedenen Regionen jeweils fünf Referenzen aus einer Standort zu erhalten.

Unter Berücksichtigung derartiger Zusammenfassungen von bis zu fünf Proben einer Region ergibt sich eine wesentlich bessere Differenzierungsmöglichkeit der sieben untersuchten Regionen in Asien (Abbildung 34).

Die 52 verschiedenen Mittelwerte weisen eine gesamte Differenzierung von über 96 % auf. Die Differenzierung ist für die fünf schon erwähnten Regionen, bestehend aus Laos, Java, Indien, Papua-Neuguinea und Indonesien, nun vollständig gegeben. Lediglich Birma und Vietnam weisen noch einzelne fehlerhafte Zuordnungen auf.



von \ nach	Birma	Indien	Indonesien	Java	Laos	PNG	Vietnam	Gesamtwert	% korrekt
Birma	4	0	0	1	0	0	0	5	80,00%
Indien	0	5	0	0	0	0	0	5	100,00%
Indonesien	0	0	2	0	0	0	0	2	100,00%
Java	0	0	0	26	0	0	0	26	100,00%
Laos	0	0	0	0	6	0	0	6	100,00%
PNG	0	0	0	0	0	4	0	4	100,00%
Vietnam	1	0	0	0	0	0	3	4	75,00%
Gesamtwert	5	5	2	27	6	4	3	52	96,15%

Abbildung 34: Differenzierung (DA) und statistische Kenndaten von Teak unter Einengung auf 5 Regionen aus Asien

5.4.4 Differenzierung von Teak aus Lateinamerika insbesondere Panama, Costa Rica, Honduras und Brasilien

Ein weiterer Schwerpunkt der Probenziehung von Teak umfasste Regionen aus Lateinamerika. Insbesondere aus den Regionen von Honduras, Costa Rica, Panama und Brasilien konnten Teak-Proben zur Verfügung gestellt werden.

Unter Berücksichtigung aller stabilen Isotope der Bioelemente konnten die mehr als 112 Referenzen anfangs nur vollständig für Honduras differenziert werden. Dies ist auf die besonderen Isotopenverhältnisse von Wasserstoff (D/H) und Sauerstoff ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) in der Region Honduras zurückzuführen (Abbildung 35).

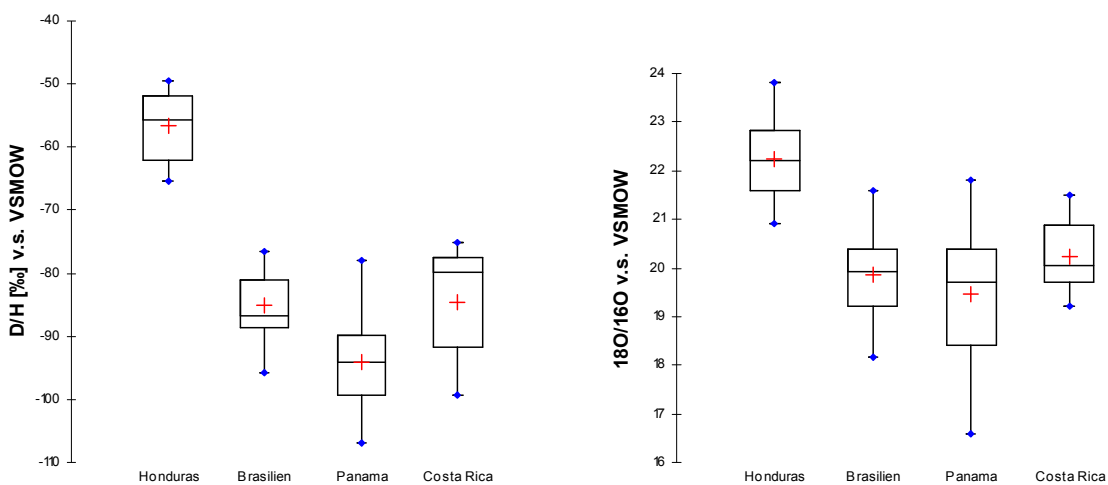
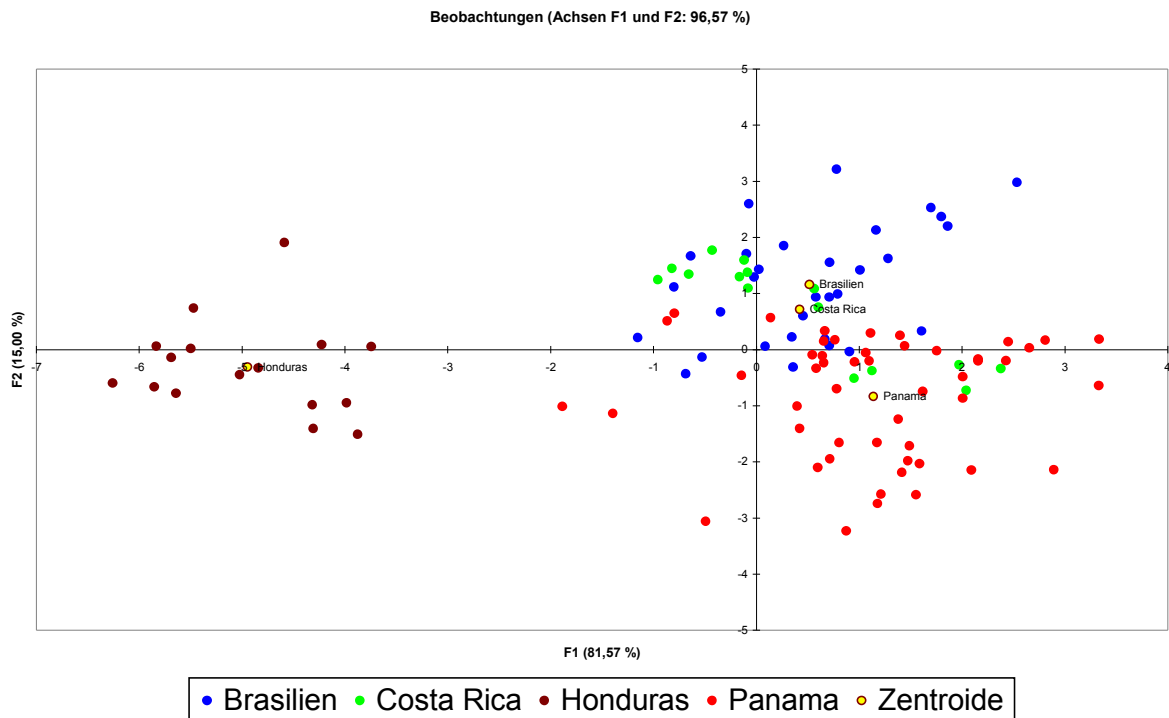


Abbildung 35: Boxplots der D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse der Regionen: Honduras, Brasilien, Panama und Costa Rica im Vergleich

Im Detail weist Honduras gerade in den D/H Isotopenverhältnissen angereicherte Werte auf, die sich signifikant von den weiteren Regionen unterscheiden und eine vollständige Differenzierung dieser Region ermöglichen. Eine entsprechende Anreicherung wird auch für die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen beobachtet, jedoch fehlt die hohe Signifikanz der D/H Isotopenverhältnisse, so dass sich die Messwerte mit denen der drei weiteren Regionen überlappen.

Die drei weiteren Regionen sind weitgehend schlechter bzw. unvollständiger mit Hilfe der stabilen Isotope der Bioelemente (D/H, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) abzugrenzen (Abbildung 36). Lediglich Panama weist ein eindeutiges Isotopenmuster mit einer Wahrscheinlichkeit der Differenzierung von über 94 % gegenüber den übrigen Regionen auf.



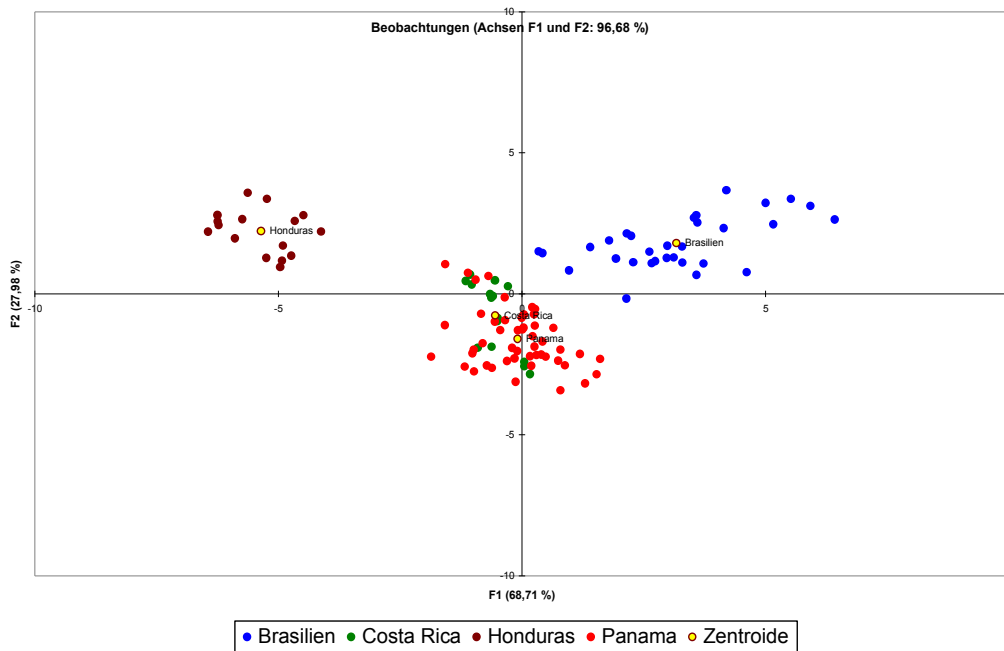
von \ nach	Brasilien	Costa Rica	Honduras	Panama	Gesamtwert	% korrekt
Brasilien	22	1	0	8	31	70,97%
Costa Rica	2	8	0	5	15	53,33%
Honduras	0	0	16	0	16	100,00%
Panama	1	2	0	47	50	94,00%
Gesamtwert	25	11	16	60	112	83,04%

Abbildung 36: Differenzierung (DA) und statistische Kenndaten von Teak aus 4 Regionen von Lateinamerika

Im Zuge des Projektes hat sich herausgestellt, dass die Isotopenverhältnisse des Strontiums kaum eine Verbesserung der Differenzierung liefern, so dass diese häufig nicht dargestellt werden.

Eine Ausnahme ist für die Differenzierung der vier Regionen aus Lateinamerika gegeben. Hier liefern die Strontiumisotope gerade für die brasilianischen Proben eine wesentliche Verbesserung der Differenzierung.

Dies auf die ungewöhnlich angereicherten Isotopenverhältnisse des Strontiums von $0,726 \pm 0,005$ gegenüber $0,711 \pm 0,006$ der übrigen Regionen aus Lateinamerika zurückzuführen. Dadurch kann die Wahrscheinlichkeit der Trennung von etwa 71 % auf 94 % verbessert werden (Abbildung 37).



von \ nach	Brasilien	Costa Rica	Honduras	Panama	Gesamtwert	% korrekt
Brasilien	29	2	0	0	31	93,55%
Costa Rica	0	10	0	5	15	66,67%
Honduras	0	0	16	0	16	100,00%
Panama	0	3	0	47	50	94,00%
Gesamtwert	29	15	16	52	112	91,07%

Abbildung 37: Differenzierung (DA) und statistische Kenndaten von Teak aus Lateinamerika unter Berücksichtigung der $^{87}\text{Sr} / ^{86}\text{Sr}$ Isotope

Dies gilt jedoch nicht für eine Differenzierung der Proben aus Panama und Costa Rica. Auch unter Berücksichtigung der Isotopenverhältnisse des Strontiums verbleibt die Differenzierung insbesondere für Costa Rica mit 67 % unzureichend. Ein wesentliches Problem der Differenzierung ist die kleinräumige Herkunft der Proben. Schlüsselte man die verschiedenen Probennahmen in der Region Panama auf, so ist hervorzuheben, dass Probennahmen gerade im kleinräumigen Abstand von lediglich 50 km zu Costa Rica vollzogen wurden (Abbildung 38).

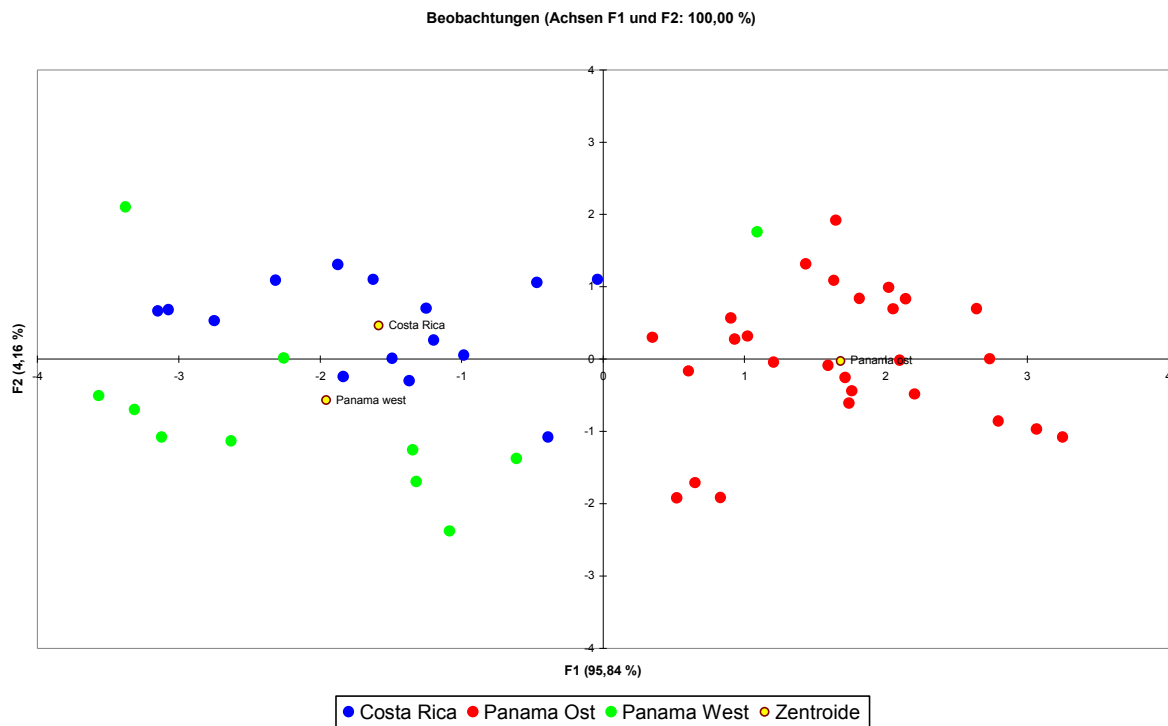


Abbildung 38: Orte der Probenziehung in Panama und Costa Rica

Berücksichtigt man diese kleinräumige Probenahme und teilt die Referenzen in Proben aus Panama-West und Panama-Ost auf, so ergibt sich eine wesentlich verbesserte Differenzierung zwischen diesen Regionen (Abbildung 39).

Das Aufteilen von Panama in einen östlichen und westlichen Teil trägt der Grundlage Rechnung, dass insbesondere die stabilen Isotope von Sauerstoff und Wasserstoff nur im großräumigen Maßstab signifikante Änderungen aufweisen. Die „geologischen“ Isotope, wie Stickstoff, Schwefel und Strontium, können, -jedoch müssen nicht zwingend, kleinräumige Differenzierungen gewährleisten. Deshalb ist es häufig auch hilfreich die Isotopenmuster von Regionen weiter in geographische Untergruppen aufzuteilen.

Dennoch ist auch mit dieser Aufteilung in Ost- und West-Gruppen die Differenzierung weiterhin mit 92 % nicht ausreichend, um Proben aus den Regionen von Costa Rica und Panama vollständig zu trennen.



von \ nach	Costa Rica	Panama ost	Panama west	Gesamtwert	% korrekt
Costa Rica	14	0	1	15	93,33%
Panama Ost	0	27	0	27	100,00%
Panama West	2	1	8	11	72,73%
Gesamtwert	16	28	9	53	92,45%

Abbildung 39: Differenzierung (DA) und statistische Kenndaten der regionalen Aufteilung von Teak aus Panama und Costa Rica.

Zur Gewährleistung der vollständigen Trennung kann die Verknüpfung mit weiteren chemischen Parametern bzw. Inhaltsstoffen des Holzes hilfreich sein. Eine sehr interessante

Erweiterungsmöglichkeit bietet dabei die Nah-Infrarot-Spektroskopie (NIR). Diese Messung ist eine schnelle und zerstörungsfreie Methode, in der zum Beispiel Feststoffe wie Holzpulver mit Infrarotstrahlung des nahen Infrarots bestrahlt werden und die Reflexion des nicht absorbierten Anteils vermessen wird.

Durch die Verwendung des energiereichen nahen Infrarots werden Molekülschwingungen, insbesondere auch von starker chemischer Bindung angeregt, wie z.B. kovalente C-H Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindungen. Als Grundbaustein charakterisieren sie entsprechend die organisch chemischen und damit biochemischen Verbindungen und weiterführend das Agrarprodukt. Sie geben einen chemischen Fingerprint wieder, der zu vielen Zwecken insbesondere der Gehaltsbestimmung eingesetzt werden kann [NICOLAI 2007]. Dabei treten in diesem Nah-Infrarot-Bereich eine Vielzahl von Grund- und Kombinationsschwingungen auf, die zu ausgeprägten Überlappungen der Absorptionsbanden führen. Das Spektrum ist somit nicht direkt auswertbar, sondern die benötigte Information muss anhand von Referenzproben chemometrisch ermittelt werden. Im Gegensatz zur Stabil-Isotopen-Methode, in der ein physikalischer Fingerprint gegeben ist, liegt in der NIR-Messung ein chemischer vor. Es liegt nahe, dass dies ebenfalls für eine Herkunftsbestimmung eine gute Ergänzung sein kann.

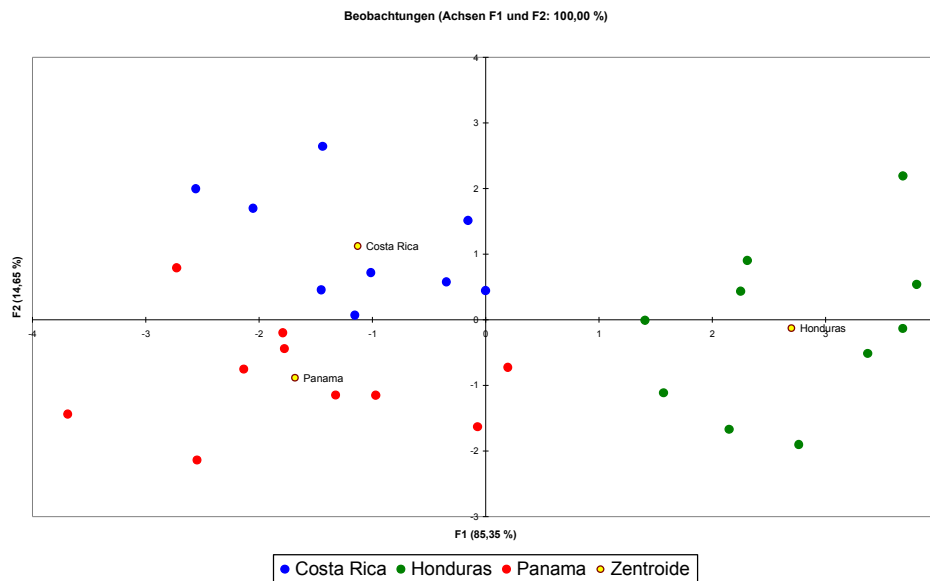
Die NIR Messung liefert üblicherweise über das Spektrum eine Vielzahl von Parametern. So standen 2307 Parameter aus dem Wellenzahlbereich von 3600 bis 12500 zur Verfügung. Daraus wurde der Wellenzahlbereich von 3800 bis 8000 ausgewertet und durch eine Überführung in Steigungsvariablen normalisiert.

Mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) wird die Datenmenge reduziert, so dass abschließend mit 10 Parametern aus der Hauptkomponentenanalyse annähernd 90 % der ursprünglichen Dateninformationen zur Verfügung stehen.

Diese Konzentration der Datenmenge ist notwendig, da sonst leicht die Parametervielfalt zu Differenzierungen führen kann, die nur aus der hohen Anzahl der Parameter resultiert und praktisch jedes Material von dem anderen unterschieden werden kann..

In der NIR Analyse konnten 29 Proben aus Costa Rica, Honduras und Panama analysiert werden.

Diese 29 Proben konnten schon mit Hilfe der stabilen Isotope der Bioelemente, insbesondere Wasserstoff, Sauerstoff und Kohlenstoff, weitgehend differenziert werden (Abbildung 40). So liegt eine Differenzgüte von dieser eingeschränkten Anzahl von untersuchten Proben von 93 % vor.



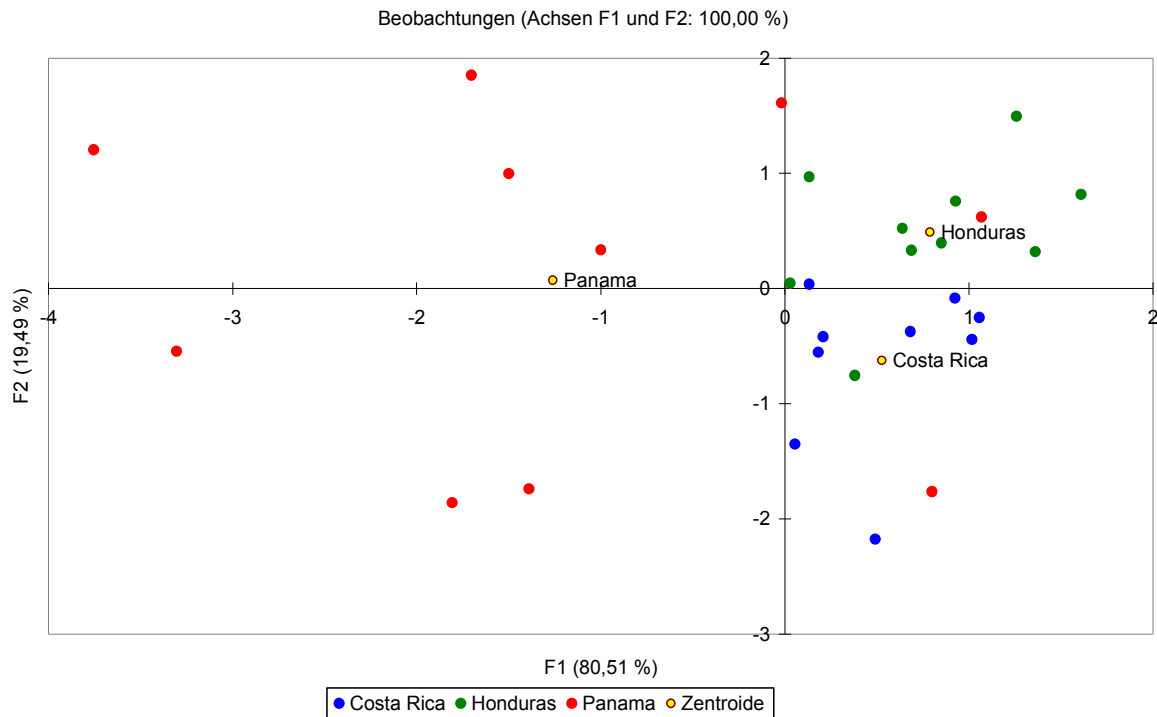
von \ nach	Costa Rica	Honduras	Panama	Gesamtwert	% korrekt
Costa Rica	8	0	1	9	88,89%
Honduras	0	10	0	10	100,00%
Panama	1	0	9	10	90,00%
Gesamtwert	9	10	10	29	93,10%

Abbildung 40: Differenzierung (DA) und statistische Kenndaten von Teak aus Costa Rica, Honduras und Panama ausgewählt für die weitergehende Differenzierung mit NIR

Äquivalent wurden diese Proben ebenfalls mit den 3 wichtigsten Parametern aus der PCA-NIR-Analyse ausgewertet. Diese 3 Parameter enthalten kumuliert 62 % der ursprünglichen Information aus der NIR-Spektroskopie. Die Beschränkung auf 3 Parameter dient in erster Linie des direkten Vergleichs der Aussagekraft von NIR und Stabil-Isotopen-Daten.

Unter alleiniger Berücksichtigung dieser NIR-Daten liegt keine signifikante bzw. sogar eine wesentlich schlechtere Differenzierung vor (Abbildung 41). So ist nur eine Differenzierungsgüte des eingeschränkten Datensatzes von 75 % gegeben. Insbesondere Panama und Costa Rica weisen dabei nur eine schlechte Differenzierung zwischen 66 bis 70 % auf.

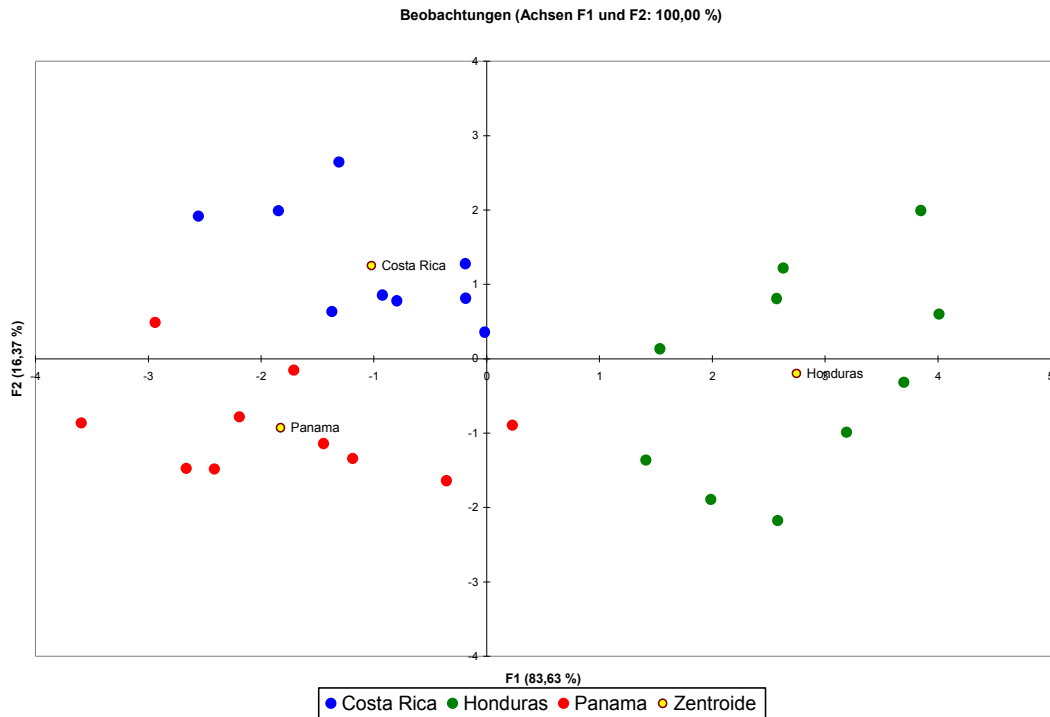
Jedoch ist hervorzuheben, dass Honduras durchaus mit Hilfe der NIR-Daten zu differenzieren ist. Immerhin weisen die Proben eine Differenzierung von 90 % auf. Daraus kann abgeleitet werden, dass die NIR-Analytik Möglichkeiten bietet, die Differenzierung in Kombination mit Hilfe der stabilen Isotope zu verbessern. Das muss aber noch weiter ausgearbeitet werden, da die Spektren selbst nur durch chemometrische Analysen ausgelesen werden können.



von \ nach	Costa Rica	Honduras	Panama	Gesamtwert	% korrekt
Costa Rica	6	3	0	9	66,67%
Honduras	1	9	0	10	90,00%
Panama	1	2	7	10	70,00%
Gesamtwert	8	14	7	29	75,86%

Abbildung 41: Differenzierung (DA) und Kenndaten der NIR-Analyse der ausgewählten 29 Proben von Teak aus den Regionen Costa Rica, Honduras und Panama

So kann in Kombination der drei stabilen Isotope (D/H , $^{13}C/^{12}C$, $^{18}O/^{16}O$) und des wichtigsten Parameters aus der PCA-NIR-Analyse, der 35 % der ursprünglichen Information enthielt, eine vollständige Trennung von Panama, Costa Rica und Honduras erreicht werden (Abbildung 42). Die Kombination der beiden Methoden steht derzeit noch am Anfang und muss sowohl ausgetestet, als auch für weitere Referenzen kalibriert werden.



von \ nach	Costa Rica	Honduras	Panama	Gesamtwert	% korrekt
Costa Rica	9	0	0	9	100,00%
Honduras	0	10	0	10	100,00%
Panama	0	0	10	10	100,00%
Gesamtwert	9	10	10	29	100,00%

Abbildung 42: Differenzierung (DA) und Kenndaten der NIR und der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H der ausgewählten 29 Proben von Teak aus den Regionen Costa Rica, Honduras und Panama

5.4.5 Kombination von NIR und Stabil-Isotopen-Methode

Aufgrund der Ergebnisse aus den ersten NIR-Analysen (siehe Kapitel 5.4.4) wurde die NIR-Analytik auf verschiedene andere Beprobungsregionen von Teak ausgedehnt.

Insgesamt wurden 99 Proben aus 9 verschiedenen Ländern aus Asien und Mittelamerika untersucht.

Diese 99 Proben lassen sich mit den Isotopen der Bioelemente (D/H, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) in vielen Fällen nur unzureichend differenzieren. Lediglich für Laos (100 %) und Honduras (100 %) als auch zweitrangig für Brasilien und Java liegen vollständige bzw. gute Zuordnungen vor (Abbildung 43).

von \ nach	Brasilien	Costa Rica	Honduras	Indonesien	Java	Laos	PNG	Panama	Vietnam	Gesamtwert	% korrekt
Brasilien	12	1	0	1	0	0	0	0	0	14	85,71%
Costa Rica	3	3	0	2	0	0	1	0	0	9	33,33%
Honduras	0	0	10	0	0	0	0	0	0	10	100,00%
Indonesien	1	0	0	6	1	0	1	0	0	9	66,67%
Java	2	0	0	0	12	0	0	0	0	14	85,71%
Laos	0	0	0	0	0	13	0	0	0	13	100,00%
PNG	0	0	0	2	0	0	6	2	0	10	60,00%
Panama	0	0	0	0	1	0	1	6	2	10	60,00%
Vietnam	0	1	1	1	0	0	0	3	4	10	40,00%
Gesamtwert	18	5	11	12	14	13	9	11	6	99	72,73%

Abbildung 43: Kenndaten der Diskriminanzanalyse (DA) der stabile Isotope der Bioelemente von Teak aus Lateinamerika und Asien

Auch unter Ausnutzung der 8 wichtigsten PCA-NIR-Parameter, die mehr als 85 % der ursprünglichen Information enthalten, kann vordergründig keine bessere Differenzierungsleistung durch die NIR-Analyse erbracht werden (siehe Abbildung 44). Die Differenzierungsgüte sank im Gegenteil auf 67 %. Erschwerend ist dabei, dass keine deutlichen Muster auftreten. So konnten mit Hilfe der stabilen Isotope der Bioelemente zumindest Honduras und Java jederzeit vollständig differenziert werden. Auch lagen für Brasilien und Java gute Wahrscheinlichkeiten der Differenzierung oberhalb von 85 % vor. Eine derartige Signifikanz von regionalen Mustern liegt unter Betrachtung der verwendeten NIR-Daten nicht vor.

von \ nach	Brasilien	Costa Rica	Honduras	Indonesien	Java	Laos	PNG	Panama	Vietnam	Gesamtwert	% korrekt
Brasilien	11	0	1	2	0	0	0	0	0	14	78,57%
Costa Rica	0	7	1	0	0	0	0	0	1	9	77,78%
Honduras	0	2	8	0	0	0	0	0	0	10	80,00%
Indonesien	0	0	1	6	0	0	2	0	0	9	66,67%
Java	0	3	0	0	10	1	0	0	0	14	71,43%
Laos	0	3	0	0	1	9	0	0	0	13	69,23%
PNG	2	0	2	0	0	1	3	2	0	10	30,00%
Panama	0	1	1	0	0	1	0	6	1	10	60,00%
Vietnam	0	0	2	1	0	0	0	0	7	10	70,00%
Gesamtwert	13	16	16	9	11	12	5	8	9	99	67,68%

Abbildung 44: Kenndaten der Diskriminanzanalyse (DA) der NIR-Analyse von Teak aus Lateinamerika und Asien

Die Kombination der stabilen Isotope der Bioelemente mit den 3 wichtigsten PCA-NIR Parametern (enthalten 62 % der ursprünglichen Information) weist jedoch ein anderes Bild auf (Abbildung 42). So steigert die Kombination die Differenzierungsgüte erheblich auf annähernd 88 % (Abbildung 45).

von \ nach	Brasilien	Costa Rica	Honduras	Indonesien	Java	Laos	PNG	Panama	Vietnam	Gesamtwert	% korrekt
Brasilien	14	0	0	0	0	0	0	0	0	14	100,00%
Costa Rica	0	7	0	2	0	0	0	0	0	9	77,78%
Honduras	0	0	10	0	0	0	0	0	0	10	100,00%
Indonesien	0	0	0	7	1	0	1	0	0	9	77,78%
Java	1	0	0	0	13	0	0	0	0	14	92,86%
Laos	0	1	0	0	0	12	0	0	0	13	92,31%
PNG	0	0	0	0	0	0	10	0	0	10	100,00%
Panama	0	0	0	0	0	0	1	8	1	10	80,00%
Vietnam	0	1	1	0	0	0	0	2	6	10	60,00%
Gesamtwert	15	9	11	9	14	12	12	10	7	99	87,88%

Abbildung 45: Kenndaten der Diskriminanzanalyse (DA) der Kombination der stabilen Isotope der Bioelemente mit der NIR-Analyse von Teak aus Lateinamerika und Asien.

Mit Hilfe dieser Kombination aus 8 Parametern kann nun ebenfalls Brasilien vollständig getrennt werden. Abweichend sollte jedoch erwähnt werden, dass diese vollständige Trennung auch mit Hilfe der Isotope des Strontiums erreicht werden kann, da insbesondere Brasilien die schon angeführten angereicherten Isotopenverhältnisse des Strontiums aufweist.

Auffallend ist die signifikante Verbesserung der Differenzierung von Papua Neuguinea, die von 30 % auf 100 % gesteigert wird.

Natürlich kann die Parameteranzahl durch die NIR Spektroskopie jederzeit drastisch erhöht werden, jedoch besteht dabei die Gefahr, dass sich schon durch die steigende Anzahl der Parameter eine immer feinere Differenzierung ergibt. Im Zuge weiterer Analysen könnte getestet werden, welchen Nutzen die NIR-Analyse für eine verbesserte Differenzierung erbringen kann. Diese ersten Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass diese NIR-Analyse eine ideale Ergänzung zu den Stabil-Isotopen-Daten darstellt.

5.4.6 Differenzierung von Teak aus Lateinamerika unter besonderer Berücksichtigung von Teak aus Ghana (Afrika)

Neben Proben aus Asien und Mittelamerika konnten ebenfalls Teakproben aus Afrika, insbesondere Ghana, im Rahmen des Projektes zur Verfügung gestellt werden.

Die Probenziehung war in Ghana äußerst umfangreich. So stehen derzeit 337 verschiedene Holzproben aus Ghana zur Verfügung. Neben 70 Teakproben setzt sich der überwiegende Teil aus 207 Mahagoni Proben zusammen (u.a. sog. afrikanisches Mahagoni; Sapeli, Sipo, und Kaya). Die weiteren Proben sind Holzproben der Familien von *Malvaceae*, *Moraceae* und *Sapotaceae*.

Die 70 Teakproben aus Ghana weisen im Vergleich mit den Proben aus Mittelamerika sehr angereicherte $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse auf. Hiermit können die Proben aus Ghana weitgehend von den Proben aus Lateinamerika getrennt werden. Lediglich mit den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenmustern der Proben aus Honduras gibt es Überlappungen und eine vollständige Differenzierung mit Honduras liegt damit nicht vor.

Auffallend ist jedoch, dass sich diese Signifikanz der Differenzierung nicht in den D/H Isotopenverhältnissen widerspiegelt (Abbildung 46).

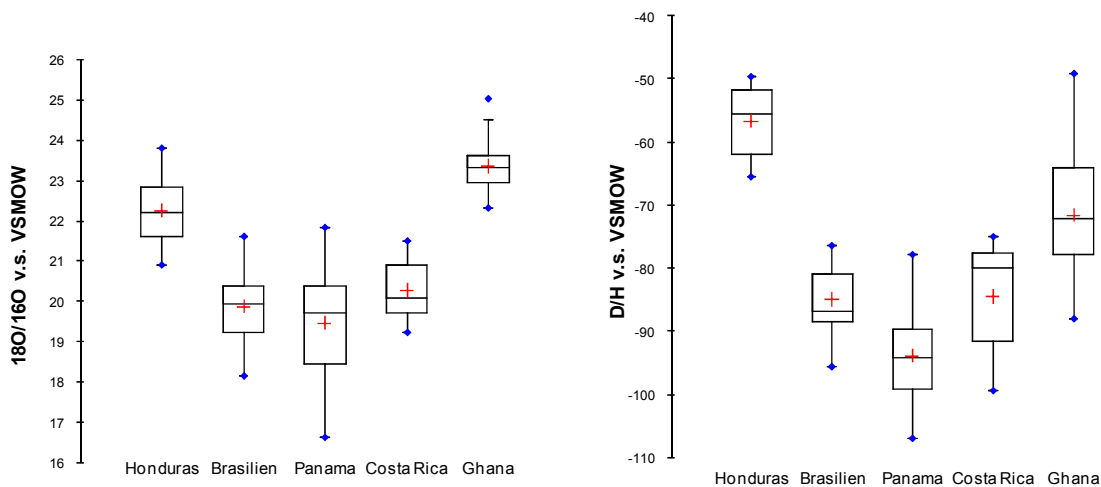


Abbildung 46: Boxplots der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse der Regionen: Honduras, Brasilien, Panama, Costa Rica und Ghana im Vergleich

Unter alleiniger Berücksichtigung der D/H Isotopenverhältnisse könnte nur eine unzureichende Differenzierung von den vier Regionen aus Lateinamerika gewährleistet werden.

Diese unterschiedlichen Möglichkeiten der Differenzierung bzw. Aussagekraft der stabilen Isotope des Wasserstoffs (D/H) und Sauerstoffs ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) sind im direkten Vergleich mit den Isotopenmustern aus Honduras völlig gegenläufig. Wie schon dargestellt, weisen nicht die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ sondern nur die D/H Isotopenverhältnisse der Proben aus Honduras die notwendige Signifikanz auf, damit eine vollständige Differenzierung von den weiteren Proben aus Lateinamerika gewährleistet werden kann.

Durch diese Besonderheit ergibt sich eine direkte Lösungsmöglichkeit, um eine nahezu vollständige Differenzierung von Honduras und Ghana zu gewährleisten.

Wie schon in der Grundlage der D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse dargestellt, liegt eine direkte Korrelation (meteoric water line) der stabilen Isotope im Wasser vor. Diese Korrelation wird letztlich direkt durch den Wasserhaushalt und durch die Biochemie der Pflanze beeinflusst bzw. fraktioniert. Berücksichtigt man, dass es sich bei beiden Ländern um echten Teak (*Tectonia grandis*) handelt und somit die biochemischen Voraussetzungen identisch sind, kann ein Grund für diese Unterschiede im Wasserhaushalt der Bäume liegen, beeinflusst durch die Gegebenheiten der jeweiligen Region.

Ein möglicher Hinweis auf solche Unterschiede bietet der Verlauf der Niederschlagsmenge, der exemplarisch für die Orte Tegucigalpa (Honduras) und Accra (Ghana) (Abbildung 47) dargestellt wird.

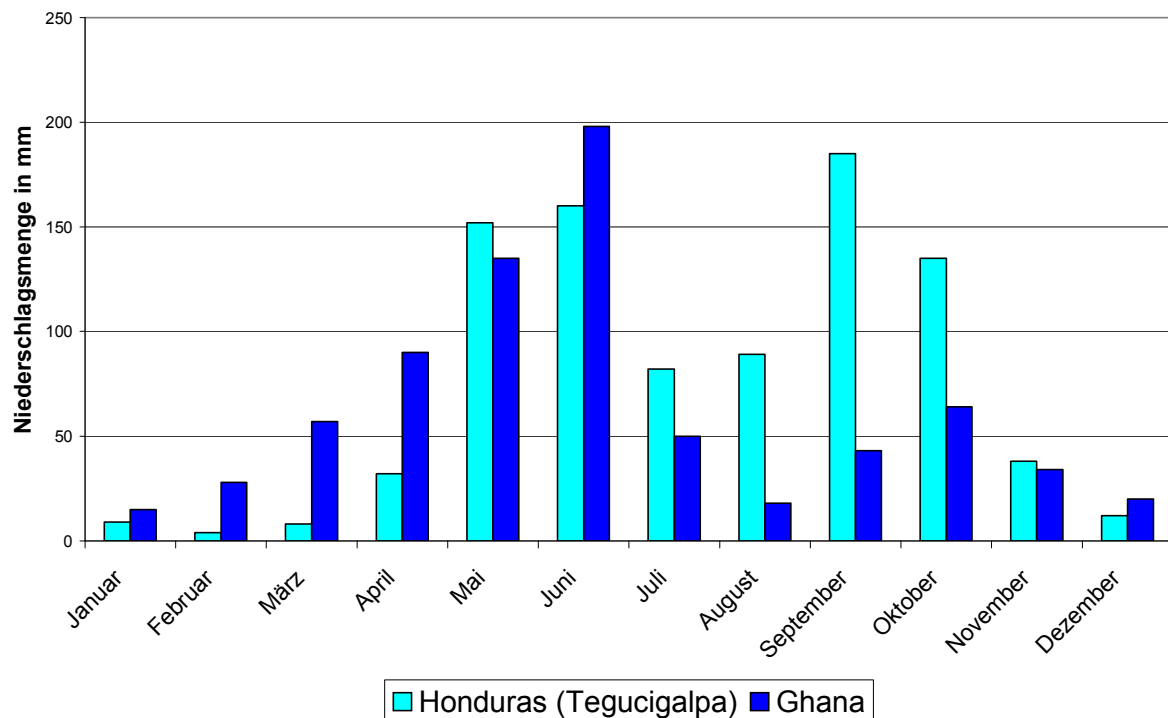


Abbildung 47: exemplarischer Jahresverlauf der Niederschlagsmenge in Honduras und Ghana

Die jährliche Gesamtniederschlagsmenge ist in diesem Zusammenhang nicht wesentlich von Bedeutung. So weist im vorliegenden Beispiel Honduras mit 906 mm gegenüber Ghana mit 752 mm eine höhere Niederschlagsmenge auf.

Entscheidender ist jedoch, dass der Teakbaum, wie letztendlich alle Pflanzen, einer kontinuierlichen Versorgung mit Wasser bedarf. Bei den stetigen Wasserverlusten wird gleichzeitig das Gewebewasser durch einen Effekt, der der Destillation entspricht, an den schwereren Isotopen des Wasser- und des Sauerstoffs angereichert.

Nur in drei Monaten des Jahres, von April bis Juni, ist nun die Niederschlagsmenge in Ghana vergleichbar mit der Niederschlagsmenge von Honduras. Im Zeitraum von Mai bis Oktober steht in der Region Honduras über einen längeren Zeitraum mehr Wasser zur Verfügung.

Dies beeinflusst letztlich die Transpiration und entsprechend besonders die Anreicherung der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse in der Cellulose des Teakbaumes. Es ist anzunehmen, dass dies noch durch die gegebene regionale Temperatur verstärkt wird, die im Mittel in Ghana bei 26°C und in Honduras bei 22°C liegt.

Diese Arbeitshypothese müsste sicherlich noch überprüft werden.

Ein Resultat aus der tendenziell stärkeren Anreicherung der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse im Gewebewasser und später ebenfalls in der Cellulose ist zwangsläufig eine größere Abweichung der Korrelation der D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse von der meteoric water line.

Setzt man nun die meteoric water line als Grundlage des Wassers in den Regionen voraus, was die experimentelle Erfahrung bestätigt, so ist es möglich die Abweichung von dieser meteoric water line als Korrelationszahl (Deuterium-Überschuss = d-excess) als Umformung von Gleichung (in Kapitel 5.2.1) zu beschreiben.

Diese Korrelationszahl (d-excess) ist gegeben durch: $\text{d-excess} = ((\delta D - 10)/8) - \delta^{18}\text{O}$

Durch Ermittlung der Korrelationszahl lässt sich Ghana damit nahezu vollständig von Honduras trennen und stellt damit eine weitere Verbesserung der Differenzierung im Vergleich zu dem schon vorher angeführten $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse dar. (Abbildung 48).

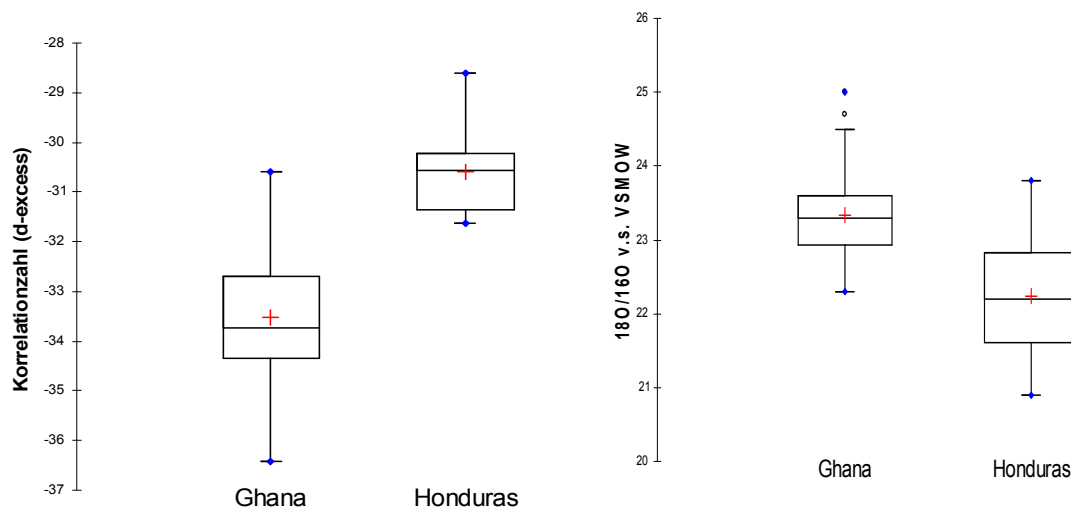
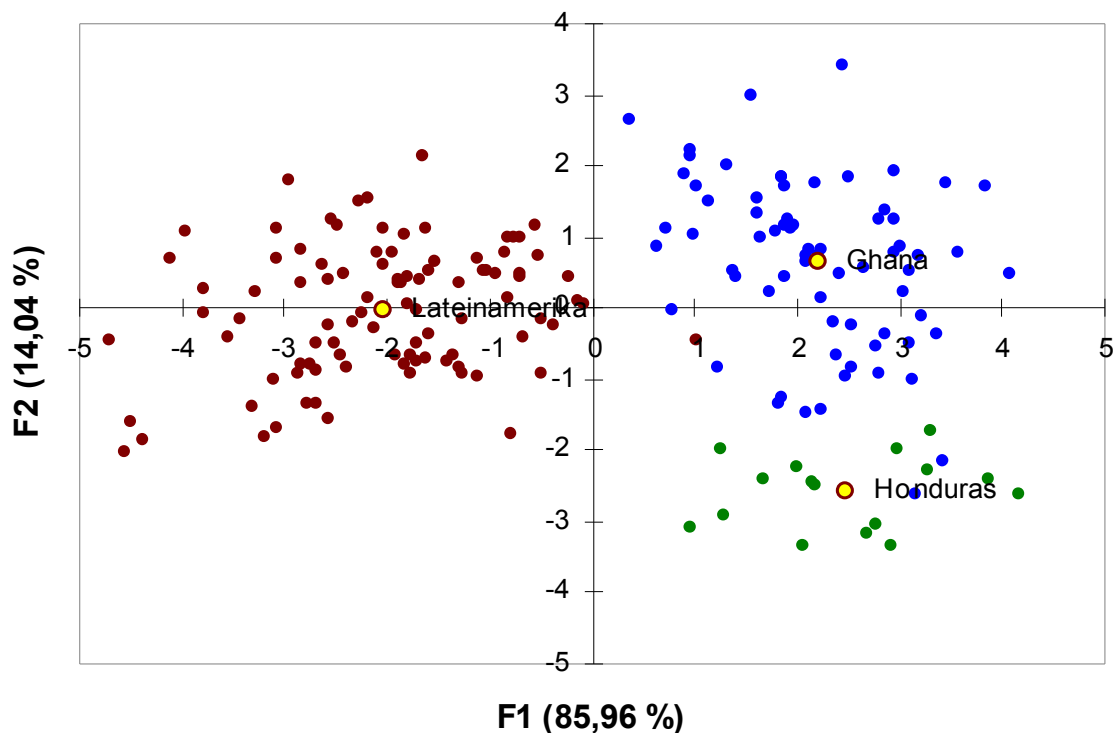


Abbildung 48: Boxplot der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse von Teak (Cellulose) der Regionen: Ghana und Honduras im Vergleich zum Boxplot der Korrelationszahl der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse (d-excess)

Unter Berücksichtigung aller stabilen Isotope der Bioelemente ergibt sich schon durch die angeführte Besonderheit eine signifikante Wahrscheinlichkeit der Differenzierung für die Proben aus Ghana von über 95 % (Abbildung 49).

Innerhalb des Probenkollektivs aus Ghana liegen unter Berücksichtigung von 70 Proben nur noch 3 Fehlzugeordnungen zu Honduras vor. Eine Fehlzugeordnung zum Cluster aus Honduras ist bei einer Probe aus Lateinamerika gegeben. Insgesamt kann mit einer Differenzierungsgüte von annähernd 98 % von einer signifikanten Trennmöglichkeit der Proben aus Ghana zu Lateinamerika ausgegangen werden.

Beobachtungen (Achsen F1 und F2: 100,00 %)



von \ nach	Ghana	Honduras	Lateinamerika	Gesamtwert	% korrekt
Ghana	67	3	0	70	95,71%
Honduras	0	16	0	16	100,00%
Lateinamerika	1	0	95	96	98,96%
Gesamtwert	68	19	95	182	97,80%

Abbildung 49: Differenzierung (DA) und Kenndaten von Proben aus Lateinamerika insbesondere Honduras im Vergleich zu Proben aus Ghana.

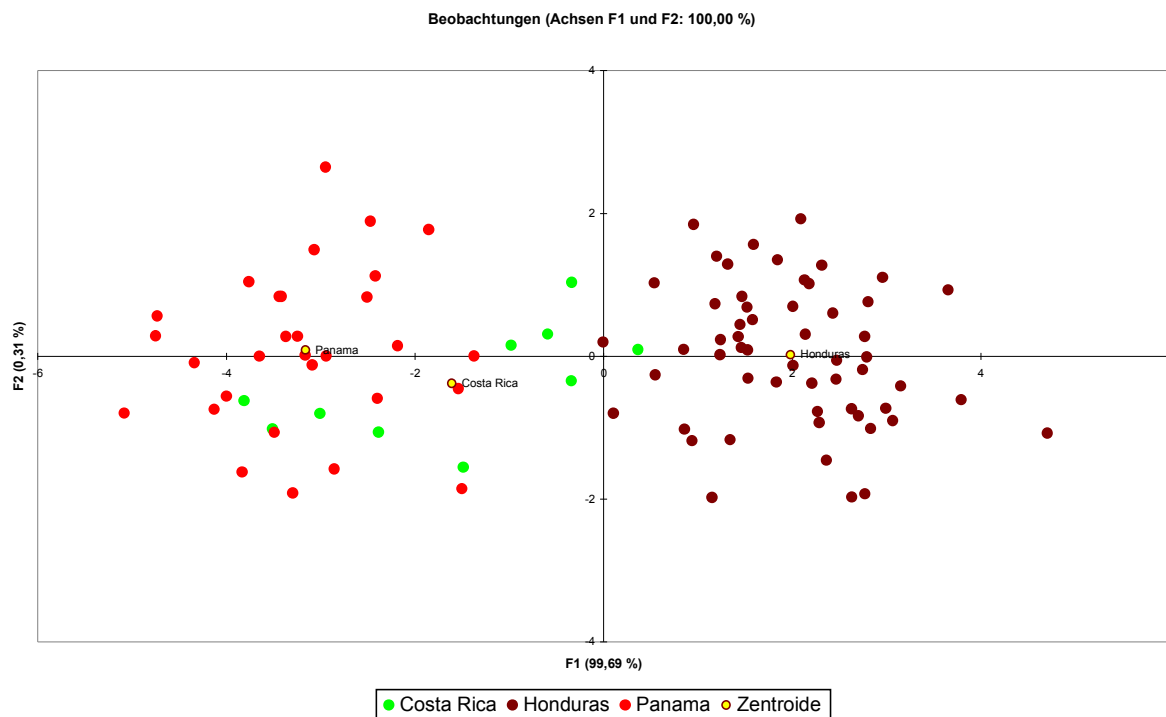
5.5 Differenzierung von Mahagoni-Arten aus Lateinamerika

Neben Teak wurden ebenfalls als zweite Variante in den Probenziehungen Mahagoni-Arten berücksichtigt. Im Wesentlichen konzentrierten sich die Herkünfte der Proben aus Mittelamerika. So wurden annähernd 100 Proben aus Mittelamerika insbesondere Costa Rica, Panama und Honduras in die Analyse der stabilen Isotope einbezogen.

Unter Berücksichtigung der stabilen Isotope der Bioelemente sind ähnliche Möglichkeiten der Differenzierung gegeben, wie sie auch schon beim Teak aufgezeigt worden sind.

Honduras kann unter Berücksichtigung der drei Länder jederzeit vollständig differenziert werden. Zwischen Panama und Costa Rica sind wiederum signifikante Überschneidungen vorhanden, so dass die Differenzierung zwischen diesen beiden Regionen nur bei 65 % liegt (Abbildung 50).

Zur Auflösung dieser Überschneidung kann wiederum die NIR Analyse nützlich sein, welches jedoch im Rahmen des Projektes nicht mehr ausgetestet werden konnte.



von \ nach	Costa Rica	Honduras	Panama	Gesamtwert	% korrekt
Costa Rica	4	2	4	10	40,00%
Honduras	0	56	0	56	100,00%
Panama	3	0	27	30	90,00%
Gesamtwert	7	58	31	96	90,63%

Abbildung 50: Differenzierung (DA) und Kenndaten der stabilen Isotope der Bioelemente von Mahagoni-Proben aus Costa Rica, Honduras und Panama im Vergleich

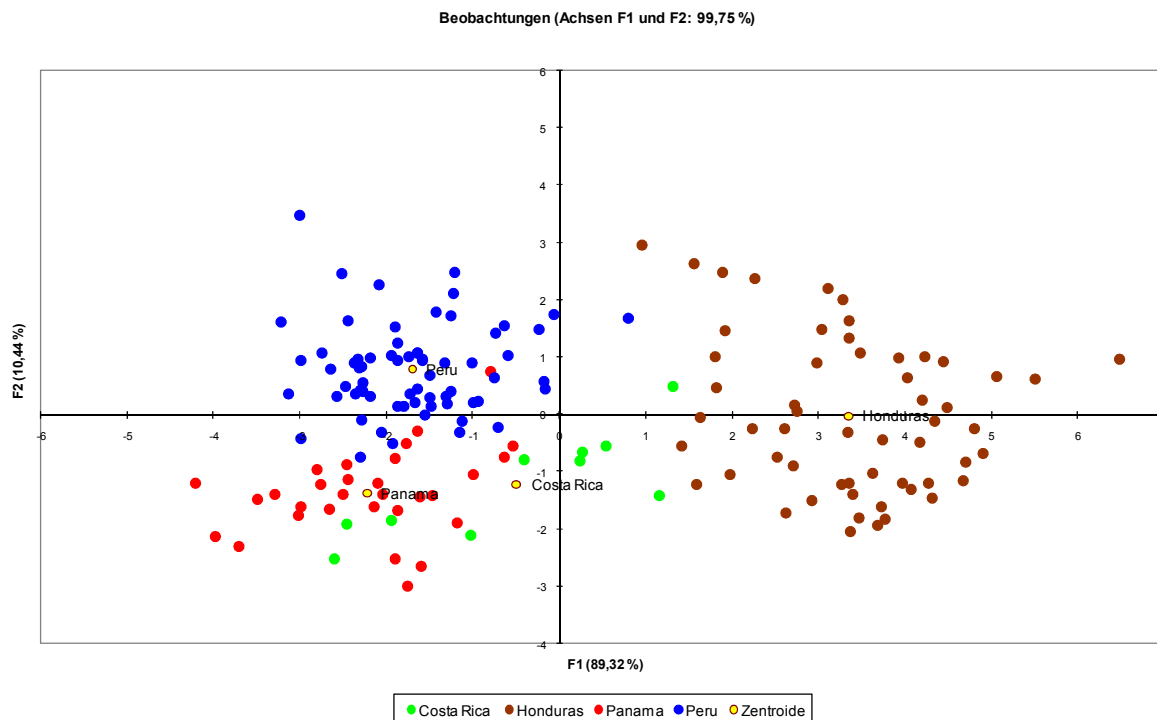
5.5.1 Differenzierung von Mahagoni-Arten aus Mittelamerika unter besondere Berücksichtigung von Peru

Abweichend zur Probenahme von Teak stand als vierte Region aus Lateinamerika nicht Brasilien sondern Peru zur Verfügung. Aus dieser Region wurden 70 Proben von Mahagoni (*Swietenia macrophylla*) gezogen.

Diese weisen in den D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen im Mittel mit -83,4 ‰ (D/H) und 19,6 ‰ ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) ähnliche Werte zu Panama mit -79,3 ‰ und 20,4 ‰ auf. Tendenziell tendiert das Probenkollektiv aus Peru jedoch zu abgereicherten Isotopenverhältnissen und unterscheidet sich damit signifikant von den weiteren drei Regionen aus Mittelamerika (siehe auch die korrespondierende tendenzielle Abreicherung in Richtung Panama, Abbildung 51).

Ein wesentlicher Unterschied dieser beiden Probenkollektive ist jedoch in den $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnissen zu finden. Diese unterscheiden sich in Panama mit Isotopenverhältnissen im Mittel von 0,2 ‰ signifikant von den angereicherten $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnissen in Peru mit einem Mittelwert von +3,3 ‰.

Entsprechend kann ebenfalls eine signifikante Differenzierung von 97 % für die Region Peru erreicht werden (Abbildung 51).



von \ nach	Costa Rica	Honduras	Panama	Peru	Gesamtwert	% korrekt
Costa Rica	4	2	4	0	10	40,00%
Honduras	0	55	0	1	56	98,21%
Panama	1	0	25	4	30	83,33%
Peru	0	0	2	66	68	97,06%
Gesamtwert	5	57	31	71	164	91,46%

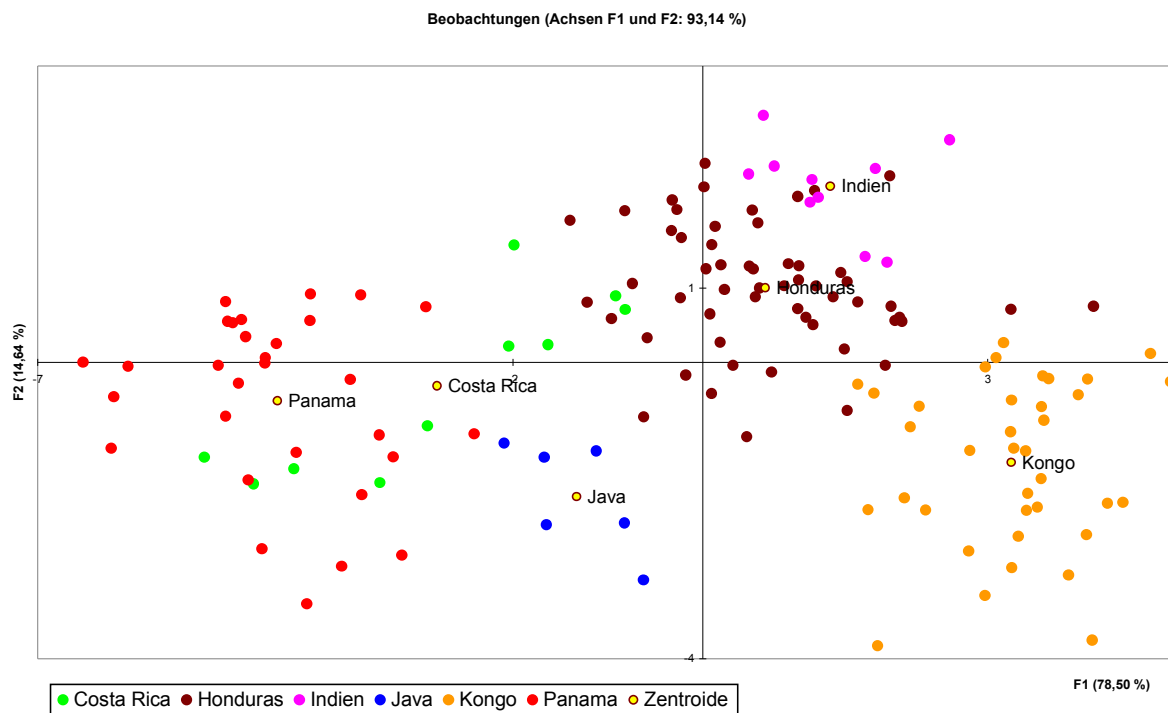
Abbildung 51: Differenzierung (DA) und Kenndaten der stabilen Isotope der Bioelemente von Mahagoni-Proben aus Costa Rica, Honduras, Panama und Peru im Vergleich

5.5.2 Weitergehende Differenzierung von Mahagoni-Arten aus Mittelamerika unter Berücksichtigung von Kongo, Indien und Ghana

Neben den 166 Mahagoni-Proben aus Mittelamerika wurden 37 Mahagoni-Proben aus Kongo (Afrika), 10 aus Indien und 6 aus Java (Asien) in die Analyse der stabilen Isotope der Bioelemente miteinbezogen. Entsprechend stehen aus diesen 6 Regionen 149 Proben zur Verfügung.

Mit der schon erörterten Ausnahme von Costa Rica liegt für die sechs weiteren Regionen eine nahezu signifikante Wahrscheinlichkeit der Differenzierung vor (Abbildung 52). Java und Indien weisen dabei Isotopenmuster auf, die eine vollständige Differenzierung gewährleisten. Jedoch ist darauf hinzuweisen, dass aus diesen beiden Regionen nur eine geringe Anzahl an Proben zur Verfügung steht, so dass diese hohe Signifikanz nur als erster Kenntnisstand gewertet kann.

Ebenfalls weisen die Proben aus dem Kongo eine signifikante Differenzierung von annähernd 95 % auf. Dies entspricht dem Kenntnisstand der Teakproben aus Ghana, die ebenfalls signifikant von Proben aus Lateinamerika zu differenzieren waren.



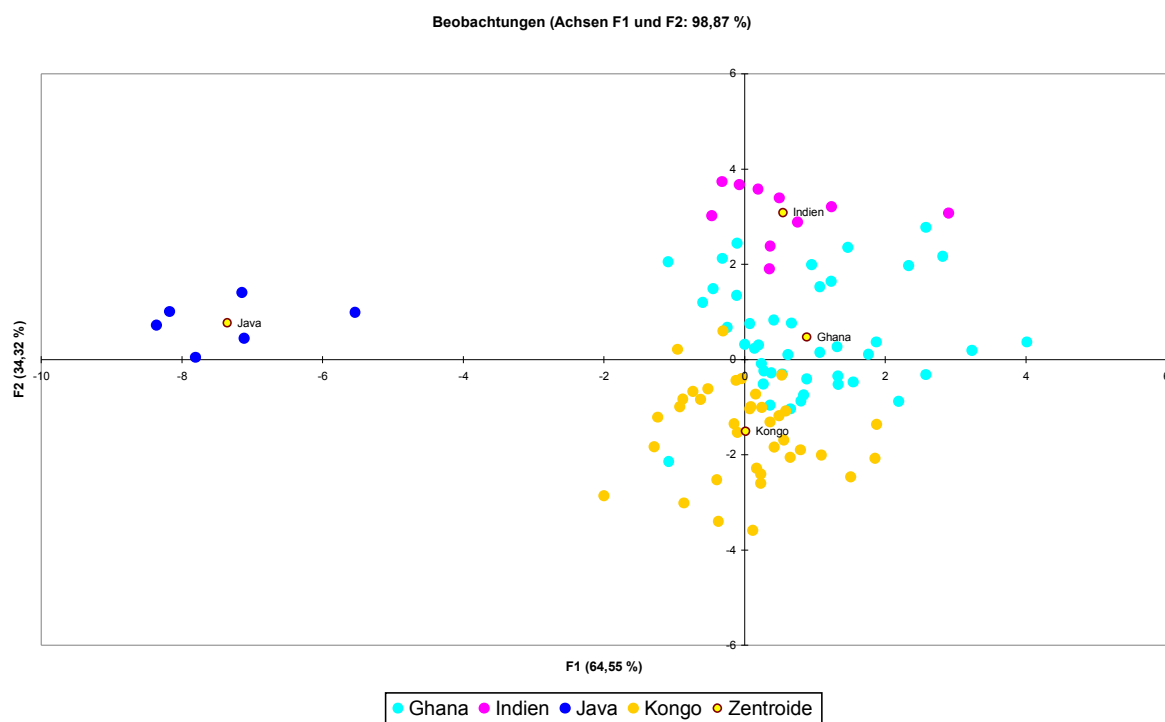
von \ nach	Costa Rica	Ghana	Honduras	Indien	Java	Kongo	Panama	Gesamtwert	% korrekt
Costa Rica	3	0	3	0	0	0	4	10	30,00%
Ghana	0	30	8	0	0	5	0	43	69,77%
Honduras	0	6	48	1	1	0	0	56	85,71%
Indien	0	0	0	10	0	0	0	10	100,00%
Java	0	0	0	0	6	0	0	6	100,00%
Kongo	0	5	1	0	0	31	0	37	83,78%
Panama	1	0	0	0	2	0	27	30	90,00%
Gesamtwert	4	41	60	11	9	36	31	192	80,73%

Abbildung 52: Differenzierung (DA) und Kenndaten der stabilen Isotope der Bioelemente von Mahagoni-Proben aus Lateinamerika (Costa Rica, Panama, Honduras), sowie Mahagoni aus Asien (Indien, Java) und Afrika (Kongo).

Es wurde in diesem Zusammenhang schon darauf hingewiesen, dass gerade aus Ghana umfangreiche Proben von Mahagoni- Arten zur Verfügung gestellt werden konnten.

Aufgrund der enormen Probenanzahl war es möglich, die Proben in Probenkollektiven bestehend aus fünf Proben der lokalen Probenziehung zusammenzufassen. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, ein robusteres Probenkollektiv zu erhalten.

Sicherlich ist im ersten Schritt interessant, ob sich dieses Probenkollektiv signifikant von einer weiteren afrikanischen Region: Kongo unterscheiden lässt. Dies ist mit Wahrscheinlichkeiten von ca. 90 % gegeben (Abbildung 53). Es liegen in der Zuordnung der 80 Proben / Probenkollektive aus dem Kongo und Ghana lediglich 6 Fehlzusordnungen vor. Daneben sind ebenfalls die Regionen von Java und Indien gut zu differenzieren.



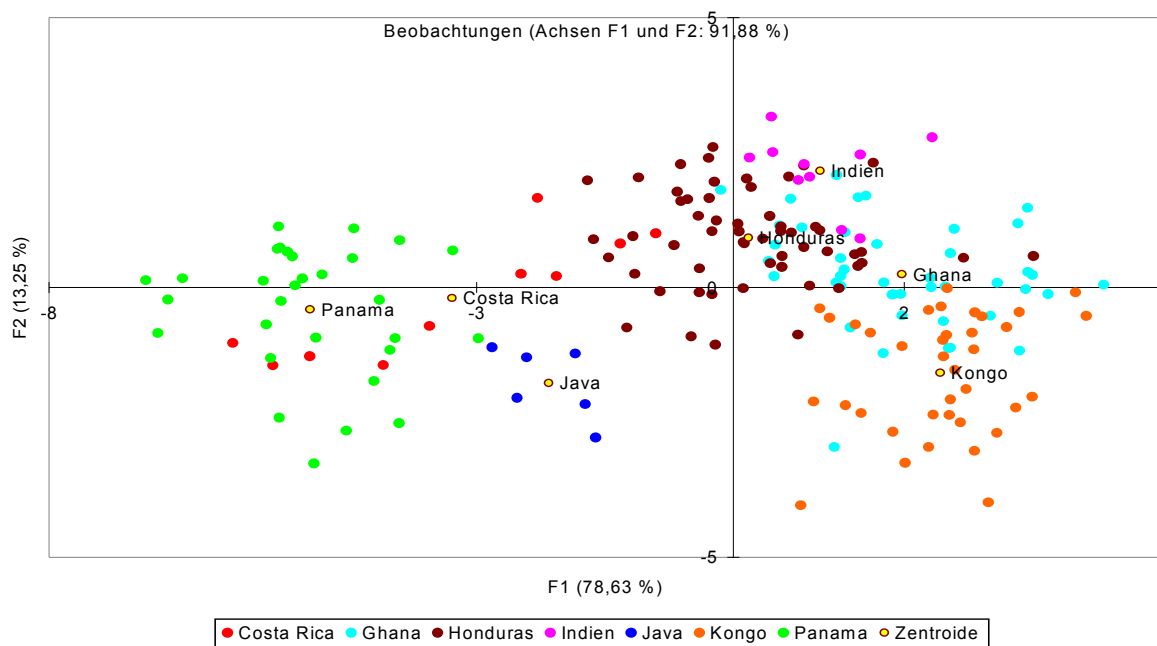
von \ nach	Ghana	Indien	Java	Kongo	Gesamtwert	% korrekt
Ghana	38	2	0	3	43	88,37%
Indien	1	9	0	0	10	90,00%
Java	0	0	6	0	6	100,00%
Kongo	3	0	0	34	37	91,89%
Gesamtwert	42	11	6	37	96	90,63%

Abbildung 53: Differenzierung (DA) und Kenndaten der stabilen Isotope der Bioelemente von Mahagoni-Proben aus Asien (Indien, Java) und Afrika (Ghana, Kongo)

Unter Berücksichtigung der Proben aus Mittelamerika ergibt sich ein ähnliches Differenzierungsbild, wie es ebenfalls bei Teak vorliegt. Costa Rica und Panama sind jederzeit vollständig von Ghana zu differenzieren (Abbildung 54). Jedoch sind die Überschneidung von Proben aus Honduras und Proben aus Ghana nun signifikant. So liegen 8 Fehlweisungen von Proben / Probenkollektiven aus Ghana zu Honduras vor.

Unter Berücksichtigung der gleichzeitigen Überschneidung mit den Mahagoni-Proben aus dem Kongo liegt entsprechend nur eine geringere Differenzierungsgüte vor.

Dies steht sicherlich etwas im Gegensatz zu den Möglichkeiten der Differenzierung von Teak aus Ghana, das nahezu vollständig von Honduras differenziert werden konnte. Zusammenfassend sollte die Möglichkeit der Differenzierung für andere Baumarten insbesondere für Regionen, die zu Überschneidungen tendieren, immer verifiziert werden.



von \ nach	Costa Rica	Ghana	Honduras	Indien	Java	Kongo	Panama	Gesamtwert	% korrekt
Costa Rica	3	0	3	0	0	0	4	10	30,00%
Ghana	0	30	8	0	0	5	0	43	69,77%
Honduras	0	6	48	1	1	0	0	56	85,71%
Indien	0	0	0	10	0	0	0	10	100,00%
Java	0	0	0	0	6	0	0	6	100,00%
Kongo	0	5	1	0	0	31	0	37	83,78%
Panama	1	0	0	0	2	0	27	30	90,00%
Gesamtwert	4	41	60	11	9	36	31	192	80,73%

Abbildung 54: Differenzierung (DA) und Kenndaten der stabilen Isotope der Bioelemente von Mahagoni-Proben aus Lateinamerika (Costa Rica, Panama, Honduras), Asien (Indien, Java), Afrika (Kongo) und unter besonderer Berücksichtigung von Ghana

5.5.3 Vergleich der D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse von Teak und Mahagoni in einer kleinräumigen Region von Ghana

Durch die umfangreiche Probenziehung in Ghana ist es möglich, ebenfalls einen direkten Vergleich der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse von Teak und Mahagoni durchzuführen.

Dieser Vergleich ist hilfreich, da zwar bei beiden eine Korrelation zum Wasser vorliegen muss, diese jedoch abhängig vom Wasserhaushalt des Baumes unterschiedlich ausgeprägt bzw. mit unterschiedlichen Fraktionierungen behaftet sein kann.

Natürlich ist ein direkter Vergleich nur möglich, sofern beide Probenkollektive von Teak und Mahagoni aus einer kleinräumigen Region stammen, so dass von einer identischen Ausgangslage unter Berücksichtigung des Wassers ausgegangen werden kann.

In Ghana kann auf zwei Beprobungsorte von Teak und Mahagoni, die lediglich unterhalb von 10 km auseinander liegen, zurückgegriffen werden (Abbildung 55).

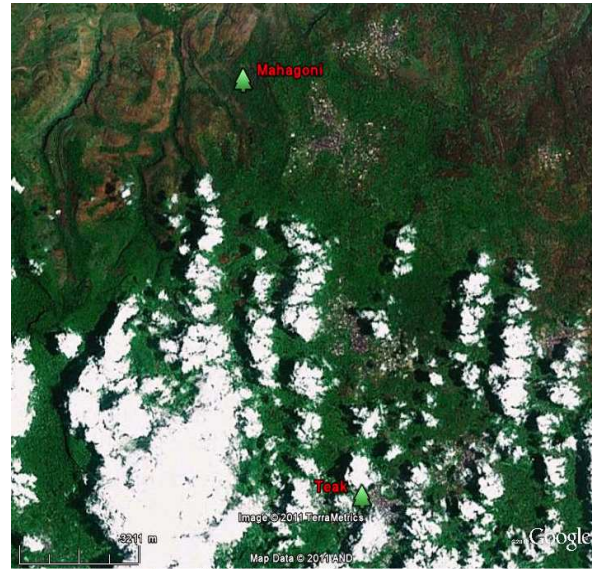


Abbildung 55: Kleinräumige Beprobungsorte (< 10 km) von Teak und Mahagoni in Ghana

In dieser kleinräumigen Region stehen 20 Proben von Teak und 10 Proben von Mahagoni zum Vergleich zur Verfügung. Im direkten Vergleich dieser beiden Probenkollektive von Teak und Mahagoni ist abzuleiten, dass das Probenkollektiv von Mahagoni angereicherte $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse gegenüber dem Probenkollektiv von Teak aufweist. So weist der Median der D/H Isotopenverhältnisse von Mahagoni einen um 5,6 ‰ angereicherten Wert auf. Der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenwert ist um 1,4 ‰ angereicherter gegenüber dem Median von Teak (Abbildung 56).

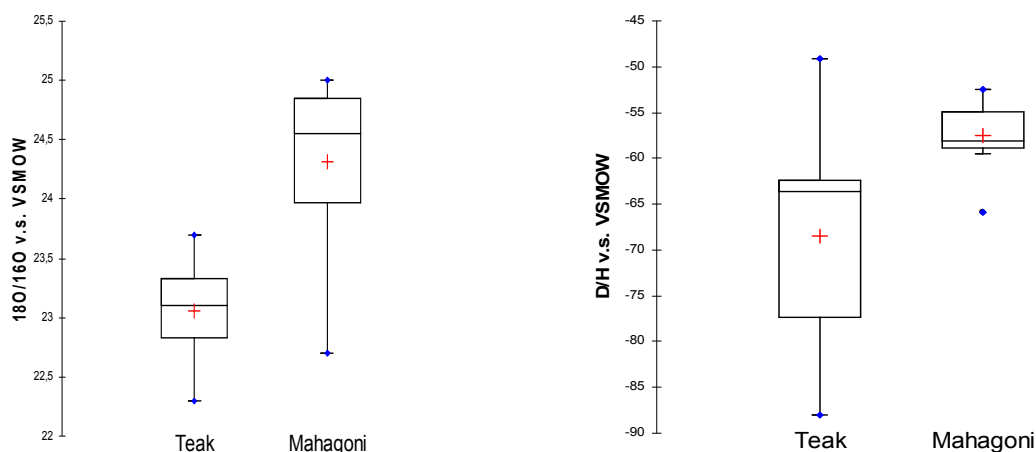


Abbildung 56: Boxplot der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse von Teak und Mahagoni aus Ghana im Vergleich (kleinräumige Probenziehung)

Dieser Unterschied in Form einer Anreicherung der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse in Mahagoni- Proben wird auch im Vergleich von Teak und Mahagoni aus anderen regionalen Herkünften beobachtet. So ist Mahagoni ebenfalls in Lateinamerika, insbesondere in Panama, Costa Rica und Honduras, als auch in Java immer in Mittel angereichert gegenüber Teak (Abbildung 57, Abbildung 58). Die Anreicherung in den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnissen liegt im Rahmen der Werte, die ebenfalls in Ghana gemessen wurden. So liegt im Mittel immer eine Anreicherung bei Mahagoni von 4 bis 8 ‰ in den D/H und 0,8 bis 1,6 ‰ in den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen vor.

Auf Grund dieser Unterschiede ist es zwangsläufig nicht möglich, Teak-Datenbanken direkt auf neue Baumarten zu übertragen. Da jedoch, wie am Beispiel Teak/Mahagoni ersichtlich, eine generelle Relation besteht, kann durch Ermittlung von Vergleichswerten zweier Baumarten in einer Region ein Parameter ermittelt werden, der die vorhandenen Datensätze ergänzen kann.

Für diesen Transferparameter scheint jedoch ein repräsentativer Vergleich immer notwendig zu sein.

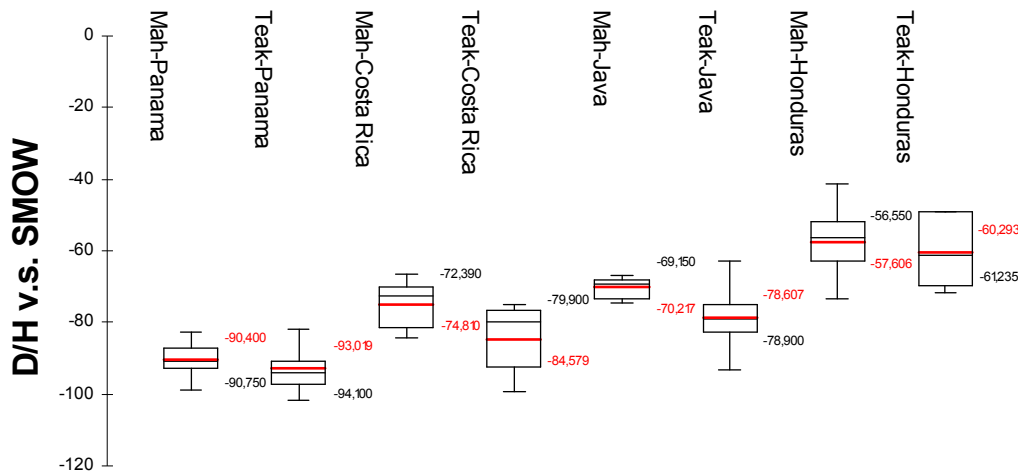


Abbildung 57: Boxplot der D/H Isotopenverhältnisse von Teak und Mahagoni aus verschiedenen Herkünften

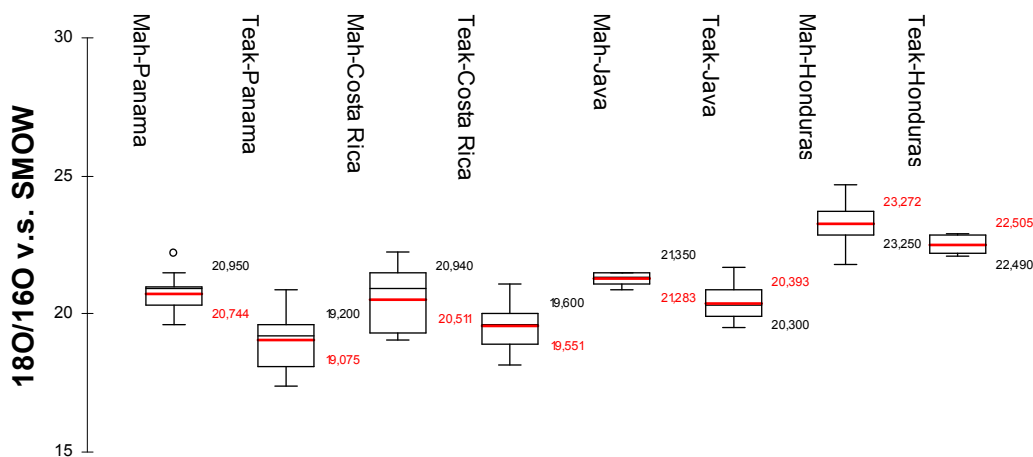


Abbildung 58: Boxplot der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse von Teak und Mahagoni aus verschiedene Herkünften

6 Artidentifizierung mittels Genmarker (Dr. Aki M. Höltken)

6.1 Einleitung

Der Handel mit illegal eingeschlagenem Holz trägt wesentlich zur weltweiten Entwaldung mit allen daraus resultierenden sozialen, ökonomischen und ökologischen Folgen bei. Infolge neuer gesetzlicher Vorgaben, aber auch aufgrund steigenden öffentlichen Interesses, gewinnen Informationen über die Identität forstlicher Produkte, insbesondere von Holz, immer mehr an Bedeutung.

Weiterer Informationsbedarf liegt unter anderem im Bereich der zweifelsfreien Bestimmung der Holzart vor. Um sicherzustellen, dass der Holzhandel nicht die Existenz einer Art gefährdet, sind mehr als 40 Baumarten im Washingtoner Artenschutzabkommen gelistet (CITES = Convention on International Trade in Endangered Species). Arten dieser Liste unterliegen bestimmten Handelsbeschränkungen und sind, je nach Gefährdungsgrad, in verschiedene Kategorien eingeteilt: In CITES I sind streng geschützte Arten gelistet, die unmittelbar vor dem Aussterben stehen und deren Handel streng verboten ist. CITES II enthält schutzbedürftige Arten wie z.B. das Echte Mahagoni (*Swietenia* sp.), für die klare Ein- und Ausfuhrbestimmungen gelten und ein Nachweis über eine Unschädlichkeit einer Bewirtschaftung für deren Bestand notwendig ist. CITES III beinhaltet Arten, für die nur in einzelnen Ländern besondere Bestimmungen gelten.

Zur Unterstützung des CITES-Vollzuges bei der Baumartenkontrolle wurde am Johann Heinrich von Thünen-Institut (vTI) bereits ein visuelles System aufgebaut, das auf computergestützten Beschreibungen und grafischen Darstellungen makro- und mikroskopischer Strukturmerkmale basiert. Diese Methode stößt in vielen Fällen allerdings auf ihre Grenzen, z.B. wenn eine artgenaue Differenzierung von Hölzern innerhalb einer Gattung gefragt ist (z.B. innerhalb der Gattung *Swietenia*). Aber auch zwischen taxonomisch entfernten Arten kann sich die Bestimmung anhand struktureller Holzmerkmale als schwierig bis unmöglich gestalten. (vgl. Koch et al. 2005, Schmitz-Kretschmer et al. 2006).

Dieser Umstand verlangt nach zusätzlichen, eindeutigen Bestimmungsmethoden. Hier bietet die Information, die auf der Erbsubstanz (DNA) gespeichert ist, die Grundlage für die Etablierung neuartiger Verfahren des Artnachweises. Denn die DNA stellt eine im Holz integrierte, fälschungssichere Datenquelle dar, welche über große Teile der Handelskette im Holz nachweisbar ist.

Ziel dieses Projektes war die Entwicklung genetischer Methoden zur Holzart-Identifikation an den Baumarten aus der Gattung der echten Mahagonihölzer (*Swietenia macrophylla* King, *S. mahagoni* (L.) Jacq., and *S. humilis* Zucc.) als auch an Teak (*Tectona grandis* L.f.). Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der Entwicklung einer möglichst schnellen und kostengünstigen Methode zur zweifelsfreien Bestimmung der hier vorgesehenen Baumarten, ohne auf eine teure Laborausstattung angewiesen zu sein (Höltken et al., eingereichte Publikation). Außerdem sollten wissenschaftliche Grundlagen dafür geschaffen werden, dass für weitere Baumarten in kurzer Zeit genetische Barcoding-Sequenzen zusammengestellt werden können.

6.2 Konzeptioneller Hintergrund

6.2.1 Methodische Herausforderungen bei der Analyse von DNA aus Holz

In den vergangenen Jahren sind verschiedene Protokolle zur Extraktion von DNA aus Holz publiziert worden, und zwar aus frisch geschlagenem bis hin zu diversen, weiterverarbeiteten Holzprodukten. Die darin enthaltenen methodischen Vorgehensweisen sind stets darauf ausgerichtet, eine Kontamination der Probe mit fremder DNA zu vermeiden bzw. die ohnehin schon meist fortgeschrittene Degradation der Erbsubstanz im Holz während des Isolationsprozesses zu minimieren (De Filippis & Magel 1998, Deguilloux et al. 2002, Rachmayanti et al. 2006, Asif & Cannon 2007).

Deshalb entschieden wir uns in diesem Projekt für die Entwicklung solcher DNA-Marker, die die oben beschriebenen Probleme möglichst umgehen:

- (a) Die Marker sollten artspezifisch sein, d.h. geringe intraspezifische aber ausreichend interspezifische Variation aufweisen.
- (b) Die Marker sollten auf mögliche Kontamination des Holzes mit Fremd-DNA (z.B. durch Pilzbefall) nicht ansprechen.
- (c) Aufgrund der starken Degradation der DNA in Holz sollten die DNA-Sequenzen möglichst kurz sein (max. 400 Basenpaare).
- (d) Aufgrund der geringen Ausbeute an Erbsubstanz in Extrakten aus Holz sollten die gewünschten Fragmente in einer Vielzahl an Kopien pro Zelle vorliegen.

Diese Eigenschaften treffen im wesentlichen auf Chloroplasten-DNA (cpDNA) zu, die im Holz in mehrfacher Kopie pro Zelle vorliegt. Die ringförmige Struktur des cp-Genoms verleiht dem DNA-Molekül darüber hinaus mehr Stabilität, die mit der mtDNA (mitochondriale Erbsubstanz) bei tierischen Organismen vergleichbar ist. Diese kann auch noch in viele Jahrtausende alten Knochenfunden nachgewiesen und zur Analytik herangezogen werden (vgl. u.a. Krause et al. 2006, Poinar et al. 2006, Rogaev et al. 2006). Voruntersuchungen ergaben bereits, dass die Amplifikation kurzer cpDNA-Fragmente aus Holz meist bessere Ergebnisse hervorbrachte als die von Kern-DNA (s. Punkte c und d).

Ein weiteres wichtiges Kriterium ist die fehlende Rekombination des cpDNA-Genoms während der generativen Vermehrung. Bei Angiospermen, und damit bei den meisten tropischen Baumarten, wird das ringförmige cpDNA-Molekül meist maternal vererbt. Deshalb kann erwartet werden, dass innerhalb der Arten weniger genetische Variation zu beobachten ist als zwischen Arten (s. Punkt a). Außerdem besitzen Pilze keine Chloroplasten, so dass durch Kontaminationen, insbesondere in feucht-warmen tropischen Gebieten, keine Verfälschungen der genetischen Analytik zu erwarten sind (s. Punkt b).

6.2.2 Primer-Design: Das komplett sequenzierte Chloroplasten-Genom der Westlichen Balsam-Pappel (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray) als Ausgangsbasis für die Entwicklung von Barcoding-Sequenzen

In den vergangenen Jahren sind schon eine Reihe von Standard-Sequenzen aus dem Chloroplasten-Genom für das genetische Barcoding an einer Vielzahl von Pflanzenarten entwickelt und diskutiert worden (Taberlet et al. 2007; Kress et al. 2005, Kress & Erickson 2007, Hebert et al 2003, Hebert & Gregory 2005). So wurden schon in den frühen 90ern die Intron-Bereiche der plastidären trnL-trnF-Region zur Artidentifikation herangezogen (Taberlet et al. 1991).

Dennoch muss die ausschließliche Verwendung dieser schon entwickelten Standardsequenzen für Holzproben von vorn herein als unzureichend angesehen werden:

(a) Wir haben es mit unterschiedlichem Alter und Verarbeitungsgrad des Holzes zu tun. Es ist also mit nur sehr geringer DNA-Ausbeute, insbesondere aber mit stark degradierter Erbsubstanz zu rechnen. Dafür sind die meisten der standardisierten Barcoding-Sequenzen mit bis zu 800 Basenpaaren zu lang. Erste Versuche an Holz ergaben, dass eine Amplifikation dieser Fragmente in nur unzureichendem Maße gelingt.

(b) Die Auflösungs-wahrscheinlichkeit zwischen eng verwandten Species - und das ist bei den drei *Swietenia*-Arten der Fall - ist sehr klein. Die gilt insbesondere für kodierende cpDNA-Bereiche, wie z.B rbcL oder matK (vgl. Taberlet et al. 2007; Muellner et al. 2011).

Aufgrund der Tatsache, dass das cp-Genom der Westlichen Balsam-Pappel (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray) vollständig entschlüsselt ist (Tuskan et al. 2006), steht eine sehr große Menge an Information zur Verfügung, die auf viele andere Baumarten übertragbar ist. Dabei wurden die genetischen Informationen der kodierenden (genischen) und der nicht-kodierenden (intergenischen) Bereiche des Chloroplasten-Genoms der Pappel unterschiedlich genutzt.

In den intergenischen Bereichen ist die größte genetische Variation zwischen Arten zu erwarten, so dass hier auch die größte Wahrscheinlichkeit besteht, genetische Unterschiede zwischen nah verwandten Arten zu beobachten. Die genischen Bereiche hingegen sind auch über Artgrenzen hinweg eher konservativ. Hier wurden folglich die Erkennungsregionen (Primeransatzstellen) für die Vervielfältigung (=Amplifikation) der DNA-Bereiche festgelegt und die entsprechenden Primer entworfen. Insgesamt wurden 22 DNA-Fragmente aus dem Large-Single-Copy-(LSC-) Bereich des Chloroplasten in unsere Untersuchung aufgenommen, welche auf Unterschiede hin getestet werden (Abbildung 59).

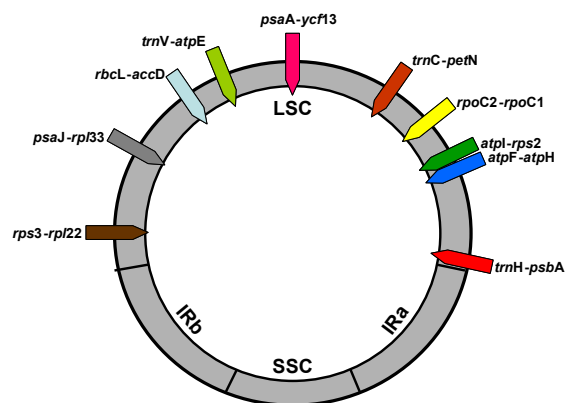


Abbildung 59: Eine Auswahl an nicht-kodierenden cp-DNA-Fragmenten („intergenic Spacer“) im LSC-Bereich (Large Single Copy) des ringförmigen Chloroplasten-Chromosoms, welche auf Unterschiede zwischen Arten getestet wurden

6.2.3 Technologie-Transfer: Anpassung der Methoden für einen großen Nutzerkreis

Um DNA-basierte Artidentifikationssysteme einem größeren Kreis an Nutzern zugänglich zu machen, sollten kostengünstige Methoden eingesetzt werden, die nur nach kurzen Einführungsveranstaltungen durch das jeweilige Personal anwendbar sind. Kostengünstige Barcoding-Verfahren dürfen keine aufwendigen Sequenzierungsarbeiten beinhalten. Unterschiede zwischen Arten sollten demnach nach wenigen molekularbiologischen Schritten sichtbar gemacht werden können. Die große Fülle an genetischen Informationen sollte im Idealfall auf ein einzelnes diagnostisches Merkmal reduziert werden, dessen Analyse mit einer einfachen Laborausstattung in möglichst kurzer Zeit durchgeführt werden kann. Nur im Falle dringenden Verdachts auf illegalen Handel mit CITES-geschützten Holzarten sollten weitere Analysen zur Bestätigung des Sachverhalts herangezogen werden. Der gesamte Prozess der Artidentifikation sollte nur die folgenden Schritte enthalten (siehe auch Box):

DNA-Extraktion: Zu Beginn des Analyseprozesses müssen die Nukleinsäuren aus den Holzproben isoliert werden. Im Handel verfügbare „Kits“, die durch wenige Modifikationen den speziellen Bedingungen der DNA-Extraktion aus Holz angepasst sind, vereinfachen den Laborprozess.

→ Zeitbedarf: Mindestens 4-6 h;

→ Laborausstattung: Tischzentrifuge

PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion): In diesem Schritt wird das jeweilige diagnostische Fragment amplifiziert.

→ Zeitbedarf: 2 bis 4 h;

→ Laborausstattung: Thermocycler

Restriktionsverdau: Restriktionsenzyme sind schon seit Jahrzehnten wichtige Hilfsmittel der Molekularbiologen. Diese Enzyme erkennen bestimmte Code-Muster der DNA und schneiden sie an dieser Stelle. So können Unterschiede in der Sequenzabfolge zwischen einzelnen Arten erkannt werden (hier z.B. SNPs = single nucleotide polymorphisms). Heutzutage werden vermehrt sog. „fast-digest-Enzyme“ eingesetzt, die die DNA in weniger als 15 min zerschneiden können, was den Zeitbedarf erheblich reduziert.

→ Zeitbedarf: 0,5 h;

→ Laborausstattung: Thermocycler wie im PCR-Schritt

Visualisierung: Fragmentlängenunterschiede können auf Agarose- oder Polyacrylamid-(PAA)-Gelen sichtbar gemacht werden.

→ Zeitbedarf: 1,5 bis 3 h;

→ Laborausstattung: Gelkammer und Stromquelle

Box: Prinzip einer DNA-basierten Schnelltest-Methode zur Identifizierung CITES-geschützter Holzarten


1. DNA-Extraktion

A. Mechanische Gewebezerkleinerung


- Bohrmachine / Skalpell
- anschließend Schockgefrieren der Holzfasern in flüssigem Stickstoff
- Pulverisierung in einer Retschmühle

B. Chemischer Aufschluss

- Lysis von Zellwänden und Zellmembranen
- DNA-Reinigung: Entfernen von störenden Inhaltsstoffen (PCR-Inhibitoren wie z.B. phenolische Substanzen (z.B. Lignine),



2. PCR = Polymerasekettenreaktion



Amplifikation von Ziel-DNA-Sequenzen: Hierfür sind zuvor künstliche DNA-Erkennungsregionen erzeugt worden (sogenannte Primer, hier grün), die diese spezielle Sequenz erkennen. Dazwischen wird das spezifische DNA-Fragment mit dem artspezifischen Nukleotidaustausch (hier in rot: SNP = single nucleotide polymorphisms) vervielfältigt.

Art 1:
 ...**GTTATGCCGTA**AAATGTTGCTAGTTAAGTATGCCGTAATGTTAAGTTATGCCGTAAT**GA**ATTCAGTTAAGCCGTATGTTGCTAGTT**AAAGTTATGCTTA**...

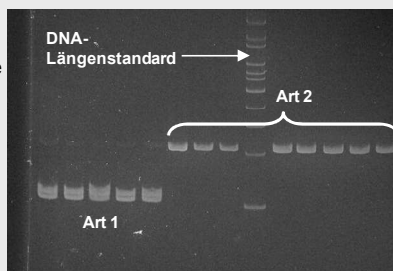
Art 2:
 ...**GTTATGCCGTA**AAATGTTGCTAGTTAAGTATGCCGTAATGTTAAGTTATGCCGTAAT**GC**ATTCAGTTAAGCCGTATGTTGCTAGTT**AAAGTTATGCTTA**...

In nur 15 bis 50 µl Reaktionsvolumen werden die Ziel-DNA-Fragmente bis zu 2³⁶ = 68 Milliarden mal amplifiziert (kopiert). Die Kapazität einer PCR-Maschine (C): 96 oder 384 Proben.

3. Restriktion von DNA-Fragmenten und gelelektrophoretische Trennung

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Nukleotidmuster und zerschneiden doppel- oder auch einzelsträngige DNA-Moleküle genau an diesen Restriktionsstellen. Mittlerweile ist eine Fülle solcher Enzyme mit unterschiedlichen Restriktionsstellen verfügbar.

In unserem Beispiel zertrennt das Restriktionsenzym *EcoRI* die DNA mit dem Sequenzmuster GAATTC. Das amplifizierte Fragment von Art 1 wird geschnitten und in zwei kleinere Fragmente aufgetrennt, während das Amplifikat von Art 2 unverändert bleibt. Die so entstehenden unterschiedlichen Fragmentlängen können anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und als artspezifischer Barcoding-Marker verwendet werden (D).



6.3 Material und Methoden

6.3.1 Pflanzenmaterial

Zur Methodenetablierung verwendeten wir ausschließlich getrocknetes Blattmaterial (aus frischen Blättern oder aus Herbarbelegen), um eine hohe Ausbeute an DNA guter Qualität zu gewährleisten. Die analysierten Proben der drei *Swietenia*-Arten, welche ein großes Areal ihrer jeweiligen Verbreitung abdecken, sind in Abbildung 60 aufgelistet. Die Teakproben stammen aus dem Gewächshaus des Johann Heinrich von Thünen-Instituts (vTI) in Hamburg-Lohbrügge als auch aus Plantagen auf Java (Indonesien).

Holzproben, an denen die Anwendbarkeit der etablierten Methoden getestet wurden, stammen von der Firma Theodor Nagel, Hamburg. Der erste Praxistest wurde an Proben aus einer beschlagnahmten Holzlieferung durchgeführt.

Nr.	Botanischer Name	Ort der Probenentnahme
5	<i>Swietenia mahagoni</i>	Gewächshaus vTI Lohbrügge
6	<i>Swietenia macrophylla</i>	Gewächshaus vTI Lohbrügge
13	<i>Swietenia mahagoni</i>	Botanischer Garten Universität Hamburg
14	<i>Swietenia macrophylla</i>	Botanischer Garten Universität Hamburg
15	<i>Swietenia macrophylla</i>	Botanischer Garten London
16	<i>Swietenia macrophylla</i>	Botanischer Garten Berlin
17	<i>Swietenia macrophylla</i>	Wilhelmina Zool.-Bot.Garten Stuttgart
18	<i>Swietenia mahagoni</i>	Wilhelmina Zool.-Bot.Garten Stuttgart
19	<i>Swietenia mahagoni</i>	Palmengarten Frankfurt am Main
20	<i>Swietenia macrophylla</i>	Palmengarten Frankfurt am Main
21	<i>Swietenia mahagoni</i>	Friedrich-Schiller-Universität Jena
22	<i>Swietenia macrophylla</i>	Friedrich-Schiller-Universität Jena
25	<i>Swietenia macrophylla</i>	Botanischer Garten Universität Tübingen
26	<i>Swietenia macrophylla</i>	Botanischer Garten Universität Tübingen
27	<i>Swietenia macrophylla</i>	Südamerika
28	<i>Swietenia macrophylla</i>	Südamerika
29	<i>Swietenia macrophylla</i>	Südamerika
30	<i>Swietenia macrophylla</i>	Südamerika
31	<i>Swietenia macrophylla</i>	Südamerika
32	<i>Swietenia macrophylla</i>	Südamerika
33	<i>Swietenia macrophylla</i>	Südamerika
34	<i>Swietenia macrophylla</i>	Südamerika
35	<i>Swietenia macrophylla</i>	Südamerika
36	<i>Swietenia macrophylla</i>	Südamerika
37	<i>Swietenia mahagoni</i>	Botanischer Garten München
38	<i>Swietenia macrophylla</i>	Herkunftsversuchsflächen, Mittelamerika
39	<i>Swietenia macrophylla</i>	Herkunftsversuchsflächen, Mittelamerika
40	<i>Swietenia macrophylla</i>	Herkunftsversuchsflächen, Mittelamerika
41	<i>Swietenia macrophylla</i>	Herkunftsversuchsflächen, Mittelamerika
42	<i>Swietenia macrophylla</i>	Herkunftsversuchsflächen, Mittelamerika
43	<i>Swietenia macrophylla</i>	Herkunftsversuchsflächen, Mittelamerika
44	<i>Swietenia macrophylla</i>	Herkunftsversuchsflächen, Mittelamerika
45	<i>Swietenia macrophylla</i>	Herkunftsversuchsflächen, Mittelamerika
46	<i>Swietenia macrophylla</i>	Herkunftsversuchsflächen, Mittelamerika
47	<i>Swietenia mahagoni</i>	Herkunftsversuchsflächen, Mittelamerika
48	<i>Swietenia mahagoni</i>	Herkunftsversuchsflächen, Mittelamerika
49	<i>Swietenia humilis</i>	Herkunftsversuchsflächen, Mittelamerika
50	<i>Swietenia humilis</i>	Herkunftsversuchsflächen, Mittelamerika
51	<i>Swietenia humilis</i>	Herkunftsversuchsflächen, Mittelamerika
52	<i>Swietenia macrophylla</i>	Herbarium, Botanischer Garten New York
53	<i>Swietenia macrophylla</i>	Herbarium, Botanischer Garten New York
54	<i>Swietenia macrophylla</i>	Herbarium, Botanischer Garten New York
55	<i>Swietenia macrophylla</i>	Herbarium, Botanischer Garten New York
56	<i>Swietenia mahagoni</i>	Herbarium, Botanischer Garten New York
57	<i>Swietenia mahagoni</i>	Herbarium, Botanischer Garten New York
58	<i>Swietenia humilis</i>	Herbarium, Botanischer Garten New York
59	<i>Swietenia humilis</i>	Herbarium, Botanischer Garten New York

Abbildung 60: Herkünfte der Proben der Gattung *Swietenia* zur Methoden-Etablierung

6.3.2 *DNA-Isolierung*

Getrocknetes Blattmaterial: Ca. 25 bis 50 mg Blattmaterial wurden mit Hilfe einer Retschmühle (Typ MM 300) in einem 2,0 ml Eppendorfgefäß nach Zugabe von Stahlkugeln und Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff zunächst pulverisiert. Der anschließende Aufschluss erfolgte nach einem modifizierten CTAB-Protokoll nach Doyle & Doyle (1987).

Holzproben: Die Behandlung von holzigen Geweben erfolgte nach den Ausführungen von Rachmayanti et al. (2006). Etwa 50 bis 100 mg Holzspäne wurden wie Blattmaterial zunächst pulverisiert. Die DNA wurde anschließend mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilgen) extrahiert. Modifikationen bestanden darin, dass dem AP1-Puffer zusätzlich PVP zugefügt wurde und eine Inkubation über Nacht erfolgte statt der im Protokoll angegebenen 1 bis 2 Stunden. Danach wurde das DNA-Isolat zusätzlich mit Hilfe des OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit (Zymo Research, USA) gereinigt.

6.3.3 *PCR*

Die PCR erfolgte nach Standard-Protokollen. Das Reaktionsvolumen betrug 25 µl und beinhaltete 20 bis 50 ng Templat, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 1.8 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 1 Unit Taq polymerase, 0.4 µM der jeweiligen Primer und, in einigen Fällen BSA (Rinderserum Albumin). Die PCR wurde in Thermocyclern der Firma Biometra (Göttingen) durchgeführt mit einem initialen Denaturierungsschritt bei 94°C für 4 min, gefolgt von 30 Zyklen mit 94°C (1 min), der jeweiligen Annealing-Temperatur (45 s bis zu 1 min, 55 bis 65°C je nach Primerkombination) und 72°C (1 bis 2 min) und schließlich einer Elongation von 10 min bei ebenfalls 72°C. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1 bis 2%igen Agarosegel mit dem UV-Floureszenzfarbstoff „Rotisafe“ geprüft.

6.3.4 *Sequenzierung und Sequenzanalyse*

25 µl des PCR-Produkts wurden zunächst aufgereinigt, und zwar mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ von Roche (Mannheim). Für die Sequenzierungsreaktionen bedienten wir uns der Firma StarSeq (Mainz). Die Menge der eingesandten DNA richtete sich nach der Länge der einzelnen Fragmente: Für Fragmente bis zu 200 Basenpaare (bp) wurden 50 ng DNA benötigt, für 500 bp 100 ng und für bis zu 1000 bp 200 ng DNA.

Die zugesandten Sequenzen wurden auf Einzelnukleotidunterschiede (SNPs) und auf Indels untersucht. Dabei benutzten wir die Software SeqMan 7.1.0 von DNASTar (Lasergene, GATC Biotech, Konstanz) als auch Sequencher 4.9 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA). Die Fragmente mit SNPs wurden anschließend mit Hilfe des Programms NEBcutter 2.0 von New England BioLabs Inc (Ipswich, USA) auf artspezifischen Restriktionsenzymen geprüft.

6.4 **Ergebnisse Artidentifizierung mittels DNA Marker**

6.4.1 *Differenzierung Swietenia sp. – Tectona grandis*

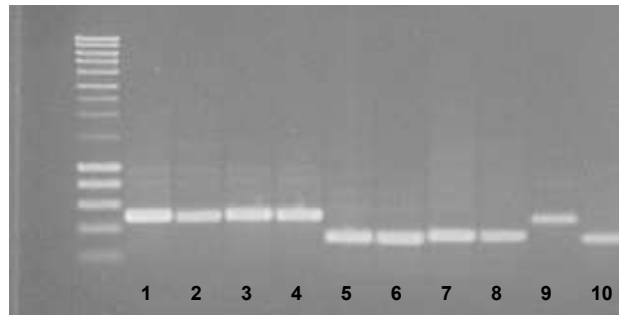
Zwischen Arten mit geringem Verwandtschaftsgrad, z.B. bei Arten, die taxonomisch unterschiedlichen Familien oder gar Ordnungen angehören, sind im Allgemeinen weniger Arbeits-

aufwand und Kosten zu erwarten. Ein Screening verschiedener nicht-kodierender Regionen der cpDNA und die Bestimmung der Fragmentlängen sollten hier meist genügen, um eine genetische Barcodingmethode zu entwickeln, die auch ohne PCR-RFLP-Technik auskommt. In Abbildung 61 sind die am besten amplifizierenden Fragmente, sowohl für die Arten der Gattung *Swietenia* (Familie der Meliaceae) als auch für *Tectona grandis* (Familie der Verbenaceae, früher der Lamiaceae), aufgeführt. Vier PCR-Produkte zeigen die gleichen Fragmentlängen, während an drei Amplifikaten Unterschiede von ca. 100 (*trnC-petN*, *psaA-ycf13*) bzw. 200 Basenpaaren (*trnH-psbA*) festgestellt wurden.

cpDNA-Locus	DNA-Fragmentlängen in Basenpaaren	
	<i>Swietenia</i> sp.	<i>Tectona grandis</i>
<i>trnH-psb A</i>	350	500
<i>trnG-psb K</i>	550	550
<i>psb K-psb I</i>	600	600
<i>rps 2-rpoC2</i>	700	700
<i>trnC-petN</i>	800	900
<i>psa A-ycf13</i>	800	900
<i>psb J-psb F</i>	400	400

Abbildung 61: Ermittelte Fragmentlängen an einer Auswahl an Amplifikationsprodukten für die Arten der Gattung *Swietenia* und für *Tectona grandis*

Ein Schnelltest mit Hilfe der PCR und der Überprüfung der Fragmentlängen auf einem Agarosegel ist in Abbildung 62 dargestellt. *Swietenia* sp. und *Tectona grandis*, und zwar sowohl Blatt- als auch Holzprobenmaterial, können auf einem 1,5%igem Agarosegel eindeutig unterschieden werden bei einer Gellaufzeit von ca. 1,5 h.



Spuren 1-4: *Tectona grandis*, Blattmaterial von verschiedenen Standorten auf Java

Spuren 5-8: *Swietenia macrophylla* (5, 6), *S. mahagoni* (7) und *S. humilis* (9), Blattmaterial

Spur 9: *T. grandis* (Holzprobe)

Spur 10: *S. macrophylla* (Holzprobe)

Abbildung 62: Agarosegel zur Unterscheidung von Arten der Gattung *Swietenia* von *Tectona grandis* anhand von Fragmentlängenunterschieden am cpDNA-Genort *trnH-psbA*

Dieser methodische Ansatz sollte auch auf weitere CITES-geschützte Baumarten sowie ihre Austauschhölzer anwendbar sein, sofern nur geringe verwandtschaftliche Beziehungen bestehen. Dies ist beispielsweise für das unter CITES II gelistete Pockholz (*Guaiacum officinale* und *G. sanctum*, Familie der Jochblattgewächse, Zygophyllaceae) und das davon schwer unterscheidbare Holz von *Tabebuia heptaphylla* (Familie der Trompetenbaumgewächse, Bignoniaceae) der Fall. Aber auch bei den Coniferen mit einer langen evolutiven Geschichte könnten sich reine Fragmentlängenunterschiede an verschiedenen cpDNA-Sequenzen als völlig ausreichend darstellen (z.B. *Fitzroya cupressoides* (CITES I), *Thuja plicata*, *Sequoja sempervirens*).

6.4.2 Differenzierung der nah verwandten Arten *Swietenia macrophylla*, *S. mahagoni* und *S. humilis*

6.4.2.1 Sequenzunterschiede

Nach der Amplifikation der ausgewählten nicht-kodierenden cpDNA-Regionen, wurden die Fragmente sequenziert und im Hinblick auf Einzelnukleotidunterschiede (SNPs) untersucht. Es konnten eine Reihe von SNPs aber auch einige Fragmentlängenunterschiede an den 22 cpDNA Sequenzen gefunden werden. Von allen untersuchten Fragmenten stellte sich der cpDNA Locus *trnH-psbA* als der geeignetste Barcoding-Marker heraus. Dieser wird auch international als eine der offiziellen Barcoding-Sequenzen empfohlen (Plant Working Group of the 'Consortium for the Barcode of Life', CBOL).

In Abbildung 63 ist ein Teil dieser Sequenz mit dem hier entscheidenden Unterschied dargestellt. An Position 94 des gesamten Fragments ist das Nukleotid A (Adenin) bei *S. mahagoni* durch das Nukleotid C (Cytosin) bei *S. macrophylla* und *S. humilis* ersetzt.

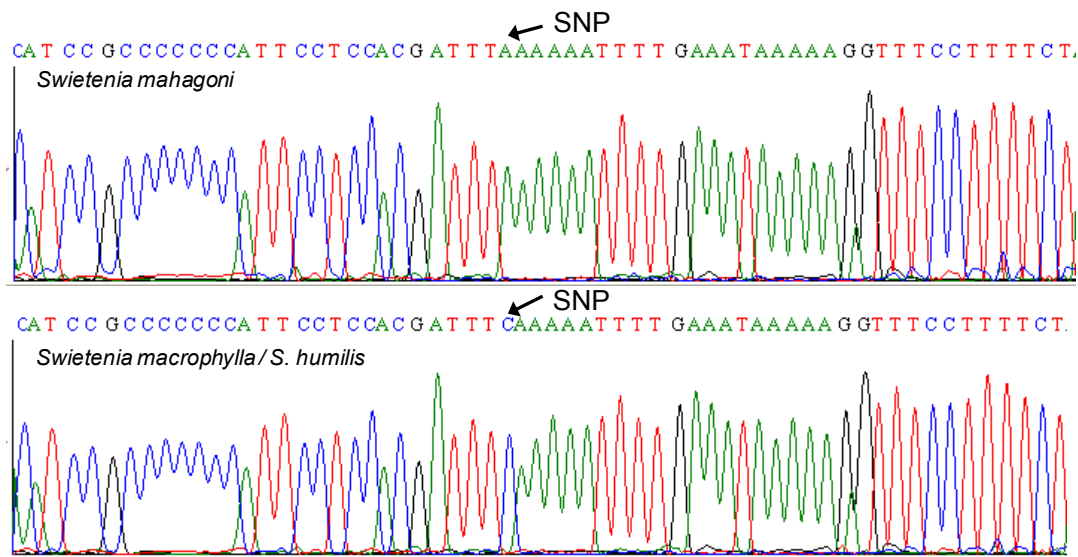


Abbildung 63: SNP (= single nucleotide polymorphism, Einzelnukleotidunterschied) am cpDNA-Locus *trnH-psbA* (Austausch von A = Adenin bei *Swietenia mahagoni* durch C = Cytosin bei *S. macrophylla* und *S. humilis*)

6.4.2.2 Die Schnelltest-Methode

Das Resultat dieses Projektes, in dem 22 DNA-Sequenzen analysiert wurden, ist ein einzelnes, 246 Basenpaar langes Fragment der nicht-kodierenden cpDNA-Region *trnH-psbA*. Die Erkennungsregion für das hier eingesetzte, artspezifische Restriktionsenzym *DraI* hat die Sequenzabfolge TTTAAA. In unserem Fall bedeutet dies, dass das Fragment von *S. mahagoni* in zwei Teile von 94 und 152 Basenpaar Länge zerschnitten wird, das von *S. macrophylla* und *S. humilis* aber in seiner vollen Länge erhalten bleibt. Die Visualisierung der PCR-RFLP-Methode zur Unterscheidung von *S. mahagoni* von *S. macrophylla* / *S. humilis* mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist in

Abbildung 64 dargestellt (Prinzip siehe Box).

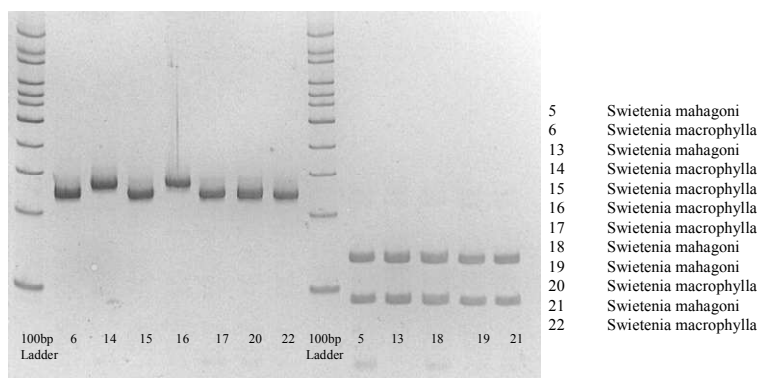


Abbildung 64: Visualisierung der PCR-RFLP-Methode zur Unterscheidung von *S. mahagoni* von *S. macrophylla/S.humilis* mit Hilfe der PAA-(Polyacrylamid-) Gelelektrophorese; Restriktion einer Sequenz des intergenischen Bereichs *trnH-psbA* mit Hilfe der Endonuklease *DraI*

7 Blindprobentest / Praxistests

7.1 Blindprobentest zur Überprüfung der deklarierten Herkunft mittels Isotopenmethode

Das Projekt beinhaltete die Durchführung eines durch den WWF organisierten Blindtests, um die Funktionalität der Methoden unter Beweis zu stellen.

Die besondere Herausforderung des durchgeführten Blindtests bestand darin, dass der Aufbau des Tests so praxisnah wie möglich konstruiert wurde. Zum Beispiel wurde dem Labor nur ein einzelnes Stück Holz vom jeweiligen Standort für jede Fragestellung zur Verfügung gestellt.

Insgesamt wurden 13 der 15 Proben richtig zugeordnet.

Ein falsches Ergebnis konnte unmittelbar nach dem Test unter Zuhilfenahme von Nahinfrarot (NIR) gelöst werden (Blindprobe Nr. 3). Die besondere Schwierigkeit bei Blindprobe Nr. 3 lag darin, dass der Probenstandort in unmittelbarer Nähe zur Grenze nach Costa Rica lag. Dort befand sich nur 50 km vom Blindprobenstandort entfernt ein Referenzprobenstandort. Die zweite falsche Evaluation stand mit der Tatsache in Zusammenhang, dass zum Zeitpunkt der Analyse noch keine Analyseergebnisse der Referenzproben aus dem betreffenden Land (Ghana) vorlagen (Blindprobe Nr. 9).

	Vorgegebene Deklaration / konstruierte Praxissituation	tatsächliche Herkunft	Auflösung: Deklarierte Herkunft ist...	Ergebnisbericht TÜV-Rheinland Agroisolab	Bewertung
1	Teak aus Java	Panama	falsch	" falsch "	
2	Mahagoni aus Honduras	Panama	falsch	" falsch "	
3	Teak aus Panama	Panama	richtig	" falsch "	
4	Teak aus Panama	Laos	falsch	" falsch "	
5	Teak aus Java	Laos	falsch	" falsch "	
6	Teak aus Burma	Laos	falsch	" falsch "	
7	Teak aus Laos	Laos	richtig	" richtig "	
8	Teak aus Costa Rica	Laos	falsch	" falsch "	
9	Mahagoni aus Honduras	Ghana	falsch	" richtig "	

10	Teak aus Java	Indonesien	richtig	" richtig "	
11	Teak aus Laos	Indonesien	falsch	" falsch "	
12	Teak aus Costa Rica	Indonesien	falsch	" falsch "	
13	Teak aus Java	Burma	falsch	" falsch "	
14	Händler sagt: Teak aus Java; Behörde vermutet Burma (Frage an Labore: "wie wahrscheinlich ist Burma")	Burma (nach Angaben des Händlers)	falsch	" falsch "	*
15	Fichte aus Deutschland / Bayern	Russland (ach Angaben des Händlers)	falsch	" falsch "	**

Abbildung 65: Übersicht Blindproben test

- * Diese Probe wurde nicht innerhalb des Projekts gesammelt, sondern stammt von einem gekauften Teak-Gartenstuhl von dem der Händler behauptet, dass er aus Burma stammt.
- ** In diesem Fall geht es nicht um Tropenholz. Der Blindproben test wurde zusätzlich um dieses Beispiel ergänzt, weil es bei der internationalen Fingerprintingkonferenz in Eschborn als Anwendungsbeispiel eines existierenden deutschen Baumarkts präsentiert wurde.

Das positive Ergebnis des Blindtests unterstreicht das Potential der Stabil-Isotopenmethode bei der Verifizierung der deklarierten Herkunft.

7.2 Praxistest Isotopenmethode: Verifizierung der deklarierten Herkunft bei beschlagnahmtem Teak

Im Rahmen einer Zollbeschlagnahmung von Teak wurde die Methode der stabilen Isotope genutzt, um weitere Indizien für eine mögliche Herkunft des Teaks aufzuzeigen. Es besteht dabei der Verdacht, dass Teakholz aus Birma importiert wurde, was derzeit unter einem Handelsembargo fällt.

Für die Analyse konnten eine Vielzahl von Verdachtsproben von verschiedenen Probenkollektiven / Chargen zur Verfügung gestellt werden. Dies gewährleistet die Erstellung eines robusten Mittelwerts zur Bewertung der Herkunft.

In der Prüfung wurden alle stabilen Isotope der Bioelemente hinzugezogen. Daraus ergab sich der derzeitige Kenntnisstand, dass diese Verdachtsproben hohe Ähnlichkeiten zu den Referenzen aus Birma widerspiegeln (Abbildung 66).

Lediglich ein Probenkollektiv bestehend aus lediglich einer Verdachtsprobe konnte nicht direkt Birma zugeordnet werden, sondern zeigt Isotopenverhältnisse die Ähnlichkeiten mit Java aufweisen. Da es sich um eine Einzelprobe handelt, ist eine Unschärfe durch einen Extremwert dabei nicht gänzlich auszuschließen.

Im Fortlauf des Zollverfahren wurde eine mögliche alternative Herkunft festgestellt. Diese Region war nicht Bestandteil der derzeitigen Datenbank. Mit einer direkten Referenzprobe aus dieser Region konnte jedoch eine mögliche Herkunft aus dieser anhand der stabilen Isotope widerlegt werden.

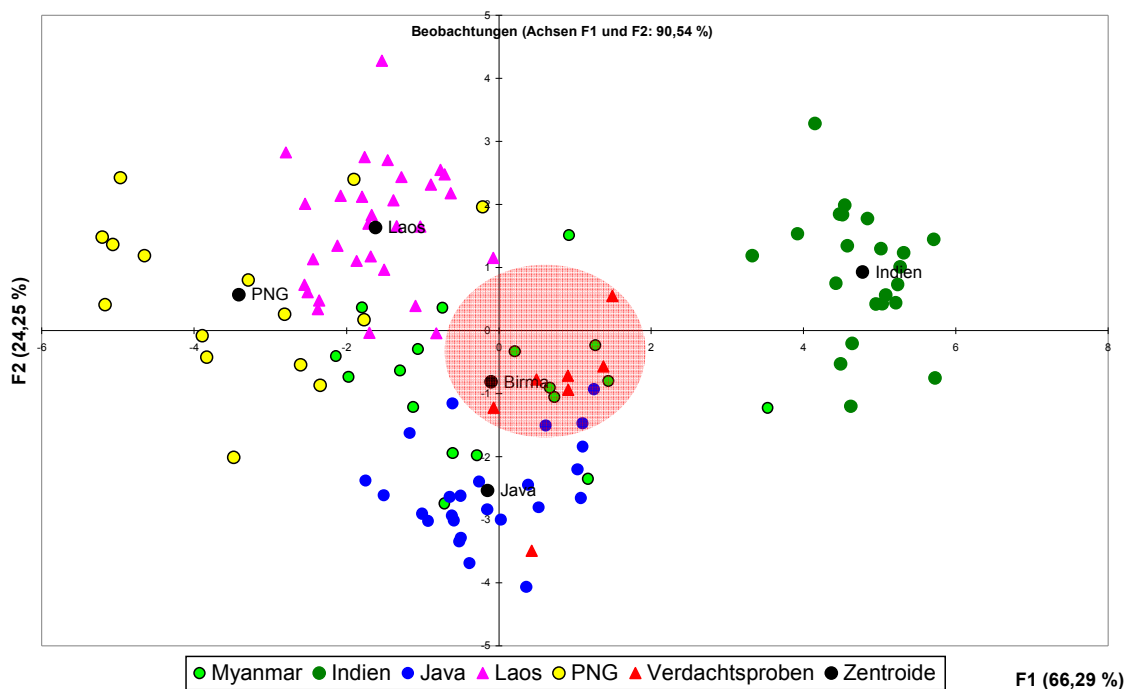
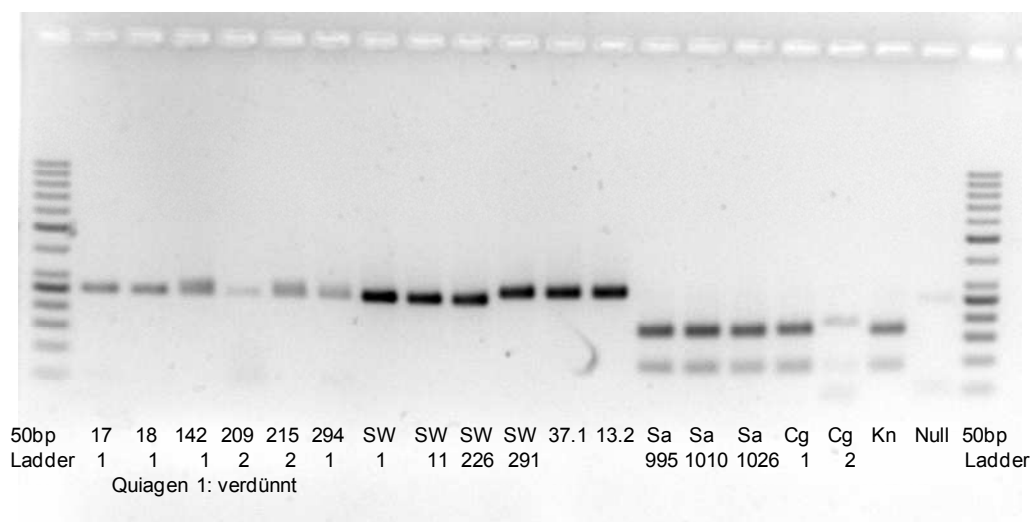


Abbildung 66: Praxistest von beschlagnahmten Teakproben mit dem Verdacht der Herkunft aus Birma/Myanmar (innerhalb rot unterlegtem Kreis)

7.3 Praxistest DNA-Artidentifizierung bei beschlagnahmtem Mahagoni

Der erste erfolgreiche Praxistest wurde an Holzproben durchgeführt, welche kurz zuvor durch die Zollbehörden beschlagnahmt worden waren. Die genaue Determinierung der Holzart wird hier in zwei Schritten durchgeführt:

Zunächst wird bestimmt, ob es sich tatsächlich um eine CITES-geschützte Art der Gattung *Swietenia* und nicht evtl. doch um eine schwer unterscheidbare, für den freien Handel zugelassene, Austauschholzart aus der Familie der Meliaceae (Mahagonigewächse) handelt (siehe Abbildung 67). Dazu zählen Arten der Gattungen *Khaya*, *Cedrela* und *Entandrophragma*. Dieser Test wird mit einem neuen PCR-RFLP-Verfahren vollzogen, der in absehbarer Zeit in einer Publikation von HÖLTKEN et al. (eingereicht im 'Journal für Holzforschung', Verlag de Gruyter) nachzulesen ist.



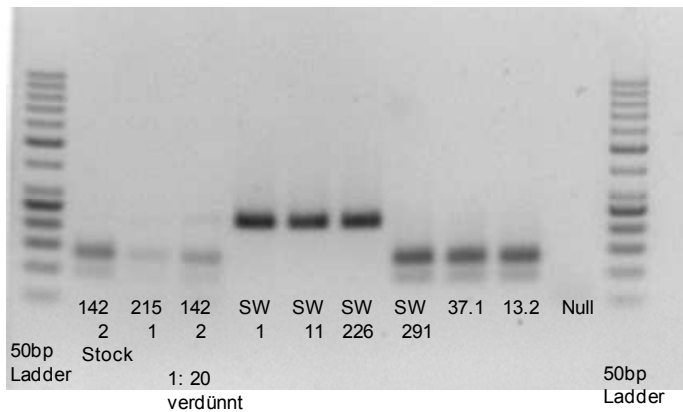
Proben 17, 18, 142, 209, 215 und 294 beschlagnahmte Holzproben

Referenzproben:

SW 1	<i>Swietenia macrophylla</i>
SW 11	<i>Swietenia macrophylla</i>
SW 226	<i>Swietenia macrophylla</i>
SW 291	<i>Swietenia mahagoni</i>
37.1	<i>Swietenia mahagoni</i>
13.2	<i>Swietenia mahagoni</i>
Sa 995	<i>Entandrophragma</i> sp.
Sa 1010	<i>Entandrophragma</i> sp.
Sa1026	<i>Entandrophragma</i> sp.
Cg 1	<i>Carapa guianensis</i>
Cg2	<i>Carapa guianensis</i>
Kn	<i>Khaya</i> sp.

Abbildung 67: PCR-RFLP an beschlagnahmten Holzproben durch den Zoll zur Identifikation der CITES-geschützten Gattung *Swietenia* (Differenzierung zu den Austauschholzgattungen *Entandrophragma*, *Carapa*, *Khaya*)

Haben wir es mit Holz der Gattung *Swietenia* zu tun, wird in einem zweiten Schritt die genaue Holzart mit Hilfe der oben beschriebenen Methoden (Kapitel 6.2.2) identifiziert. Im vorliegenden, aktuellen Fall handelte es sich um die Holzart *Swietenia mahagoni* (siehe Abbildung 68).



Proben 142 und 215 beschlagnahmte Holzproben

Referenzproben:

SW 1	<i>Swietenia macrophylla</i>
SW 11	<i>Swietenia macrophylla</i>
SW 226	<i>Swietenia macrophylla</i>
SW 291	<i>Swietenia mahagoni</i>
37.1	<i>Swietenia mahagoni</i>
13.2	<i>Swietenia mahagoni</i>

Abbildung 68: PCR-RFLP zur Unterscheidung von *S. mahagoni* von *S. macrophylla* mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese; Restriktion der *trnH-psbA*-Sequenz mit Hilfe der Endonuklease *DraI*

8 Internationale Referenz-Datenbank

Ein Projektziel war es, über einen Stakeholderprozess die Möglichkeit einer gemeinsamen Datenbank zu ermitteln, damit die Messdaten des Projekts aus beiden Verfahren und möglicherweise auch zukünftiger Daten gemeinsam verwaltet und interessierten Gruppen zugänglich gemacht werden können.

Während des Projekts zeichnete sich ab, dass das deutsche Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) den Aufbau einer internationalen Datenbank unterstützen würde.

Der WWF diskutierte aus diesem Grund insbesondere mit dem Ministerium die Rahmenbedingungen für eine internationale Referenzdatenbank und brachte vor allem die Erfahrungen der beiden von der DBU finanzierten Fingerprintingprojekte als Empfehlungen ein:

Informationen, die zu jedem Datensatz abgespeichert werden sollten

Die abgespeicherten Informationen der Referenzproben stellen später die Basis beider Fingerprintingmethoden dar. Es ist sehr wichtig, dass diese Daten richtig sind, da es sich sonst um einen systematischen Fehler handelt, der alle nachfolgenden Messungen bzw. Analysen in die Irre leiten. Vor dem Hintergrund ist es aus Sicht des WWF nicht nur wichtig die Kern-Informationen wie GPS Daten und Analyseergebnisse abzuspeichern:

- Proben Identifikationsnummer (bis jetzt wurden die ID's ohne System von den Probennehmern vergeben)
- Land / Region / Ort
- GPS-Daten
- Angaben zu Unternehmen / Organisation, welche die Proben zur Verfügung gestellt hat
- Name Probennehmer
- Organisation für die der Probennehmer tätig ist
- Organisation, welche die Probenahme in Auftrag gegeben hat
- Datum Probenahme
- Holzart (Angaben Probennehmer / Probenlieferant)
- Holzart (eindeutig identifiziert durch XXX; z.B. DNA Analyse vTI; Mikroskopische Bestimmung vTI)
- Auffälligkeiten der Probe
- Bemerkungen des Probennehmers zum Probenstandort
- DNA-Analyseergebnis
- Isotopen-Analyseergebnis
- Analyseergebnis anderer Verfahren

Informationen zum Probennehmer

Bei der angestrebten internationalen Datenbank, wird es unumgänglich, dass von einer zunehmenden Zahl an Quellen Holzproben zur Verfügung gestellt werden. Privatwirtschaftliche Unternehmen können hier eine wichtige Rolle spielen. Wie kann man aber sicherstellen, dass nicht auch falsche Proben bzw. GPS Daten in die Datenbank eingespeist werden (das wäre ein „systematischer Fehler“, der für viel Verwirrung sorgen kann). Angenommen ein Unternehmen das unlautere Ziele verfolgt und eine Konzession neben einem Schutzgebiet besitzt würde Proben aus dem Schutzgebiet einreichen und behaupten, dass die Proben aus der Konzession stammen, könnte das Unternehmen später illegales Holz aus dem Schutzgebiet verarbeiten und mittels Fingerprinting fälschlicherweise „belegen“, dass das Holz aus der Konzession stammt.

Aus diesem Grund ist es nach Ansicht des WWF sehr wichtig, zu jeder Holzprobe im Datensatz auch den Namen des Probennehmers und den Namen der verantwortlichen Organisation abzuspeichern. Stellt sich zu einem späteren Zeitpunkt heraus, dass etwas mit den Proben nicht stimmt, könnte man alle Referenzproben dieser Person bzw. dieser Organisation aus der Datenbank löschen und die Organisation für zukünftige Proben bzw. für den Abruf von Daten sperren. Damit hätte man Sanktionsmaßnahmen, die eine gewisse abschreckende Wirkung hätten.

Je weiter die Datenbank wächst, umso größer wird die Wahrscheinlichkeit, dass Falschproben durch weitere Referenzproben anderer Personen aus der gleichen Region nachträglich identifiziert werden können bzw. auffallen.

Eine weitere Möglichkeit zur Absicherung der Datenbank sind Referenz-Stichproben. Eine unabhängige Person könnte von der für die Datenbank zuständigen Institution beauftragt werden, in Gebieten, von denen bereits Holzproben mit GPS Daten vorliegen stichprobenartig Kontrollproben zu entnehmen. Das Ergebnis der Analyse der Stichprobe kann dann mit der bereits in der Datenbank gespeicherten Referenzdaten abgeglichen werden. Sind die Analyseergebnisse identisch oder zumindest sehr ähnlich, ist es ein Beleg für die Richtigkeit der ursprünglich zur Verfügung gestellten Probe/Daten.

Informationen zur Holzart

Die Bestimmung der Holzart vor Ort ist mitunter extrem schwer. Insbesondere bei Tropenhölzern ist die Bestimmung schwierig. Hinter den Handelsnamen verbirgt sich teilweise eine größere Gruppe von Holzarten. Es ist daher nicht auszuschließen, dass ein Probennehmer Angaben zur Holzart macht, die absichtlich oder unabsichtlich falsch oder ungenau sind. Die nachträgliche Bestimmung der Holzart z.B. über Genmarker erscheint daher sinnvoll.

Ringests

Labore, die weltweit Analysen auf der Grundlage von Datensätzen aus der Datenbank erstellen, sollten regelmäßig an Ringtests teilnehmen, damit ein hohes Niveau bei der Überprüfung und Nachvollziehbarkeit der deklarierten Holzherkunft sichergestellt ist.

Motivation für Unternehmen oder Staaten, sich am Aufbau einer internationalen Datenbank zu beteiligen

Mehrere Aspekte tragen dazu bei, das Vertrauen und die Akzeptanz in eine offene internationale Datenbank zu erhöhen:

- Verwaltung der Datenbank durch eine international, von allen Interessengruppen akzeptierte Organisation
- Sitz der Organisation im Süden ist vorteilhaft
- Sicherheit gegen Hackerangriffe muss gewährleistet sein
- Geregelte Zugriffsrechte (Nutzer müssen sich registrieren)
- (langfristige) Verträge regeln, dass die Datenbank nicht kommerzialisiert werden kann (Gebühren für Datensätze decken die Kosten der Datenbankunterhaltung)
- Der Zugriff ist für alle Interessengruppen offen (Behörden, Unternehmen, NGOs...)
- Vertragliche Sicherheit, dass aus dem zur Verfügung gestellten Probenmaterial keine Patente des Erbmaterials etc. entstehen können, die später zu Ungunsten eines Staates eingesetzt werden könnten, von denen die Proben zur Verfügung gestellt wurden.

Weitere Aspekte, die die Akzeptanz insbesondere bei Produzentenländern erhöhen können (und damit die Bereitschaft den Aufbau einer Datenbank zu unterstützen):

- Angebot für Know-How Transfer (Hilfe beim Aufbau von Genetik- und Isotopenlabors in den Produzentenländern, wissenschaftliche Konferenzen und Austausch...)
- Erhöhte Akzeptanz und Interesse bei den Produzentenländern, wenn die EU diese Methoden zur Kontrolle an den Grenzen in Verbindung mit der EU-Gesetzgebung einsetzt.
- Anreize in Verbindung mit Voluntary Partnership Agreements (VPA): Die Integration von Holz-Fingerprintingmethoden in das nationale System zur Kontrolle der Holzströme stärkt dieses durch die zusätzlichen Kontrollmöglichkeiten. Aus einer EU-PM vom Juli 2010: “Head of EU Delegation commends progress on development of innovative Wood Tracking System.... The WTS is being developed in context of the EU-Ghana Voluntary Partnership Agreement (VPA)....”.

- Setzen EU-Länder selbst die Fingerprinting Methoden zur Kontrolle von importiertem Holz ein, wird wahrscheinlich das Interesse der Produzentenländer wachsen selbst über diese Kontrollmöglichkeiten und eigene Labors zu verfügen.

Die vom WWF eingebrachten Empfehlungen wurden vom BMELV positiv diskutiert. Im Grundsatz besteht Übereinstimmung bei den gelisteten Punkten für eine internationale Datenbank. Vom BMELV wurde ab 2011 die Finanzierung einer Stelle auf drei Jahre sichergestellt, mit deren Hilfe die Grundlagen für eine offene internationale Referenzdatenbank gelegt werden sollen. Nach jetzigem Stand soll die Datenbank bei Biodiversity International in Singapur angesiedelt werden.

Auch während der Internationalen Konferenz in Eschborn wurde von den Interessensgruppen über das Thema Datenbank diskutiert. Empfehlungen waren:

- Zuverlässigkeit des Probenmaterials
- Zusammenführung der Statistiken beider Methoden
- Zusammenführung der Referenzdaten beider Methoden in einer Datenbank

9 Konferenzen

9.1 GIZ/WWF - Holz-Fingerprinting Konferenz; Eschborn (11/2010)

Anfang November 2010 fand eine internationale Konferenz zum Thema Holz-Fingerprinting in Eschborn (Deutschland) statt. Die Konferenz wurde von der GIZ (vormals GTZ) und dem WWF Deutschland organisiert. Die Konferenz wurde von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) und der Europäischen Union finanziell unterstützt.

Die Konferenz "Genetische und Isotope Fingerprintingmethoden – praktische Werkzeuge um die deklarierte Herkunft von Holz zu verifizieren" präsentierte Ergebnisse aus zwei Projekten, die beide zum Zeitpunkt der Konferenz kurz vor dem Abschluss standen.

1. Das DBU finanzierte, hier beschriebene Projekt mit dem Titel ("Fingerprinting von Holz Bekämpfung des illegalen Holzeinschlags durch Einführung einer Kombination der Isotopenmethode zur Herkunftsidentifizierung von Holz und der DNA-Analyse zur Artdifferenzierung von Holz").
2. Ein von der GIZ durchgeführtes und von der EU finanziertes Projekt. Das Projekt demonstrierte die Anwendbarkeit der Methoden auf Konzessionsebene für zwei Holzarten in Kamerun (FLEGT-Voluntary Partnership Agreement (VPA) Land)

Das Ziel der Konferenz war es, einem Forum die Erfahrungen und Ergebnisse aus den zwei Projekten zu präsentieren und gemeinsam zu diskutieren. Weiter sollten die Potentiale und die zukünftigen Voraussetzungen für die praktische Anwendbarkeit diskutiert werden. Darüber hinaus sollten die technischen Voraussetzungen für den Aufbau einer internationalen Datenbank besprochen werden.

69 Teilnehmer aus 19 Ländern nahmen an der Konferenz teil.

Die Projektergebnisse aus beiden Projekten erhielten sehr positive Rückmeldungen der Teilnehmer. Für alle Interessensvertreter und Repräsentanten aus Produzentenländern, Käuferländern, Ministerien, Wissenschaftler und Nichtregierungsorganisationen (NGOs) brachten die Präsentationen und Diskussionen hochinteressante Neuigkeiten über den Stand der Entwicklung der Fingerprintingmethoden und deren Anwendbarkeit. Die Diskussion über das Anwendungsspektrum, Überschneidung und Ausweitung in Bezug auf die neuen gesetzlichen Bestimmungen der EU zum Ausschluss von illegalem Holz aber auch Diskussionen über die Entwicklung der Methoden waren lebhaft und fruchtbar. Eine Vielzahl an Empfehlungen für die praktische Anwendung und die weitere wissenschaftliche Arbeit konnten zusammengetragen werden. Die Atmosphäre am Ende der Konferenz war ausgesprochen optimistisch, dass diese Fingerprintingmethoden eine Rolle bei der Kontrolle der Holzströme und beim Ausschluss von illegalem Holz spielen können und werden.

Eine Zusammenfassung in gedruckter Form wurde in englischer und französischer Sprache erstellt. Der Text wurde auch ins Spanische übersetzt.

Die Zusammenfassung der Konferenz kann unter <http://www.wwf.de/themen/waelder/illegaler-holzeinschlag/> heruntergeladen werden.

Die wichtigsten Empfehlungen aus den Diskussionsbeiträgen der Konferenz:

- Öffentlichkeitsarbeit, um Interessengruppen einzubinden
- Unterstützung nationaler Kontrollmechanismen in Produzentenländern in Verbindung mit CITES und FLEGT. Dabei sollten Prioritäten bei der Auswahl der Holzarten festgelegt werden.
- Integration in nationale Tracking- und Monitoringsysteme
- Capacitybuilding in Produzentenländern
- Koordination durch regionale Organisation wie zum Beispiel COMIFAC (zentralafrikanische Waldkommission; commission des forets d'afrique centrale)
- Regelmäßige internationale Konferenzen
- Weiterer Informationsaustausch über den Aufbau und die Ausgestaltung der internationalen Datenbank
- Der große Nutzen der Methoden für die Umsetzung der CITES Bestimmungen, sollten dem CITES Plants Committee zugänglich gemacht werden.
- Kooperation mit internationalen Organisationen wie CITES, ITTO oder FAO

Darüber hinaus gab es eine Reihe Empfehlungen im Bereich der Wissenschaft, um die Weiterentwicklung der Methoden effektiv zu gestalten.

9.2 Weltbank - Potomac Forum und WRI/eia – Legal Forest Alliance Meeting (5/2011)

Am 4. Mai 2011 fand das Potomac Forum der Weltbank (WB) zum Thema illegaler Holzeinschlag und Handel in Washington DC statt. Das Potomac Forum wurde 1982 als Schulungsforum ohne finanzielle Interessen gegründet. Die Konferenzen und Schulungen decken ein breites Spektrum an Bildungsangeboten für US-Behörden und Industrie ab. Neben Vertretern der Weltbank nahmen Vertreter von US-Forest-Services, Society of American Foresters, USAID; US-Department of Justice, US-Department of State, International Wood Products Association und andere an der Veranstaltung teil. (<http://www.potomacforum.org/>)

Am 5. Mai 2011 fand das Forest Legality Alliance Meeting (FLA) in Washington DC statt. FLA ist eine gemeinsame Initiative des World Resources Institute (WRI) und der Environmental Investigation Agency (eia) um den illegalen Holzeinschlag zu verringern. (<http://www.forestlegality.org/>)

Auf beiden Veranstaltungen war das Thema Holz-Fingerprinting integriert. Durch verschiedene Präsentationen, Vorträge und Diskussionen konnten die Fortschritte und der Stand der Entwicklung im Bereich Holz-Fingerprinting durch Genmarker und Isotopenmethode vorgestellt werden.

Darüber hinaus gab es in vor und nach den beiden Veranstaltungen zusätzliche Treffen und Diskussionen mit US-Behördenvertretern zum Thema Holz-Fingerprinting.

10 Veröffentlichungen und Öffentlichkeitsarbeit

10.1 Presse

- 2008: Deutsche Welle
- 2008: Holzkurier
- 2008: Holz-Revue
- 2008: Stihl Magazin
- 2009: Fachforum bei der CBD in Bonn 2009
- 2010: Infolyer über das hier beschriebene Projekt
- 2011: DBU Imagefilm
- 2011: Deutschlandradio-Kultur

10.2 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

- Boner M., Hofem S., Förstel H.: Charakterisierung der geografischen Herkunft von Teak (*Tectona grandis*) mit Hilfe der natürlichen Variation der stabilen Isotope; (wird eingereicht)
- Boner M., Hofem S., Förstel H.: Charakterisierung der geografischen Herkunft von echtem (*Swietenia macrophylla*) und afrikanischem (*Khaya spec.*) Mahagoni sowie anderen afrikanischen Holzarten mit Hilfe der natürlichen Variation der stabilen Isotope; (wird eingereicht)
- Höltken A.M., Schröder H., Wischnewski N., Degen B., Magel E. & Fladung M. (in press): "Development of DNA-based methods to identify CITES-protected tree species: A case study in the Meliaceae family." *Holzforschung, International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, deGruyter.

- Universität Hamburg

FELLINGHAUER D., HÖLTKEN A.M., DEGEN B., JOLIVET C. & FLADUNG M. (2010) DNA-Marker: Dem illegalen Holzhandel auf der Spur. (DNA Markers: On the Trail of Illegal Logging) Trade journal *Faszination Holz*, 1/10, 30-34.

DEGEN B. & HÖLTKEN A.M. (2011) DNA-Methoden zur Kontrolle von Holzart und Holzherkunft. (DNA Methods for Verifying Wood Species and Wood Origin). *Holz-Zentralblatt publication* 19, p. 416.

11 Zusammenfassung und Ausblick

11.1 Isotopen

Im durchgeführten Projekt konnten grundlegende Voraussetzungen zur Entwicklung und Etablierung von leistungsfähigen Datenbanken zur Herkunftskontrolle von Teak und Mahagoni-Arten geleistet werden. Es stehen nun eine Vielzahl von Referenzen von mehr als 14 unterschiedlichen Regionen von Asien, Afrika und Lateinamerika zur Verfügung. Anhand dieser Regionen kann gezeigt werden, dass die stabilen Isotope der Bioelemente und Strontium für viele Regionen signifikante bis vollständige Differenzierungen ermöglichen. Hervorzuheben sind dabei Regionen aus Asien wie Laos, Java und Indien oder Lateinamerika mit Honduras und Brasilien. Auch Regionen wie Papua-Neugunien, Peru oder Kongo / Ghana weisen eindeutige Muster der stabilen Isotope auf, die hinreichend geeignet sind, eine Herkunftsanalyse zu gewährleisten.

Ein besonderer Vorteil der stabilen Isotope ist die Möglichkeit, auch anhand von Einzelproben Herkunftsaussagen zu liefern. Dies konnte gerade anhand des Blindtests aufgezeigt werden. Natürlich steigt durch eine Einzelprobe die Fehlerrate der Zuordnung. Wie bei jeder analytischen Methode sind auch bei den stabilen Isotopen diese „Unschärfen“ nicht auszuschließen. Es besteht jedoch einerseits die Möglichkeit diese „Unschärfen“ zu minimieren, indem ein robuster Mittelwert von Regionen von Verdachtsproben erstellt wird (Beispiel: Asien-Regionen). Andererseits kann mit einer kleinräumigen Clusterungen von Datensätzen die Differenzierungsgüte von Regionen entscheidend verbessert werden (siehe Beispiel Panama, Costa Rica).

Diese Verknüpfungen mit geographischen Informationen stellen essentielle Bausteine für eine leistungsfähige Herkunftsdatenbank auf Basis stabiler Isotope dar, da gerade diese Informationen Kausalitäten in den stabilen Isotopenmustern aufzeigen (siehe Abhängigkeit der D/H Isotopenverhältnisse vom Abstand zur Küste, Java) und somit für eine Detailanalyse genutzt werden können.

Zukünftig kann gerade der chemische Fingerprint (NIR-Analyse) eine leistungsfähige Ergänzung zur stabilen Isotopen Analyse bringen.

Die erreichte Güte dieser ersten Herkunftsdatenbank kann sicherlich anhand des guten Blindtests nachvollzogen werden. Aus den beiden Fehlbewertungen der Blindtests ist dabei abzuleiten, dass Außerreißer vorliegen können, die einem deklarierten Probenkollektiv nicht entsprechen oder aus einer Fehlbewertung aufgrund fehlender Referenzdatensätze aus unbekanntem Regionen resultieren können.

Beide Probleme lassen sich sicherlich durch einen stetigen Ausbau der Datensätze beheben.

Anhand der beiden Holzarten von Teak und Mahagoni kann aufgezeigt werden, dass die stabilen Isotope grundsätzlich die Gegebenheiten der Region insbesondere in den D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen widerspiegeln. Die Ausprägung ist jedoch abhängig von der Baumart, so dass eine Übertragung von Referenzdaten auf andere Baumarten zwar möglich ist, jedoch mit einer Konstanten angepasst werden muss.

11.2 Artidentifizierung mittels Genmarker

In Abbildung 69 sind eine Reihe von CITES-geschützten Baumarten mit deren leicht verwechselbaren Austauschhölzern aufgeführt, für die dringend DNA-basierte Verfahren der Artidentifikation benötigt werden.

CITES-geschützte Holzarten			Austausch-Holzarten	
Wissenschaftlicher Name	Handelsname	CITES-Status	Wissenschaftlicher Name	Handelsname
<i>Dalbergia retusa</i>	Cocobolo	in prep.	<i>Dalbergia maritima</i>	Madagaskar Rosenholz
<i>Dalbergia stevensonii</i>			<i>Dalbergia spruceana</i>	Amazonas Rosenholz
			<i>Dalbergia latifolia</i>	Indisches Rosenholz
<i>Dalbergia nigra</i>	Brasilianisches Rosenholz	I	<i>Dalbergia spruceana</i>	Amazonas Rosenholz
			<i>Dalbergia latifolia</i>	Indisches Rosenholz
			<i>Machaericum scleroxylon</i>	Santos Rosenholz
<i>Fitzroya cupressoides</i>	Patagonische Zypresse	I	<i>Sequoja sempervirens</i>	Küstenmammutbaum
			<i>Thuja plicata</i>	Riesen-Lebensbaum
<i>Pterocarpus santalinus</i>	Padouk	II	<i>Pterocarpus indicus</i>	Amboina
			<i>Pterocarpus soyauxii</i>	Padouk

Abbildung 69: Eine Auswahl weiterer geschützter Baumarten und die mit ihnen leicht zu verwechselnden Austauschholzarten, für die eine genetische Artidentifikationsmethode sinnvoll erscheint

Die vorliegende Arbeit hat aber auch noch einen weiteren wissenschaftlichen Aspekt zu Tage gebracht, der derzeit eingehender untersucht wird. Dabei geht es um den taxonomischen Status der drei hier behandelten *Swietenia*-Arten. Insbesondere die Tatsache, dass *S. macrophylla* von *S. humilis* mit Hilfe der Chloroplasten-DNA nicht unterschieden werden kann, könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass es sich hier nicht um zwei reproduktiv isolierte Arten, sondern womöglich nur um Ökotypen derselben Art handelt. Dazu werden derzeit Untersuchungen an ITS-(Internal Transcribed Spacer) Sequenzen (Kern-DNA) vorgenommen, um diese Hypothese zu bestätigen.

11.3 Ausblick

Die Auswertung des Blindtest sowie der Praxistest bei beschlagnahmtem Teak zur **Überprüfung der deklarierten Herkunft** demonstriert das große Potential der Stabil-Isotopenmethode. Im Vergleich zum ersten von der DBU finanzierten Projekt, das sich auf Europa und Nordwest-Russland konzentrierte, war die Herausforderung bei der Überprüfung der deklarierten Herkunft mittels Isotopenmethode bei diesem Projekt wesentlich anspruchsvoller. Hintergrund ist die Tatsache, dass der globale Wasserkreislauf am Äquator beginnt und sich jeweils zu den Polen bewegt. In Äquatornähe gibt es in einigen Regionen keine eindeutigen Hauptwindrichtungen, wodurch sich die Verteilung der natürlichen Isotope uneinheitlicher und damit die Anwendung der Isotopenmethode schwieriger als z.B. in Deutschland gestaltet. Auch wenn sich diese theoretische Grundlage im Projekt bestätigte, konnten trotzdem in den Tropen gute Ergebnisse erzielt werden. Die Isotopenmethode kommt somit sowohl für die gemäßigte, die boreale als auch für tropische Regionen als Methode zur Überprüfung der deklarierten Herkunft in Frage.

Der beschriebene Ansatz der Entwicklung von low-budget-Methoden zur **Identifikation von Holzarten auf der Basis von Chloroplasten-DNA** hat vielversprechende Ergebnisse für den Vollzug internationaler Artenschutzbestimmungen (CITES) hervorgebracht. Ferner konnten erste praktische Erfahrungen an durch den Zoll beschlagnahmtem Holz gesammelt werden. Eine Analyse mit den hier beschriebenen Verfahren konnte eindeutig einen Verstoß gegen CITES-Gesetze nachweisen und ermöglichte die exakte Bestimmung der Holzart. Damit ist die Erweiterung dieser Methode auch auf weitere Baumarten sehr empfehlenswert.

Natürlich stellen die hier beschriebenen Verfahren auch für alle anderen Pflanzen- (und auch Tier-) arten eine interessante und zukunftsweisende Möglichkeit der behördlichen Kontrolle dar.

12 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: NATÜRLICHES VERBREITUNGSGEBIET TEAK, MAHAGONI, AFRIKANISCHES MAHAGONI	11
ABBILDUNG 2: WÄHREND DES PROJEKTS GESAMMELTE HOLZPROBEN	12
ABBILDUNG 3: DIE RELATIVE HÄUFIGKEIT VON ^{12}C UND ^{13}C IN ATOMPROZENT IN ABHÄNGIGKEIT VON DER MATRIX. AM BEISPIEL DES KOHLENSTOFFS WERDEN GERINGE ABWEICHUNGEN DES ^{13}C GEHALTES IN VERSCHIEDENEN MATRIZES DARGESTELLT. EINE ABWEICHUNG UM +0,001 ATOM-% ENTSPRICHT ETWA EINER ANREICHERUNG UM 1 %.....	15
ABBILDUNG 4: BEISPIELHAFTER AUZÄHLUNG VERSCHIEDENER ISOTOPENSTANDARDS FÜR DIE STABILEN ISOTOPE DER BIOELEMENTE. DIE PRIMÄRSTANDARDS, BIS AUF DEN ATMOSPHERISCHEN STICKSTOFF, SIND NUR NOCH IN RESTBESTÄNDEN VORHANDEN. DER VSMOW (VIENNA-SMOW) STELLT DABEI EINE BESONDERHEIT DAR, ER WIRD VON DER IAEA ANGEGLICHEN AM SMOW NACHGEMISCHT. DIE NACHFOLGENDEN STANDARDS WURDEN IN INTERNATIONALEN RINGTESTS GEGEN DIESE PRIMÄRSTANDARDS KALIBRIERT UND KÖNNEN ALS ALTERNATIVEN BEI DER IAEA ERWORBEN WERDEN.....	16
ABBILDUNG 5: GERÄTEKOMBINATION ZUR ANALYSE DER STABILEN ISOTOPE DER BIOELEMENTE UND DER STABILEN ISOTOPE VON STRONTIUM	18
ABBILDUNG 6: ORTE DER PROBENZIEHUNG VON TEAK UND MAHAGONI IN JAVA	22
ABBILDUNG 7: PROBENORTE VON TEAK IN PAPUA-NEUGUINEA.....	22
ABBILDUNG 8: PROBENORTE VON TEAK IN LAOS.....	22
ABBILDUNG 9: PROBENORTE VON TEAK IN BIRMA.....	23
ABBILDUNG 10: PROBENORTE VON TEAK IN INDIEN.....	23
ABBILDUNG 11: PROBENORTE VON MAHAGONI IM KONGO.....	23
ABBILDUNG 12: PROBENORTE VON MAHAGONI UND TEAK IN GHANA.....	23
ABBILDUNG 13: PROBENORTE VON TEAK UND MAHAGONI IN PANAMA	23
ABBILDUNG 14: PROBENORTE VON TEAK IN PANAMA	23
ABBILDUNG 15: SCHLAGMÜHLE SM100 ZUR VORZERKLEINERUNG DER HOLZPROBEN	24
ABBILDUNG 16: STATISTISCHE KENNDATEN VON TEAK AUS BIRMA, JAVA UND LAOS; ÜBEREINSTIMMUNG DER PROBEN (ZEILEN) MIT DEN REFERENZEN AUS DEN REGIONEN (SPALTEN).....	26
ABBILDUNG 17: ERRECHNETE D/H UND $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ISOTOPENVERHÄLTNISSE VON GRUNDWASSER IN DER REGION JAVA	26
ABBILDUNG 18: D/H ISOTOPENVERHÄLTNISSE VON TEAK (CELLULOSE) IN JAVA	28
ABBILDUNG 19: $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ISOTOPENVERHÄLTNISSE VON TEAK (CELLULOSE) IN JAVA.....	28
ABBILDUNG 20: ABHÄNGIGKEIT DER D/H UND $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ISOTOPENVERHÄLTNISSE VON TEAK (CELLULOSE) VOM LÄNGENGRAD	28
ABBILDUNG 21: ABHÄNGIGKEIT DER $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, D/H UND $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ISOTOPENVERHÄLTNISSE IN TEAK (CELLULOSE) IM ABSTAND ZUM MEER IN JAVA	29
ABBILDUNG 22: KORRELATION DER D/H UND $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ISOTOPENVERHÄLTNISSE DER VIER PROBENKOLLEKTIVE UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DES ABSTANDES ZUM MEER IN JAVA	29
ABBILDUNG 23: $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ISOTOPENVERHÄLTNISSE IM TEAK (CELLULOSE) IN JAVA.....	30
ABBILDUNG 24: ISOTOPENVERHÄLTNISSE VON STRONTIUM ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$) IN JAVA, FAKTORISIERT MIT 1000)	30
ABBILDUNG 25: ISOTOPENVERHÄLTNISSE VON SCHWEFEL ($^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) IN JAVA	31
ABBILDUNG 26: ISOTOPENVERHÄLTNISSE VON STICKSTOFF ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) IN JAVA	32
ABBILDUNG 27: STANDARDABWEICHUNG DER D/H ISOTOPENVERHÄLTNISSE VON TEAK (CELLULOSE) DER 26 PROBENKOLLEKTIVE	33
ABBILDUNG 28: STANDARDABWEICHUNG DER $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ISOTOPENVERHÄLTNISSE VON TEAK (CELLULOSE) DER 26 PROBENKOLLEKTIVE	33
ABBILDUNG 29: DIFFERENZIERUNG (DA) UND STATISTISCHE KENNDATEN VON TEAK AUS DEN REGIONEN BIRMA, JAVA UND LAOS MIT HILFE DER STABILEN ISOTOPE DER BIOELEMENTE.....	34
ABBILDUNG 30: BOXPLOTS DER $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ISOTOPENVERHÄLTNISSE VON TEAK IN BIRMA, JAVA, UND LAOS.....	35
ABBILDUNG 31: DIFFERENZIERUNG (DA) UND STATISTISCHE KENNDATEN VON TEAK AUS 7 UNTERSCHIEDLICHEN ASIATISCHEN REGIONEN	36
ABBILDUNG 32: BOXPLOTS DER $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ ISOTOPENVERHÄLTNISSE VON INDIEN UND VIETNAM UND ANDERER ASIATISCHER LÄNDER.....	37

ABBILDUNG 33: DIFFERENZIERUNG (DA) UND STATISTISCHE KENNDATEN VON TEAK UNTER EINENGUNG AUF 5 REGIONEN AUS ASIEN	38
ABBILDUNG 34: DIFFERENZIERUNG (DA) UND STATISTISCHE KENNDATEN VON TEAK UNTER EINENGUNG AUF 5 REGIONEN AUS ASIEN	39
ABBILDUNG 35: BOXPLOTS DER D/H UND $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ISOTOPENVERHÄLTNISSE DER REGIONEN: HONDURAS, BRASILIEN, PANAMA UND COSTA RICA IM VERGLEICH.....	40
ABBILDUNG 36: DIFFERENZIERUNG (DA) UND STATISTISCHE KENNDATEN VON TEAK AUS 4 REGIONEN VON LATEINAMERIKA.....	41
ABBILDUNG 37: DIFFERENZIERUNG (DA) UND STATISTISCHE KENNDATEN VON TEAK AUS LATEINAMERIKA UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ISOTOPE	42
ABBILDUNG 38: ORTE DER PROBENZIEHUNG IN PANAMA UND COSTA RICA	42
ABBILDUNG 39: DIFFERENZIERUNG (DA) UND STATISTISCHE KENNDATEN DER REGIONALEN AUFTeilUNG VON TEAK AUS PANAMA UND COSTA RICA.	43
ABBILDUNG 40: DIFFERENZIERUNG (DA) UND STATISTISCHE KENNDATEN VON TEAK AUS COSTA RICA, HONDURAS UND PANAMA AUSGEWÄHLT FÜR DIE WEITERGEHENDE DIFFERENZIERUNG MIT NIR	45
ABBILDUNG 41: DIFFERENZIERUNG (DA) UND KENNDATEN DER NIR-ANALYSE DER AUSGEWÄHLTEN 29 PROBEN VON TEAK AUS DEN REGIONEN COSTA RICA, HONDURAS UND PANAMA.....	46
ABBILDUNG 42: DIFFERENZIERUNG (DA) UND KENNDATEN DER NIR UND DER $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ UND D/H DER AUSGEWÄHLTEN 29 PROBEN VON TEAK AUS DEN REGIONEN COSTA RICA, HONDURAS UND PANAMA.....	47
ABBILDUNG 43: KENNDATEN DER DISKRIMINANZANALYSE (DA) DER STABILE ISOTOPE DER BIOELEMENTE VON TEAK AUS LATEINAMERIKA UND ASIEN	48
ABBILDUNG 44: KENNDATEN DER DISKRIMINANZANALYSE (DA) DER NIR-ANALYSE VON TEAK AUS LATEINAMERIKA UND ASIEN	48
ABBILDUNG 45: KENNDATEN DER DISKRIMINANZANALYSE (DA) DER KOMBINATION DER STABILEN ISOTOPE DER BIOELEMENTE MIT DER NIR-ANALYSE VON TEAK AUS LATEINAMERIKA UND ASIEN.	48
ABBILDUNG 46: BOXPLOTS DER $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ UND D/H ISOTOPENVERHÄLTNISSE DER REGIONEN: HONDURAS, BRASILIEN, PANAMA, COSTA RICA UND GHANA IM VERGLEICH.....	50
ABBILDUNG 47: EXEMPLARISCHER JAHRESVERLAUF DER NIEDERSCHLAGSMENGE IN HONDURAS UND GHANA	51
ABBILDUNG 48: BOXPLOT DER $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ISOTOPENVERHÄLTNISSE VON TEAK (CELLULOSE) DER REGIONEN: GHANA UND HONDURAS IM VERGLEICH ZUM BOXPLOT DER KORRELATIONSZAHL DER $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ UND D/H ISOTOPENVERHÄLTNISSE (D-EXCESS)	52
ABBILDUNG 49: DIFFERENZIERUNG (DA) UND KENNDATEN VON PROBEN AUS LATEINAMERIKA INSBESONDERE HONDURAS IM VERGLEICH ZU PROBEN AUS GHANA.	53
ABBILDUNG 50: DIFFERENZIERUNG (DA) UND KENNDATEN DER STABILEN ISOTOPE DER BIOELEMENTE VON MAHAGONI-PROBEN AUS COSTA RICA, HONDURAS UND PANAMA IM VERGLEICH	54
ABBILDUNG 51: DIFFERENZIERUNG (DA) UND KENNDATEN DER STABILEN ISOTOPE DER BIOELEMENTE VON MAHAGONI-PROBEN AUS COSTA RICA, HONDURAS, PANAMA UND PERU IM VERGLEICH	55
ABBILDUNG 52: DIFFERENZIERUNG (DA) UND KENNDATEN DER STABILEN ISOTOPE DER BIOELEMENTE VON MAHAGONI-PROBEN AUS LATEINAMERIKA (COSTA RICA, PANAMA, HONDURAS), SOWIE MAHAGONI AUS ASIEN (INDIEN, JAVA) UND AFRIKA (KONGO).....	56
ABBILDUNG 53: DIFFERENZIERUNG (DA) UND KENNDATEN DER STABILEN ISOTOPE DER BIOELEMENTE VON MAHAGONI-PROBEN AUS ASIEN (INDIEN, JAVA) UND AFRIKA (GHANA, KONGO).....	57
ABBILDUNG 54: DIFFERENZIERUNG (DA) UND KENNDATEN DER STABILEN ISOTOPE DER BIOELEMENTE VON MAHAGONI-PROBEN AUS LATEINAMERIKA (COSTA RICA, PANAMA, HONDURAS), ASIEN (INDIEN, JAVA), AFRIKA (KONGO) UND UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG VON GHANA.....	58
ABBILDUNG 56: BOXPLOT DER $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ UND D/H ISOTOPENVERHÄLTNISSE VON TEAK UND MAHAGONI AUS GHANA IM VERGLEICH (KLEINRÄUMIGE PROBENZIEHUNG.....	59
ABBILDUNG 55: KLEINRÄUMIGE BEPROBUNGSSORTE (< 10 KM) VON TEAK UND MAHAGONI IN GHANA	59
ABBILDUNG 57: BOXPLOT DER D/H ISOTOPENVERHÄLTNISSE VON TEAK UND MAHAGONI AUS VERSCHIEDENEN HERKÜNFTEN	60
ABBILDUNG 58: BOXPLOT DER $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ISOTOPENVERHÄLTNISSE VON TEAK UND MAHAGONI AUS VERSCHIEDENE HERKÜNFTEN.....	60
ABBILDUNG 59: EINE AUSWAHL AN NICHT-KODIERENDEN CP-DNA-FRAGMENTEN („INTERGENIC SPACER“) IM LSC-BEREICH (LARGE SINGLE COPY) DES RINGFÖRMIGEN CHLOROPLASTEN-CHROMOSOMS, WELCHE AUF UNTERSCHIEDE ZWISCHEN ARTEN GETESTET WURDEN	63
ABBILDUNG 60: HERKÜNFTE DER PROBEN DER GATTUNG <i>SWIETENIA</i> ZUR METHODEN-ETABLIERUNG.....	66

ABBILDUNG 61: ERMITTELTE FRAGMENTLÄNGEN AN EINER AUSWAHL AN AMPLIFIKATIONS-PRODUKTEN FÜR DIE ARTEN DER GATTUNG <i>SWIETENIA</i> UND FÜR <i>TECTONA GRANDIS</i>	68
ABBILDUNG 62: AGAROSEGEL ZUR UNTERSCHIEDUNG VON ARTEN DER GATTUNG <i>SWIETENIA</i> VON <i>TECTONA GRANDIS</i> ANHAND VON FRAGMENTLÄNGENUNTERSCHIEDEN AM cpDNA-GENORT <i>trnH-psbA</i>	69
ABBILDUNG 63: SNP (= SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM, EINZELNUKLEOTIDUNTERSCHIED) AM cpDNA-LOCUS <i>trnH-psbA</i> (AUSTAUSCH VON A = ADENIN BEI <i>SWIETENIA MAHAGONI</i> DURCH C = CYTOSIN BEI <i>S. MACROPHYLLA</i> UND <i>S. HUMILIS</i>)	70
ABBILDUNG 64: VISUALISIERUNG DER PCR-RFLP-METHODE ZUR UNTERSCHIEDUNG VON <i>S. MAHAGONI</i> VON <i>S. MACROPHYLLA/S. HUMILIS</i> MIT HILFE DER PAA-(POLYACRYLAMID-) GELELEKTROPHORESE; RESTRIKTION EINER SEQUENZ DES INTERGENISCHEN BEREICHS <i>trnH-psbA</i> MIT HILFE DER ENDONUKLEASE <i>DraI</i>	70
ABBILDUNG 65: ÜBERSICHT BLINDPROBENTEST	72
ABBILDUNG 66: PRAXISTEST VON BESCHLAGNAHMTEN TEAKPROBEN MIT DEM VERDACHT DER HERKUNFT AUS BIRMA/MYANMAR (INNERHALB ROT UNTERLEGTEM KREIS)	73
ABBILDUNG 67: PCR-RFLP AN BESCHLAGNAHMTEN HOLZPROBEN DURCH DEN ZOLL ZUR IDENTIFIKATION DER CITES-GESCHÜTZTEN GATTUNG <i>SWIETENIA</i> (DIFFERENZIERUNG ZU DEN AUSTAUSCHHOLZGATTUNGEN <i>ENTANDROPHRAGMA</i> , <i>CARAPA</i> , <i>KHAYA</i>)	74
ABBILDUNG 68: PCR-RFLP ZUR UNTERSCHIEDUNG VON <i>S. MAHAGONI</i> VON <i>S. MACROPHYLLA</i> MIT HILFE DER AGAROSE-GELELEKTROPHORESE; RESTRIKTION DER <i>trnH-psbA</i> -SEQUENZ MIT HILFE DER ENDONUKLEASE <i>DraI</i>	75
ABBILDUNG 69: EINE AUSWAHL WEITERER GESCHÜTZTER BAUMARTEN UND DIE MIT IHNEN LEICHT ZU VERWECHSELNDEN AUSTAUSCHHOLZARTEN, FÜR DIE EINE GENETISCHE ARTIDENTIFIKATIONSMETHODE SINNVOLL ERSCHEINT	85

13 Literatur

ASIF M J & CANNON C H (2007): DNA extraction from processed wood: a case study for the identification of an endangered timber species (*Gonystylus bancanus*). *Plant Mol Biol Report* 23: 185-192.

BOWEN G J & REVENAUGH J (2003) Interpolating the isotopic composition of modern meteoric precipitation. *Water Resources Res* 39: 1299.

BOWEN G J & WASSENAAR L & HOBSON K A (2005): Global application of stable hydrogen and oxygen isotopes to wildlife forensics. *Oecologia* 143: 337-348.

BOWEN G J & WILKINSON B (2002): Spatial distribution of $\delta^{18}\text{O}$ in meteoric precipitation. *Geology* 30: 315-318.

BURK R L & STUIVER M (1981): Oxygen isotope ratios in trees reflect mean annual temperature and humidity. *Science* 211: 1417-1419.

CHUKHROV et al. (1980): The isotopic composition of plant sulphur. *Org Geochem* 2: 69-75.

CRAIG H & GORDON L I (1965): Deuterium and oxygen 18 variations in the ocean and the marine atmosphere. *University of Rhode Island Publication*. Vol. 3: 277-374.

CRAIG H (1961): Isotopic variations in meteoric waters. *Science* 133: 1702-1703.

DE FILIPPIS L & MAGEL E (1998): Differences in genomic DNA extracted from bark and from wood of different zones in *Robinia* trees using RAPD-PCR. *Trees* 12: 377-384

DEGUILLOUX M F, PEMONGE M H & Petit R J (2002): Novel perspectives in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA. *Proc Roy Soc Lond Ser B-Biol Sci* 269: 1039-1046.

DEGUILLOUX MF, PEMONGE MH & PETIT RJ (2002): Novel perspectives in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA. *Proc Roy Soc Lond Ser B-Biol Sci* 269: 1039-1046.

DOUGHTON J.A. & SAFFIGNA P.G. & VALLIS I. (1991): Natural abundance of ^{15}N in barley as influenced by prior cropping or fallow, nitrogen fertilizer and tillage. *Aust J Agric Res* 42: 723-733.

DOYLE J J & DOYLE L J (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.

DUNBAR J. & WILSON A.T. (1983) Oxygen and hydrogen isotopes in fruit and vegetables juices. *Plant Physiol* 72: 725-727.

EPSTEIN S P THOMPSON P & YAPP C J (1977) Oxygen and hydrogen isotopic ratios in

plant cellulose. *Science* 198: 1209-1215.

FRANCIS J K (1991): *Swietenia mahagoni* Jacq. West Indies mahogany. SO-ITF-46. Institute of Tropical Forestry. USDA-FS, Río Piedras, Puerto Rico. 7p.

HEBERT P D N & GREGORY T R (2005): The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Syst Biol* 54: 852-859.

HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L & DE WAARD J R (2003): Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Roy Soc Lond* 270:313-321.

HÖLTKEN A M, SCHRÖDER H, WISCHNEWSKI N, DEGEN B, MAGEL E. & FLADUNG M (submitted): Development of DNA based methods to identify CITES-protected timber species: A case study in the *Meliaceae* family.

KAWAMURA H et al. (2006): Isotopic evidence in tree rings for historical changes in atmospheric sulphur sources. *Environ Sci Technol* 40: 5750-5754.

KEELING C D et al. (1995): Interannual extremes in the rate of rise of atmospheric carbon dioxide since 1980. *Nature* 375: 666-670.

KOCH G, RICHTER H G & GEMBRUCH K (2005): CITESwoodID: Descriptions, illustrations, identification and information retrieval: CD in English and German. Version November 2005, Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft.

KÖRNER C et al. (1991): Carbon isotope discrimination by plants follows latitudinal and altitudinal trends. *Oecologia* 88: 30-40.

KRAUSE J, DEAR P H, POLLACK J L, SLATKIN M, SPRIGGS H, BARNES I, LISTER AM, EBERSBERGER I, PÄÄBO S & HOFREITER M (2006): Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of *Elephantidae*. *Nature* 439:724–727.

KRESS W J & ERICKSON D L (2007): A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLOS one* 6: e508.

KRESS W J, WURDACK K J, ZIMMER E A, WEIGT L A & JANZEN D H (2005): Use of barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8369-8374.

LEHMANN S (2007): Schutz der Wälder -Nationale Verantwortung tragen und global handeln-. BfN-Skripten 209 (Bundesamt für Naturschutz).

LEUENBERGER M et al. (1992): Carbon isotope composition of atmospheric CO₂ during the last ice age from an Antarctic ice core. *Nature* 357: 488-490.

MUELLNER A N, SCHAEFER H & LAHAYE, R (2011): Evaluation of candidate DNA barcoding loci for economically important timber species of the mahogany family (*Meliaceae*). *Mol Ecol Res*: doi:10.1111/j.1755-0998.2011.02984.x.

- NICOLAI B.M. et al. (2007): Nondestructive measurement of fruits and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest Biol Techn* 46: 99-118.
- POINAR H N, SCHWARZ C, Q I J, SHAPIRO B, MACPHEE R D E, BUIGUES B, TIKHONOV A, HUSON DH, TOMSHO L P, AUCH A, RAMPP M, MILLER W & SCHUSTER S C (2006): Metagenomics to paleogenomics: Large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science* 311:392–394.
- RACHMAYANTI Y, LEINEMANN L, GAILING O & FINKELDEY R (2006): Extraction, amplification and characterization of wood DNA from *Dipterocarpaceae*. *Plant Mol Biol Report* 24: 45-55.
- RICHTER H G and DALLWITZ M J (2000 onwards). ‘Commercial timbers: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. In English, French, German & Spanish.’ Version: 4th May 2000.
- ROGAJEV E I, MOLIKA Y K, MALYARCHUK B A, KONDRASHOV F A, DERENKO M V, CHUMAKOV I & GRIGORENKO A P (2006): Complete mitochondrial genome and phylogeny of Pleistocene mammoth *Mammuthus primigenius*. *PLoS Biol* 4:e73.
- SAVARD M M, BEGIN C & SMIRNOFF A (2009): Isotopes reflect anthropogenic NOx emissions and climatic effects *Environ Sci Technol*. 43: 604-609.
- SCHMITZ-KRETSCHMER H J, KOCH G & KRÄMER G (2006): Lupe, Notebook und die Software CITESwoodID. *Holz-Zentralblatt* 132 : 484-485.
- STYLES B T (1981): *Swietenioideae*. In: *Meliaceae*. Flora neotropica monograph. Pennington, STYLES T D & TAYLOR D A H (eds.). New York Botanical Garden. New York. USA. 28 : 359–418.
- SWOBODA S. (2007): Identification of Marchfeld asparagus using Sr isotope ratio measurements by MC-ICP-MS. *Anal Bioanal Chem* 2: 487-494.
- TABERLET P, COISSAC E, POMPANON F, GIELLY L, MIQUEL C, VALENTINI A, VERMUT T, CORTHIER G, BROCHMAN C & WILLERSLEV E (2007): Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant barcoding. *Nucleic Acids Res*: e14.
- TABERLET P, GIELLY L, PAUTOU G & BOUVET J (1991): Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol* 17: 1105-1109.
- TREYDTE K et al. (2001): The climatic significance of $\delta^{13}\text{C}$ in subalpine spruces (Lötschental, Swiss Alps). *Tellus* 53B, 593-661.
- TURNER G L et al. (1987) Differences in the natural abundance of ^{15}N in the extractable mineral nitrogen of cropped and fallowed surface soils. *Aust J Agric Res* 38: 15-25.

- TUSKAN et al. (2006): The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313, 1596-1604.
- PROSSER S J (1993): A novel magnetic sector mass spectrometer for isotope ratio determination of light gases. *Int J Mass Spectrom Ion Processes* 125: 241-266.
- WINNER W E et al. (1978): Stable sulphur isotope analysis of SO₂ pollution impact on vegetation. *Oecologia*. 36: 351-361.
- YAPP C & EPSTEIN S (1982): Climatic significance of the hydrogen isotope ratios in tree cellulose. *Nature* 297: 636–639.
- YONEYAMA T et al. (1989): Fractionation of nitrogen isotopes during the uptake and assimilation of ammonia by plants. *Plant Cell Physiol* 21: 1211-1220.
- YONEYAMA T et al. (1990): Variation of natural ¹⁵N abundance of crops and soils in Japan with special reference to the effect of soil conditions and fertilizer application. *Soil Sci Plant Nutr* 36: 667-675.
- ZIEGLER H et al. (1976): Hydrogen isotope discrimination in higher plants: correlation with photosynthetic pathway and environment. *Planta* 128: 85-92.