

# Molekularbiologische Charakterisierung von Bienen-DNA in Honig

S. Länder, P. Behrmann, G. Beckh und C. Lüllmann

Quality Services International GmbH, Flughafendamm 9a,  
D-28199 Bremen

## Zusammenfassung

Honig enthält Bienen-DNA, die während der Verarbeitung des gesammelten Nektars durch Bienen in ihm angereichert wird. Die DNA lässt sich aus dem Honig isolieren und mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf bestimmte Sequenzen hin überprüfen. So können Aussagen über die zoologische Herkunft eines Honigs getroffen werden, wie etwa zur An- oder Abwesenheit von DNA bestimmter Bienenarten asiatischer Herkunft.

## Summary

Honey contains bee-specific DNA that is accumulated while the bees process the nectar in the hive. It is possible to isolate this DNA from the honey and to analyse it for specific sequences. By the help of Polymerase Chain Reaction (PCR) a honey sample can be characterised towards its zoological origin, i.e. for example determination of the presence or absence of DNA of Asian bee species.

**Keywords:** Honig, Bienen, DNS, Polymerase-Kettenreaktion, PCR / Honey, bees, DNA, Polymerase Chain Reaction, PCR

## Einleitung

Neben der in Europa, Afrika und seit der Kolonisierung durch Europäer auch in Amerika heimischen und weltwirtschaftlich wichtigsten Honigbienenart *Apis mellifera* (Westliche Honigbiene) leben insbesondere in Asien weitere Bienenarten, die seit Alters her vom Menschen für die Herstellung von Honig genutzt werden. Zu diesen Arten zählen u.a. *Apis cerana* (Östliche Honigbiene) und *Apis dorsata* (Riesen-Honigbiene<sup>1</sup>, Abb. 1). Herkömmliche in der Honiganalytik angewandte chemisch-physikalische Methoden erlaubten bislang ebenso wenig wie sensorische Verfahren eine Unterscheidung von Honigen nach ihrem zoologischen Ursprung. Nachfolgend wird kurz eine PCR-gestützte Methode aufgezeigt, die eine Charakterisierung von Honigen hinsichtlich der Bienenart, von der sie stammen, ermöglicht. Hierbei wird die bieneneigene DNA, die beim Umverteilen und bei der Weitergabe des gesammelten Nektars an andere Stockbienen in den eingedickten Nektar gelangt<sup>2</sup>), analysiert. Bestimmte Bereiche der mitochondrialen DNA der Bienenarten *Apis mellifera*, *Apis cerana* und *Apis dorsata* unterscheiden sich in der Abfolge ihrer Basenbausteine<sup>3,4</sup>. Teilsequenzen dieser Bereiche werden mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt und ermöglichen eine artgenaue Bestimmung.

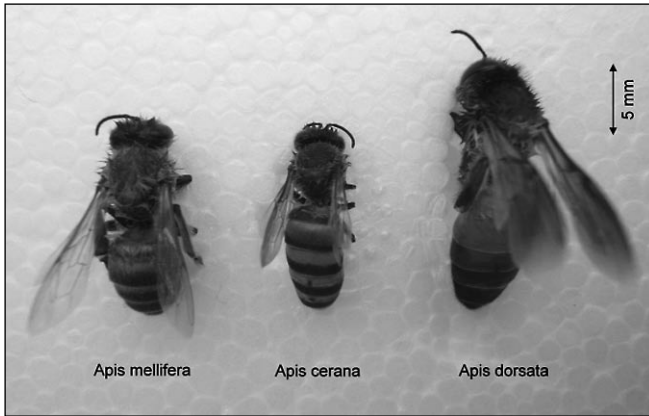
## Material und Methoden

Es wurden Honigproben diverser Provenienzen in Europa und Asien untersucht, die sowohl nur von einer bestimmten Bienenart, als auch von unterschiedlichen Bienenarten stammen (Mischhonige). 20 g von jeder Honigprobe wurden mit destilliertem Wasser verdünnt und zentrifugiert. Anhand des erhaltenen Pellets wurden mehrere DNA-Extraktionsverfahren auf ihre Eignung hin überprüft<sup>5-9</sup>. Als am einfachsten und schnellsten zu handhaben erwies sich ein kommerziell erhältliches DNA-Extraktionskit, mit dem alle Honig-Sedimente aufgearbeitet wurden. Die daraus resultierenden DNA-Lösungen wurden nachfolgend in der PCR eingesetzt (ausgeführt mit einem Eppendorf Mastercycler). Hierbei kamen zwei unterschiedliche Primer-Paare zur Anwendung: Einerseits E2/H2<sup>10,11</sup> zur Vervielfältigung einer Sequenz der mitochondrialen Untereinheit II des Cytochrom-Oxydase-Gens (CO-II) der Art *Apis mellifera* (Thermocyclerprogramm: 1 x 94°C [2 min, Initiale Denaturierung]; je 40 Zyklen 92°C [30 s], 48°C [45 s], 61°C [45 s]; 1 x 72°C [2 min, Finale Elongation]).

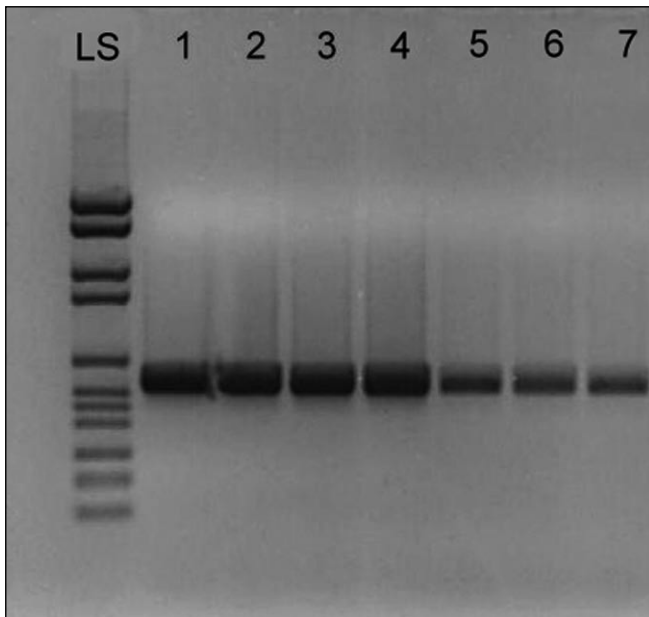
Zum Zweiten wurde das Primerpaar cb2a/b für die Amplifizierung eines Abschnitts des Cytochrom-b-Gens der Arten *Apis cerana* und *Apis dorsata* angewandt (Thermocyclerprogramm: 1 x 94°C [2 min, Initiale Denaturierung]; je 40 Zyklen 92°C [30 s], 61°C [45 s], 70°C [20 s]; 1 x 72°C [2 min, Finale Elongation]). cb2a/b wurde mit Hilfe eines Sequenzabgleichs der Gendatenbank des National Centre for Biotechnology (NCBI) generiert. Die mit Hilfe der o.g. Primer erzeugten PCR-Produkte wurden in einem Agarose-Gel aufgetrennt und mittels UV-Licht sichtbar gemacht. Die erwartete Länge des mit E2/H2 amplifizierten PCR-Produktes betrug 570 bp (Basenpaare). Das mit cb2a/b generierte PCR-Produkt hatte eine Länge von 200 bp. Eine abschließende Restriktionsfragmentanalyse diente der Verifizierung positiver Ergebnisse.

## Ergebnisse und Diskussion

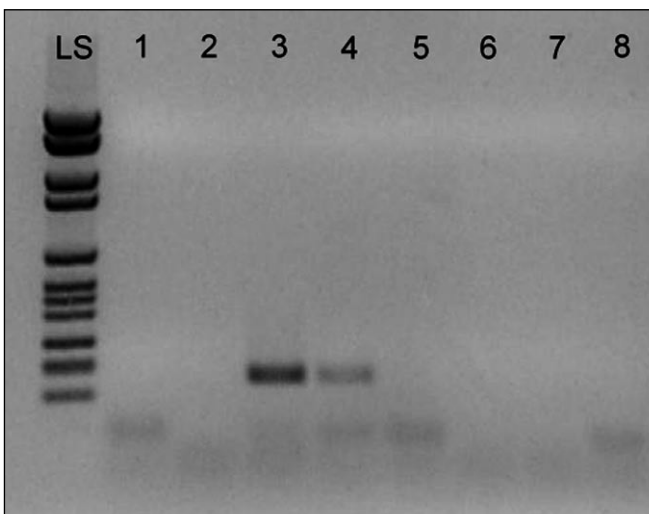
DNA der Bienenart *Apis mellifera* konnte in sämtlichen Honigen, die DNA der Art enthielten, mit Hilfe des Primersystems E2/H2 nachgewiesen werden (s. Abb. 2). Dies gelang sowohl bei solchen Honigen, die nur von *Apis mellifera* stammen, als auch bei solchen, die zusätzlich Honig der zwei anderen Arten *Apis cerana* und *Apis dorsata* enthielten. Dabei gelang der Nachweis von *Apis mellifera*-DNA



**Abb. 1** Arbeiterinnen der Honigbienenarten *Apis mellifera*, *Apis cerana*- und *Apis dorsata* im Größenvergleich



**Abb. 2** Nachweis von *Apis mellifera*-DNA in Honig mit dem Primerpaar E2/H2 (1: Referenz-DNA; 2-4: *Apis mellifera*-Honige; Reihe 5-7: Mischhonige aus *Apis mellifera*-, *Apis cerana*- und *A. dorsata*-Honig; 5: Anteil *A. mellifera*-Honig an Gesamthonig 50%, 6 : 10%, 7 : 5%; LS: Längenstandard)



**Abb. 3** Nachweis von Nicht-*Apis mellifera*-DNA in einem indischen Honig mittels Primerpaar cb2a/b (Reihe 3 und 4); In Reihe 1-2 und 5-8: DNA aus Honigen, die nur von *Apis mellifera* stammen

bis zu einem Anteil von 1% *Apis mellifera*-Honig an der Gesamthonigmenge.

Für den Nachweis von DNA der Arten *Apis cerana* und *Apis dorsata* wurde in einer zweiten PCR das Primerpaar cb2a/b eingesetzt. Dieses lieferte positive Ergebnisse bei den Honigen, die nur von *Apis cerana* oder *Apis dorsata* stammen, sowie auch bei Mischhonigen bis zu einem Anteil von 1% *A. cerana*- oder *A. dorsata*-Honigzumischungen an der Gesamthonigmenge (Abb. 3). *Apis mellifera*-DNA wurde mit dem Primerpaar cb2a/b nicht amplifiziert. Die mit dem spezifischen Primerpaar cb2a/b generierten PCR-Produkte unterschieden sich nicht in ihrer Bandengröße im Agarosegel. Um die erhaltenen DNA-Banden einer Bienenart zuzuordnen zu können, wurden daher die PCR-Produkte mit dem Restriktionsenzym AluI nachfolgend geschnitten; anhand der unterschiedlichen Größe der DNA-Fragmente konnten diese eindeutig entweder *Apis cerana* oder *A. dorsata* zugeordnet werden.

Mit dem beschriebenen Verfahren lässt sich somit eine Honigprobe zoologisch drei verschiedenen Honigbienenarten zuordnen. Die Kombination zweier PCR-Systeme ermöglicht die qualitative Charakterisierung eines Honigs bezüglich des Vorhandenseins von DNA der Bienenarten *Apis mellifera*, *Apis cerana* und *Apis dorsata*.

#### Literatur

- 1) Smith, D. R.: Mitochondrial DNA and Honey Bee Biogeography; In: Smith, D. R. (Ed.): Diversity in the genus *Apis*. S. 131-177. Westview Press, Boulder (1991).
- 2) Lüllmann, C. und H. Horn: Das Große Honigbuch. 2. Aufl., S. 44. Kosmos, Stuttgart (2002).
- 3) Loxdale, H. D. and G. Lushai: Molecular markers in entomology. Bull Entomol Res **88**, 577-600 (1998).
- 4) Moritz, R. F. A.: Molecular Biology of the Honeybee. Adv Insect Physiol **25**, 169-78 (1994)
- 5) Beye, M. and U. Raeder: Rapid DNA Preparation from Bees and %GC Fractionation. BioTechniques **14** (3), 372-374 (1993)
- 6) Henry, J. M., A. K. Raina et al.: Isolation of High-Molecular-Weight DNA from Insects. Anal Biochem **185**, 147-150 (1990).
- 7) Möller, E. M. et al.: A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. Nucl Acid Res **20** (22), 6115-6116 (1992).
- 8) Reineke, A. et al.: Preparation and purification of DNA from insects for AFLP analysis. Insect Mol Biol **7** (1), 95-99 (1998).
- 9) Vigilant, L.: An Evaluation of Techniques for the Extraction and Amplification of DNA from Naturally Shed Hairs. Biol Chem **380**, 1329-1331 (1999).
- 10) Garnery, L., D. Vautrin, J. M. Cornuet and M. Solignac: Phylogenetic relationships in the genus *Apis* inferred from mitochondrial DNA sequence data. Apidologie **22**, 87-92 (1991).
- 11) Garnery L., M. Solignac, G. Celebrano and J. M. Cornuet: A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. Experientia **49**, 1016-1021 (1993).

## Impressum

### Deutsche Lebensmittel-Rundschau

#### Herausgeber

Dr. Gabriele Lauser  
(E-Mail: lauser.dlr@t-online.de)  
Prof. Dr. Ingrid Steiner  
(E-Mail: isteiner@mail.zserv.tuwien.ac.at)

#### Redaktion

Verantwortlich: Dr. Gabriele Lauser

Deutsches und Europäisches Recht,  
DIN- und ISO-Normen:  
Dr. Hans Ackermann, Postfach 10 10 61,  
D-70191 Stuttgart

Rechtsprechung, Rechtsprechung in Kürze:  
Rechtsanwalt Prof. Dr. Alfred Hagen Meyer,  
Kanzlei meyer // meisterernst, Sophienstr. 5,  
D-80333 München, E-Mail: meyer@meyer-  
meisterernst.de

**Anzeigenleitung:** Kornelia Wind, Tel.: (0711)  
2582-245, Fax: -252  
Objektbetreuung: Karin Hoffmann, Tel.: (0711)  
2582-242, Fax: -294

#### Verlag

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH,  
Birkenwaldstraße 44, Postfach 10 10 61,  
D-70191 Stuttgart, D-70009 Stuttgart,  
Telefon: (07 11) 25 82-0,  
Telefax: (07 11) 25 82-290

Einbanddecken für diese Zeitschrift können bestellt  
werden bei Buchbinderei Schuster, Tel. 0711/60 54 18,  
E-Mail: Mail@Buchbinderei-Schuster.de

Die DEUTSCHE LEBENSMITTEL-RUNDSCHAU er-  
scheint monatlich. Preis im Abonnement jährlich  
€ 312,00; Einzelheft € 35,00 (alle Preise zuzü-  
glich Versandkosten). Bestellungen nehmen jede  
Buchhandlung im In- und Ausland sowie der Ver-  
lag entgegen. Ein Abonnement gilt, falls nicht be-  
fristet bestellt, zur Fortsetzung bis auf Widerruf.  
Kündigungen des Abonnements können nur zum  
Ablauf eines Jahres erfolgen und müssen bis zum  
15. November des laufenden Jahres beim Verlag  
eingegangen sein.

z. Z. gültiger Anzeigentarif Nr. 56 vom 1.10. 2006.

Mit Namen gezeichnete Artikel geben nicht unbe-  
dingt die Meinung der Redaktion wieder. Der Ver-  
lag haftet nicht für unverlangt eingereichte Manuskripte. Der Redaktion angebotene wissenschaftliche Beiträge dürfen nicht vorher oder gleichzeitig in anderen Zeitschriften veröffentlicht werden. Eine kurze Zusammenfassung in deutscher und englischer Sprache ist beizufügen. Mit der Annahme zur Veröffentlichung überträgt der Autor dem Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für die Zeit bis zum Ablauf des Urheberrechts. Eingeschlossen sind insbesondere auch das Recht zur Herstellung elektronischer Versionen und zur Einspeicherung in Datenbanken sowie das Recht zu deren Vervielfältigung und Verbreitung online und offline ohne zusätzliche Vergütung.

Alle in dieser Zeitschrift veröffentlichten Beiträge sind urheberrechtlich geschützt. Kein Teil dieser Zeitschrift darf außerhalb der engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes ohne schriftliche Genehmigung des Verlags in irgendeiner Form reproduziert oder in eine von Maschinen, insbesondere von Datenverarbeitungsanlagen verwendbare Sprache übertragen werden.

Ein Markenzeichen kann warenzeichenrechtlich geschützt sein, auch wenn ein Hinweis auf etwa bestehende Schutzrechte fehlt.

Die DEUTSCHE LEBENSMITTEL-RUNDSCHAU wird regelmäßig referiert in „Chemical Abstracts“,

„Chemical Engineering and Biotechnology Abstracts“, „Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences“, „Science Citation Index“.

#### Hinweise für Autoren

Die Deutsche Lebensmittel-Rundschau veröffentlicht Beiträge aus allen Gebieten der Lebensmittelchemie, der Lebensmitteltechnologie, des Lebensmittelrechts und der Ernährungswissenschaften.

Grundsätzlich werden Originalarbeiten nur im Erstabdruck veröffentlicht, d.h. die Arbeit darf in keiner anderen Zeitschrift erschienen und auch nicht gleichzeitig bei einer weiteren Zeitschrift zur Veröffentlichung eingereicht worden sein. Tabellen und Abbildungen bitte nicht in den Text einfügen, sondern als Anlage bzw. bei Grafiken als eigene Dateien (tif-, eps-Format u.a.) beilegen. Bei Literaturzitierten bitte folgende Zitierweise anwenden, z.B. Maier, H., F. Schultz und M. Weiß: Deut. Lebensmittel-Rundsch. 88, 122–30 (1992).

Bei einem Beitrag in deutscher oder englischer Sprache bitten wir die Zusammenfassung, den Titel und Keywords in Deutsch und Englisch abzufassen.

Manuskripte können auch per E-Mail oder Diskette (Word 6.0/Word 97-Dokument) eingereicht werden.

Als Unkostenbeitrag werden je Druckseite € 25,60 gewährt. Bitte geben Sie beim Zurücksenden der Korrekturfahnen eine private Adresse sowie Ihr privates Bankkonto an.

Kontaktadresse: Dr. Gabriele Lauser, Deutsche Lebensmittel-Rundschau, Postfach 101061, D-70009 Stuttgart oder lauser.dlr@t-online.de

Druck und Bindung: Röhm TYPOfactory Marketing GmbH, Dieselstraße 28–30, 70469 Stuttgart.

© 2006 Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart. Printed in Germany ISSN 0012-0413