

Thünen Institute (FG) · Sieker Landstraße 2 · 22927 Großhansdorf/Germany

Herr Julian Breitschmid

**Institute of  
Forest Genetics**

Dr. Hilke Schroeder  
Senior Scientist  
Sieker Landstraße 2  
22927 Großhansdorf/Germany  
Phone +49 4102 696-148  
Fax +49 4102 696-200  
hilke.schroeder@thuenen.de  
www.thuenen.de

your References

our References

Date  
2021-06-01

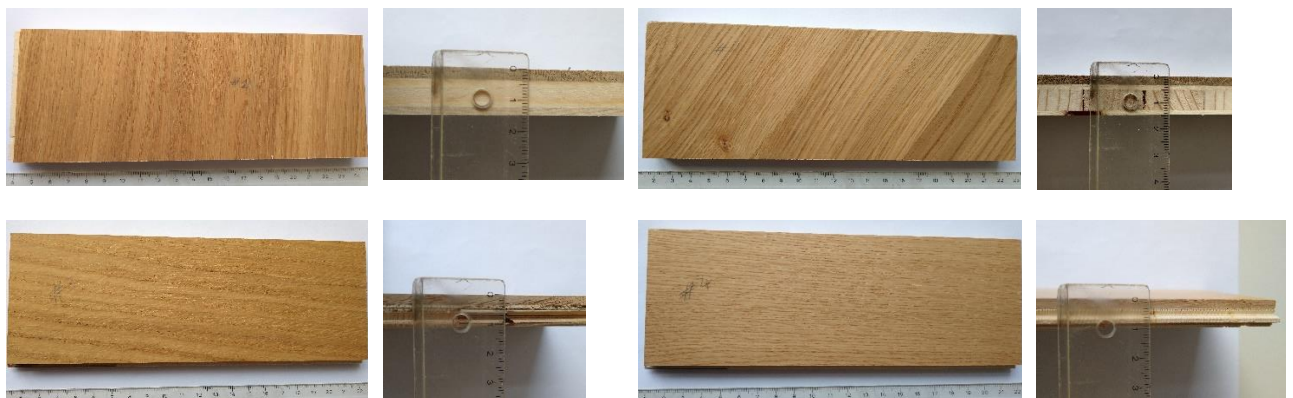
**Report: DNA-Test von Holzproben**

Lieber Herr Breitschmid,

wir erhielten am 11.03.2021 von Ihnen vier Holzproben mit der Bitte um Überprüfung der Herkunft.

**1. Proben und Zielsetzung**

Bei den Holzproben handelte es sich um Parkett, das als *Quercus* sp. aus Österreich deklariert war. Abb. 1 zeigt die Holzproben bei Eingang in unserem Institut.



**Abb. 1:** Eingangsbilder der Holzproben jeweils aus zwei Perspektiven.

In Tabelle 1 sind die Originalauftragsnummern sowie die von uns vergebenen Proben-IDs aufgeführt.

**Tab. 1:** Externe Auftragsnummer sowie Thünen-ID der Holzprobe

Thünen ID	Externe ID	Material	deklarierte Art	deklarierte Herkunft
FG_288_1	#1	Parkett	<i>Quercus</i> sp.	Österreich
FG_288_2	#2	Parkett	<i>Quercus</i> sp.	Österreich
FG_288_3	#3	Parkett	<i>Quercus</i> sp.	Österreich
FG_288_4	#4	Parkett	<i>Quercus</i> sp.	Österreich

Zielsetzung der Untersuchung war die Überprüfung der deklarierten Herkunft „Österreich“.

## 2. Methoden

### 2.1 DNA Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurden zunächst kleine Holzspäne der Eichenholzprobe gewonnen. Dafür wurden sterilisierte und UV dekontaminierte Laborutensilien verwendet. Die Holzspäne wurden zermahlen und die DNA isoliert (Lowe et al. 2015). Alle Schritte der DNA-Extraktion wurden unter einer sterilen Werkbank ausgeführt.

Es wurden zwei unabhängige Extraktionen durchgeführt und für die weitere Analyse verwendet. Zusätzlich wurde eine sogenannte Nullextraktion durchgeführt. Diese wird behandelt wie die Holzproben, enthält aber kein Holzmaterial und dient der Überprüfung auf potentielle Kontaminationen.

### 2.2 Determinierung des kontinentalen Ursprungs

#### 2.2.1 DNA Marker Analyse

Da Holz ein schwieriges Ausgangsmaterial für die DNA-Extraktion darstellt, variiert die DNA-Qualität der verschiedenen Proben, abhängig von Alter und Zustand des Holzes, so dass in einigen Fällen kein bzw. ggf. nur ein Teil der Marker auswertbare Ergebnisse liefert.

Die Markeranalyse erfolgt durch PCR-Amplifikation spezifischer Markerfragmente und wurde unter kontrollierten Bedingungen unter speziellen PCR-Werkbanken durchgeführt.

Die genetischen Marker die zur Bestimmung des kontinentalen Ursprungs von Weißeichen-Holz eingesetzt werden, basieren auf plastidenspezifischen DNA-Sequenzen. Die DNA-Marker „trnCD“ und „trnLF“ unterscheiden zwischen Weißeichen aus entweder Nordamerika oder Eurasien. Bei „trnCD“ basiert diese Unterscheidung auf einem Größenunterschied („InDel“) von 8 Basenpaaren. Markerfragmente, die per PCR aus amerikanischen Eichenproben amplifiziert werden, sind kürzer als die von europäischen oder asiatischen Bäumen. Der Marker „trnLF“ basiert auf einem Größenunterschied („InDel“) der amplifizierten Fragmente von 5 Basenpaaren (die amplifizierten Markerfragmente amerikanischer Weißeichen sind kürzer). Die DNA-Marker „psal-ycf4“ und „psbE-petL“ unterscheiden zwischen Weißeichen die aus Asien oder aber aus Europa bzw. Nordamerika stammen. Der Marker „psal-ycf4“ basiert auf einem Längenunterschied („InDel“) von 4 Basenpaaren (amplifizierte Markerfragmente asiatischer Weißeichen sind kürzer). Der Marker „psbE-petL“ basiert auf einem Größenunterschied („InDel“) von 6 Basenpaaren (amplifizierte Markerfragmente asiatischer Weißeichen sind kürzer) (Schroeder et al. 2016).

Der Marker „trnDT“ unterscheidet zwischen allen 3 zuvor aufgeführten Kontinenten. Nordamerikanische Weißeichenarten weisen einen Längenpolymorphismus von 2 zusätzlichen Basenpaaren auf, der sie von eurasischen Arten unterscheidet. Asiatische und Europäische Arten können durch die Analyse eines Einzelnukleotidunterschieds (SNP) unterschieden werden, indem eine sequenzspezifische Endonuclease eingesetzt wird (Schroeder et al. 2016).

Die PCR amplifizierten Markerfragmente wurden auf einem ABI3730 Kapillarsequenziergerät elektrophoretisch aufgetrennt, die individuellen Genotypen/Fragmentgrößen wurden mit der Software „GeneMarker“ (Version 2.4.0) analysiert.

### 2.2.2 Referenzmaterial

Die Differenzierung der unterschiedlichen Kontinente basiert auf der Kombination der fünf angewendeten Marker, die sogenannten Haplotypen. Die Haplotypen sind spezifisch für die Weißeichen aus jeweils einem der drei Kontinente und alle untersuchten Weißeichen der jeweiligen Kontinente entsprechen diesem Haplotyp. Die Validierung dieser Haplotypen erfolgte anhand einer Sammlung von Referenzproben.

Das Thünen-Institut für Forstgenetik besitzt eine große Sammlung von Referenzproben, die die wichtigen Eichenarten aus Europa (*Quercus robur* und *Q. petraea*), Nordamerika (*Q. alba*, *Q. macrocarpa* u.a.) und Asien (Russland, China und Südkorea: *Q. mongolica*, *Q. dentata*) beinhaltet. Basierend auf dieser Sammlung wurde mit Monte Carlo-Simulationen die maximal mögliche Häufigkeit berechnet, mit der bisher unbeobachtete Haplotyp-Varianten auftreten könnten. Dabei wurde mit 95% Konfidenzintervallen gearbeitet. Diese Methode stellt eine Möglichkeit dar, das Risiko (potentielle Fehlerrate) zu berechnen, dass eine Haplotyp/Marker-Variante, von der wir ausgehen, dass sie für einen Kontinent spezifisch ist, auch in Individuen aus anderen Kontinenten auftritt.

Die Berechnungen basieren auf 110 europäischen, 99 asiatischen und 86 amerikanischen Weißeichen-Individuen. Da wir für eine Bestimmung des kontinentalen Ursprungs minimal 2 unabhängige Marker voraussetzen, führten wir die Berechnungen basierend auf einer Kombination von 2 Markern aus. Auf diese Weise konnte das Risiko in den Referenzdaten eine seltene Variante zu übersehen als 0.1156% für Europa, 0.1369% für Asien und 0.1849% für Amerika berechnet werden.

### 2.3 Determinierung des Ursprungs innerhalb Europas

Innerhalb von Europa ist anhand von bekannten geographisch genetischen Strukturen von Haplotypen der Chloroplasten DNA eine detailliertere Bestimmung der Herkunft möglich (Petit et al. 2002 a,b). Die cpDNA Haplotypen von Weißeichen aus unterschiedlichen europäischen Regionen zeigen ein spezifisches Verbreitungsmuster, das vor allem auf den Rückwanderungsrouten nach der letzten Eiszeit basiert. Die Referenzdaten, auf der diese Arbeiten basieren, reichten östlich bis nach Polen und Ungarn.

Für die Identifizierung von Haplotypen innerhalb Europas werden zwei verschiedene DNA-Fragmente des Chloroplasten amplifiziert und mit drei unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten (Fragment 1.1: MseI, Fragment 1.2: MluCI, Fragment 2: HpyCh4V). Die Analyse basiert auf der Kombination aus einem InDel und drei SNP-Markern. Die geschnittenen PCR-Produkte wurden auf einem ABI3730 Kapillarsequenzierer (Genetic Analyzer) elektrophoretisch aufgetrennt, die individuellen Genotypen/Fragmentgrößen wurden mit der Software „GeneMarker“ (Version 2.4.0) analysiert.

Da die nach Petit et al. (2002a,b) zu identifizierenden Haplotypen nicht bis in die Ukraine reichen, wurden zwei weitere Marker entwickelt, die eine Differenzierung in Haplotypen, die im fernen Norden-Osten Europas auftreten und weiter westlich und süd-westlich gelegene Haplotypen erlauben. Nord-Osten bedeutet von der

Verbreitungsgrenze der europäischen Weißeichen am Uralgebirge westwärts bis nach Weißrussland und der Ukraine („UU“), in der die Übergangszone zu den westlichen Haplotypen liegt. Die Verteilung der südwestlichen Haplotypen reicht von Südrussland (Kaukasus), der Krim bis nach Westeuropa („non\_UU“).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnis Marker-Analyse kontinentaler Ursprung

Da Sie gern die Entnahmestellen auf der Oberfläche des Parketts ersichtlich haben wollten, haben wir zunächst von zwei Proben FG\_288\_2 und FG\_288\_4 die Proben entgegen unserer sonstigen Methode von der behandelten Oberfläche genommen. Da die Ergebnisse für diese beiden Proben relativ schlecht ausfielen (Tab. 2), haben wir die Holzspäne für die anderen beiden Proben FG\_288\_1 und FG\_288\_3 von der Unterseite der Parkett-Decklage genommen. In Tabelle 2 sehen die Ergebnisse für die fünf angewendeten Marker.

**Tab. 2:** Ergebnis der DNA-Marker-Analyse. EuAm = Ursprung ist Europa oder Amerika; Eurasien = Ursprung ist Europa oder Asien wie unter 2.3.1 im Detail beschrieben. „/“ in einem Feld bedeutet, dass für diese Marker kein Ergebnis erzielt werden konnte.

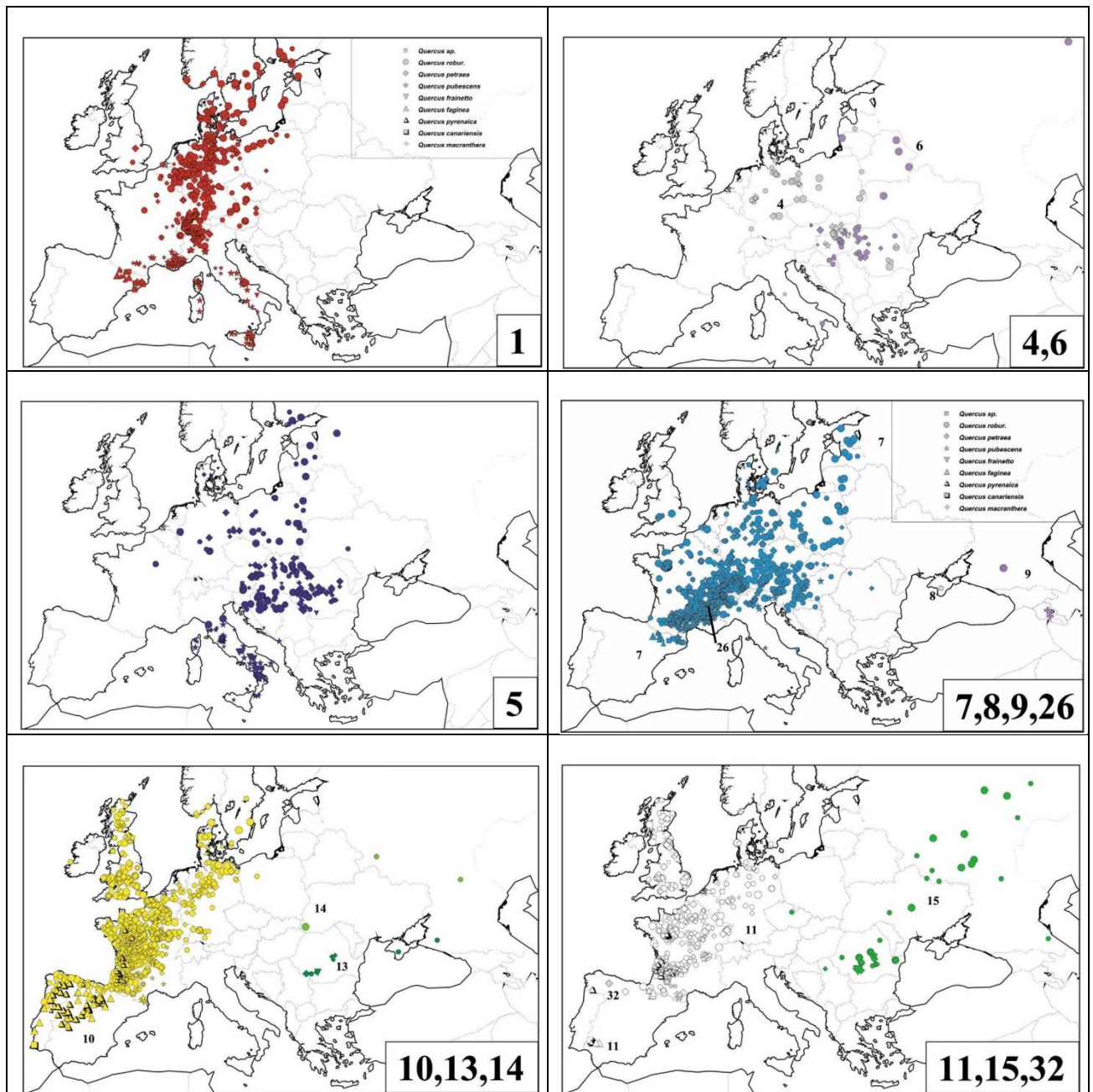
Thünen_ID	Externe ID	deklarierte Herkunft	trnCD	trnLF	psal-ycf4	psbA-petL	trnDT	kontinentale Herkunft
FG_288_1	#1	Österreich	Eurasien	Eurasien	EuAm	EuAm	Europa	Europa
FG_288_2	#2	Österreich	/	/	/	/	/	Kein Ergebnis
FG_288_3	#3	Österreich	/	Eurasien	/	/	Europa	Europa
FG_288_4	#4	Österreich	/	Eurasien	/	EuAm	/	Europa

Das Ergebnis der DNA-Marker-Analyse ergab, dass es sich bei drei der Proben um eine europäische Eichenart handelt (*Quercus robur* oder *Q. petraea*) (Tab. 2). Für die vierte Probe FG\_288\_2 konnte kein Ergebnis erzielt werden.

#### 3.2 Ergebnis Marker-Analyse Herkunft innerhalb Europas

Über einen Vergleich der Holzprobe mit den bekannten Haplotypen ist eine Überprüfung der Plausibilität des angegebenen Ursprungsgebietes möglich. Zu diesem Zweck wird der identifizierte Haplotyp der Holzprobe mit den europäischen Verbreitungsmustern bekannter Haplotypen abgeglichen wie sie in Abb. 2 dargestellt sind.

Für die Analyse der Herkunft innerhalb Europas wurden nur die Proben FG\_288\_1 und FG\_288\_3 verwendet. Bei der Analyse der Holzprobe FG\_288\_1 haben alle Marker funktioniert. Es konnten die Haplotypen 5x, 6 festgestellt werden (Tab. 3). Diese Haplotypen haben ihr Verbreitungsgebiet überwiegend in Osteuropa, kommen aber auch im Osten Österreichs vor (Abb. 2). In Abbildung 3 ist zusätzlich die Verbreitung der „non\_UU“ und „UU“ Haplotypen dargestellt. Für beide Proben FG\_288\_1 und FG\_288\_3 wurde „UU“ festgestellt (rot in Abb. 3). Die Übergangszone zwischen den beiden Haplotypen „non\_UU“ und „UU“ liegt in der Ukraine. Daher ist durch die Kombination von den Haplotypen 5x, 6 und „UU“ die Herkunfts-Deklaration Österreich als unwahrscheinlich einzustufen.



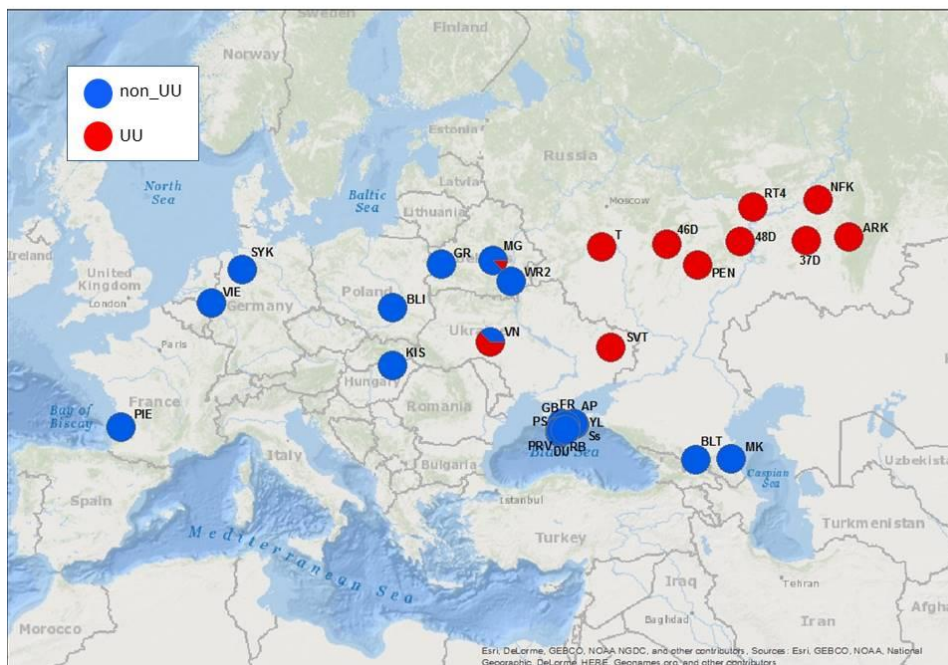
**Abb. 2:** Verbreitung der häufigsten Haplotypen innerhalb Europas (Petit et al. 2002b). Haplotyp 1 (rot) ist am häufigsten in Mittel- und Westeuropa zu finden, Haplotyp 5 (dunkel lila) ist häufiger in Osteuropa anzutreffen. Die Haplotypen 4 (grau) und 6 (hell lila) sind seltene Haplotypen. Wobei HT 4 in Mittel- und Westeuropa verbreitet ist und HT 6 nur in Osteuropa vorkommt. Haplotyp 7 (blau) ist der am weitesten verbreitete Haplotyp. Er kommt von Westeuropa mit Ausnahme der Iberischen Halbinsel bis nach Osteuropa vor. Die drei Haplotypen 10 (gelb), 11 (weiß), und 12 (nicht gezeigt) haben eine nahezu identisches Verbreitungsgebiet, das auf Westeuropa beschränkt ist (Portugal, Spanien, Frankreich, Großbritannien und Deutschland).

**Tab. 3:** Ergebnis der Haplotypenanalyse (HT). Die Größen der Referenzfragmente sind unterhalb der Tabelle angegeben. „/“ in einem Feld bedeutet, dass für diese Marker kein Ergebnis erzielt werden konnte; „nn“ bedeutet, dass keine Aussage möglich ist. „Plausibilität“ bedeutet wie eindeutig die Zuordnung zur Deklaration passt.

Thünen ID	Externe ID	deklarierte Herkunft	Frag. 1.1	Frag. 1.2	Frag. 2	UU_15	UU_48	möglicher HT	Verbreitung HT	Plausibilität
FG_288_1	#1	Österreich	203	90	100	172	79/81	5x,6; UU	Osteuropa	unwahrscheinlich
FG_288_3	#3	Österreich	/	/	/	172	79/81	UU	Osteuropa	unwahrscheinlich

#### Fragmentmuster der Referenz-Haplotypen

	Frag. 1.1	Frag. 1.2	Frag. 2	UU_15	UU_48
HT 1	200	28	100		
HT 4, 5y	203	95	100		
HT 5x, 6	203	90	100		
HT 7	203	90	174		
HT 10, 11, 12	142	90	100		
non_UU				70/102	160
UU				172	79/81



**Abb. 3:** Verbreitung der Haplotypen „non\_UU“ und „UU“ in Europa.

#### 4. Schlussfolgerungen

Mit der DNA-Marker-Analyse konnte für drei der vier Proben ein europäischer Ursprung bestätigt werden. Für eine Probe (FG\_288\_2) konnte kein Ergebnis erzielt werden. Die detaillierte Analyse der Haplotypen ergab für die Probe FG\_288\_1 eine Eingrenzung auf die osteuropäischen Haplotypen 5x, 6 und den „UU“ Typ, der ebenfalls für die Probe FG\_288\_3 ermittelt wurde. In Österreich kommt der „UU“ Typ nicht vor. Daher ist die ursprüngliche Deklaration, dass es sich bei der Probe um *Quercus* sp. aus Österreich handelt, als unwahrscheinlich einzustufen.

Mit freundlichen Grüßen



(Dr. Hilke Schroeder)

#### Literatur:

- Lowe A.J., Jardine D.I., Cross H.B., Degen B., Schindler L., Hoeltken A.M. (2015). A method of extracting plant nucleic acids from lignified plant tissue. Patent WO/2015/070279 filled 2014-11-14 and issued 2015-05-21
- Petit R.J., Csaikl U.M., Bordacs S. et al. (2002a): Chloroplast DNA variation in European white oaks phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2.600 populations. *Forest Ecology and Management* 156: 5-26.
- Petit R.J., Brewer S., Bordacs S. et al. (2002b): Identification of refugia and postglacial colonization routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management* 156: 49-74.
- Schroeder H., Cronn R., Yanbaev Y., Jennings T., Mader M., Degen B., Kersten B. (2016). Development of easy-to-use molecular markers for differentiation within the genus *Quercus*. *PLoS One*: DOI:10.1371/journal.pone.0158221