

# Molekularbiologische Diagnostik an Holz und Holzprodukten

## Biomolecular Diagnostics of Wood and Wood-based Products

### Projektleiterin

**Project leader:**

Kordula Jacobs

### Projektbearbeiterin

**Person in-charge:**

Kordula Jacobs

### Fördermittelgeber

**Funded by:**

BMW i (INNO-KOM-Ost)

### AUSGANGSSITUATION UND ZIELSTELLUNG

Die EU-Holzhandelsverordnung 995/2010 (European Commission 2010) schreibt u. a. den eindeutigen Nachweis von Holzarten und -herkünften von gehandeltem Rund- und Schnittholz sowie zahlreichen Holzprodukten vor, um den illegalen Holzeinschlag und -handel zu unterbinden. Amtliche Kontrollen auf Grundlage papierbasierter Nachweise lassen Raum für betrügerische Aktivitäten. Sie müssen durch fälschungssichere Methoden ergänzt werden, die eine sichere Identifizierung von Spezies und geographischer Herkunft von Holz und Holzprodukten gewährleisten.

Ziel des Projektes war die Entwicklung eines molekularbiologischen Diagnostiktools zur Identifizierung von Holzarten als wesentliches Instrument für ein universelles routinefähiges und sicheres Kontrollsystem zur Bekämpfung von Holzdiebstahl, illegalem Holzeinschlag und -handel sowie zur Qualitätssicherung in der Forst- und Holzwirtschaft. Weiterhin sollten methodische Grundlagen zur Bestimmung der geographischen Herkunft von Hölzern bzw. Holzprodukten erarbeitet werden.

### ERGEBNISSE

Für die Bearbeitung wurden die wirtschaftlich genutzten mitteleuropäischen Baumarten Stieleiche (*Quercus robur*) und die Traubeneiche (*Quercus petraea*) sowie die Gemeine Fichte (*Picea abies*) als

### INITIAL SITUATION AND OBJECTIVE

The EU Timber-trading Regulation 995 (European Commission 2010) requires to clearly prove the species and geographic origin of traded wood and wood-based products in order to inhibit illegal logging and trading. Official checks resting on paper-based proof leave space for fraudulent activities. They need to be supplemented by anti-counterfeit methods.

The project aimed at developing a diagnostic biomolecular tool for identifying wood species as a substantial instrument for a universal and safe routine control to combat timber theft, illegal logging and trading as well as for quality control in forestry and the timber industry. It furthermore focused on elaborating methodological foundations to determine the geographic origin of timbers and wood-based products.

### RESULTS

For dealing with the subject, two Central European wood species of economic importance – common oak (*Quercus robur*) and sessile oak (*Quercus petraea*) as well as Norway spruce (*Picea abies*) – were chosen as model species. The silver fir (*Abies alba*) was involved to a lesser extent. Trunk and branch material as well as green material of oak and spruce were obtained from five locations within Germany, whereby samples were taken from five to ten trees each. Investigations on obtaining analysable genomic DNA were carried out using a pre-

Modellbaumarten ausgewählt. In geringem Umfang wurde die Weißtanne (*Abies alba*) bearbeitet. Stamm- oder Astmaterial sowie Grünmaterial von Eiche und Fichte wurden von fünf Standorten innerhalb Deutschlands beschafft, wobei jeweils fünf bis zehn Bäume beprobt wurden.

Untersuchungen zur Gewinnung analysierbarer genomischer DNA erfolgten mit einer zuvor optimierten und validierten Extraktionsmethode an Holz (Stammabschnitte, entrindete Äste mit einem Mindestdurchmesser von 15 mm) und Grünmaterial bzw. nicht verholzten Zellen (Nadeln, Laub, Knospen, Bast und Kambium). Die Abb. 1 und 2 zeigen die Gewinnung von Probenmaterial aus Stammscheiben für die DNA-Analysen. Die höchsten DNA-Gehalte traten erwar-

viously optimised and validated extraction method on wood (log sections, debarked branches of a minimum diameter of 15 mm) and green material or unlignified cells (needles, leaves, buds, bast and cambium). Fig. 1 and 2 show the sampling of the material from trunk disks for the DNA analyses.

The highest DNA contents appeared, as expected, in the green material, whereas DNA of the nucleus (nDNA), of the chloroplasts or of the proplastids (cDNA) as well as of the mitochondria (mDNA) has been detected in all samples. Also, nDNA and cDNA was isolated from lignified cells of the selected species, but no mDNA. In all cases, a decrease of the DNA content within a trunk or branch cross-section from the outside to the inside could be observed.



Abb. 1: Gewinnung von Bohrspänen aus einer Stammscheibe von Weißtanne

Fig. 1: Obtaining drilling chips from a trunk section of silver fir

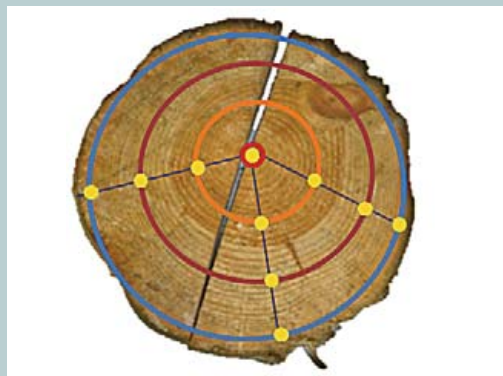


Abb. 2: Schematische Darstellung der Probenahme an einer Stammscheibe am Beispiel von Kiefer: rot – Mark, orange – mittlerer Kernbereich, braun – mittlerer Splintbereich, blau – äußerer Splintbereich

Fig. 2: Scheme of sampling from a trunk section by example of pine: red - pith, orange – central heartwood area, brown – central sapwood area, blue – outer sapwood area

tungsgemäß im Grünmaterial auf, wobei in allen Proben DNA des Kerns (nDNA), der Chloroplasten bzw. der Proplastiden (cDNA) sowie der Mitochondrien (mDNA) nachgewiesen wurde. Aus verholzten Zellen der ausgewählten Baumarten wurde hingegen nDNA und cDNA, jedoch keine mDNA isoliert. In allen Fällen war eine Abnahme des DNA-Gehaltes innerhalb eines Stamm- bzw. Astquerschnittes von außen nach innen nachweisbar.

Untersuchungen zum Ausmaß der Degradation genomischer DNA erfolgten auf Basis eines speziellen RAPD-PCR-Verfahrens sowie weiterer, auf die verschiedenen Genome gerichteter PCR-Verfahren. Im Ergebnis war die DNA-Fragmentierung in Eichenkernholz mit erzielbaren Amplikongrößen bis maximal 200 Basenpaaren (bp) höher als im Reifholz von Fichte und Tanne mit Amplikonen bis 550 bp. In frischem Splintholz von Eiche und Fichte sowie entrindetem Astholz waren bis zu 1.100 bp große DNA-Fragmente nachweisbar. Weiterhin wurde der Einfluss verschiedener künstlicher Alterungsbeanspruchungen auf die DNA-Quantität und -qualität von frisch geschlagenem Fichtenholz untersucht. Ein signifikanter Abfall der Menge an analysierbarer DNA (um ca. 15 %) wurde nach einjähriger Lufttrocknung bei Raumtemperatur festgestellt, nicht jedoch nach 24-stündiger Trocknung bei 60 °C.

Für eine DNA-Barcode-basierte Differenzierung der Baumarten war die rDNA-ITS-Region des Kerngenoms prinzipiell geeignet. Eine Bewertung des Differenzierungspotenzials bei Fichte erfordert jedoch Untersuchungen an weiteren Individuen der Gemeinen Fichte sowie anderer Fichtenarten, da bisher unzureichende Referenzdaten in der

The extent of the degradation of genomic DNA was investigated on the basis of a special RAPD-PCR method and further PCR approaches targeting various genomes. As a result, the DNA fragmentation was higher in oak heartwood with obtainable amplicon sizes of up to 200 base pairs (bp) than in spruce and fir ripewood with amplicons of up to 550 bp. In fresh oak and spruce sapwood as well as in debarked branch wood, DNA fragments of up to 1,100 bp could be amplified. Moreover, the impact of various artificial wood ageing procedures on DNA quantity and quality was investigated. A significant decrease in the amount of analysable DNA in spruce (by approx. 15 %) was identified after one year of air-drying at room temperature, but not after 24 hours of drying at 60 °C.

The rDNA-ITS region of the nuclear genome was generally suited for a barcode-based DNA differentiation of wood species. However, an evaluation of the differentiation potentials in spruce requires to investigate further individual samples of common spruce as well as of other species of spruce, as the reference data in the NCBI gene bank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) so far are insufficient.

For amplifying and sequencing the ITS barcode region (ITS1, 5.8s, ITS2), a universal primer combination was identified which, together with the selected wood species as well as with pine (*Pinus sylvestris*) and beech (*Fagus sylvatica*), generates reproducible products. In addition to that, a PCR method to amplify the approx. 200-bp-sized ITS2 fragment was established. This, however, reduces the sequence information that can be used for the analysis, but increases the

NCBI-Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) hinterlegt sind.

Für die Amplifikation und Sequenzierung der ITS-Barcoderegion (ITS1, 5.8s, ITS2) wurde eine universelle Primerkombination ermittelt, die mit den ausgewählten Baumarten sowie Kiefer (*Pinus sylvestris*) und Buche (*Fagus sylvatica*) reproduzierbare Produkte generiert. Zusätzlich wurde eine PCR-Methode für die Amplifikation des ca. 200 bp großen ITS2-Fragmentes etabliert. Dies reduziert zwar die für die Analyse nutzbaren Sequenzinformationen, erhöht jedoch den Amplifikationserfolg bei degradiertem DNA. Die vereinzelt auftretende Mitamplifikation von Pilzen wurde durch Etablierung einer optimierten Touch-Down-PCR deutlich reduziert.

Eine sichere Abgrenzung auf Art-Niveau erfordert die Berücksichtigung weiterer Marker. Deshalb wurden ausgewählte Abschnitte der cDNA in die Untersuchungen einbezogen. Unter vier phylogenetisch und experimentell analysierten Markern wurde die nicht kodierende trnH-psbA-Spacer-Region der Chloroplasten-DNA (ca. 300 bp) als prinzipiell geeignet identifiziert. Durch eine kombinierte Analyse mit beiden Markern der ITS- und der trnH-psbA-Region, konnte eine Differenzierung der Eichen auf Art-niveau erzielt werden. Eine leistungsfähige Methode für die Unterscheidung von Fichten- und Tannen-Arten soll in zukünftigen Forschungsarbeiten entwickelt werden.

Die bisher verfolgten methodischen Ansätze sind wenig geeignet, um Hybriden oder Individuen zu identifizieren. Deshalb ist geplant, die weitere Forschung auf Strategien des Next Generation sequencing (NGS) zu fokussieren.

amplification success in degraded DNA. The co-amplification of fungi was clearly reduced by implementing an optimised Touch-Down-PCR.

A reliable differentiation at species level requires to consider further markers. Therefore, selected cDNA sections were included in the investigations. From four phylogenetically and experimentally analysed markers, the non-coding trnH-psbA spacer region of the chloroplast DNA (approx. 300 bp) was identified as generally suitable. By a combined analysis applying both markers of the ITS and the trnH-psbA regions, a differentiation of the oak samples could be achieved at species level. An efficient method for differentiating spruce and fir species shall be developed in future research projects.

The described approaches are little suited to identify hybrids or individuals as necessary for origin analysis. Therefore, it is envisaged to focus further research on strategies of next generation sequencing (NGS).