

# Molekularbiologische Charakterisierung von Bienen-DNA in Honig

Stefan Länder, Peter Behrmann, Gudrun Beckh, Cord Lüllmann



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

info@qsi-q3.de

## 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 bieneigene 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]</sup> [4]. 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 Europas und Asiens untersucht, die sowohl nur von einer bestimmten Bienenart, als auch von unterschiedlichen Bienenarten stammen (Mischhonige).

20 g von jeder Honigprobe wurde mit destilliertem Wasser verdünnt und zentrifugiert. Anhand des erhaltenen Pellets wurden mehrere DNA-Extraktionsverfahren auf ihre Eignung hin überprüft<sup>[5]</sup>, [6], [7], [8], [9]. 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]</sup>, [11] zur Vervielfältigung einer Sequenz der mitochondrialen Untereinheit II des Cytochrom-Oxydase Gens (CO-II) der Art *Apis mellifera*. Zum Zweiten wurde das Primerpaar cb2a/b für die Amplifizierung eines Abschnitts des Cytochrom-b-Gens der Arten *Apis cerana* und *Apis dorsata* angewandt. cb2a/b wurde mit Hilfe eines Sequenzabgleichs der Gen-Datenbank des National Centre for Biotechnology (NCBI) generiert.

Die mit Hilfe der Primer erzeugten PCR-Produkte wurden weiterhin 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 [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 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% *Apis cerana*- oder *Apis dorsata*-Honigzumischung 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. Um die erhaltenen DNA-Banden einer Bienenart zuordnen 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.

## 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 like *Apis cerana* and *Apis dorsata*.



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

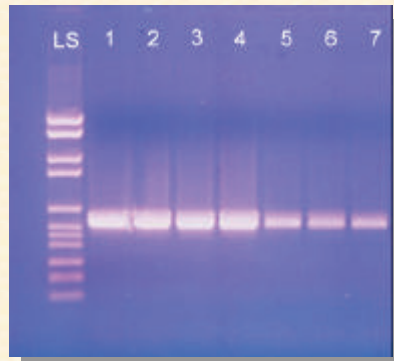


Abb. 2: Beispiel für Nachweis von *Apis mellifera*-DNA in Honig mit dem Primerpaar E2/H2 (1: Referenz-DNA; 2-4: *Apis mellifera*-Honige; Reihe 5: Mischhonige aus *Apis mellifera*, *Apis cerana*- und *A. dorsata*-Honig; 6: Anteil *A. mellifera*-Honig an Gesamthonig 50%, 7: 10%, 8: 5%; LS: Längenstandard)

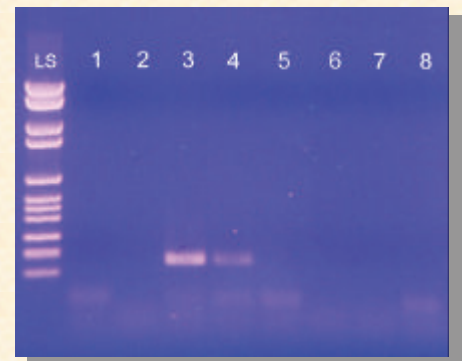


Abb. 3: Beispiel für Nachweis von Nicht-*Apis mellifera*-DNA in einem indischen Honig mittels Primerpaar cb2a/b (Reihe 3 und 4); Reihe 1, 2 und 5 bis 8: DNA aus Honigen, die nur von *Apis mellifera* stammen; LS: Längenstandard

## Literatur

- [1] Smith, D. R.: Mitochondrial DNA and Honey Bee Biogeography; In: D.R. Smith (Ed.), Diversity in the genus *Apis*. Westview Press, Boulder: S. 131-177 (1991).
- [2] Lüllmann, C. und H. Horn: Das Große Honigbuch, 2. Ausg., S. 44 (2002).
- [3] Loxdale H.D. & Lushai G.: Molecular markers in entomology. Bulletin of Entomological Research 88: 577 - 600 (1998).
- [4] Moritz, R. F. A.: Molecular Biology of the Honeybee. Advances in Insect Physiology 25: 169-78 (1994)
- [5] Beye, M. & U. Raeder: Rapid DNA Preparation from Bees and %GC Fractionation. BioTechniques 14 (3) : 372-374 (1993)
- [6] Henry, J. M., Raina, A. K. et al.: Isolation of High-Molecular-Weight DNA from Insects. Analyt. Biochemistry 185: 147-150 (1990)
- [7] Möller, E. M. et al. (1992) : A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. Nucleic Acids Research 20(22): 6115-6116

- [8] Reineke, A. et al. (1998): Preparation and purification of DNA from insects for AFLP analysis. Insect Mol. Biology 7(1): 95-99
- [9] Vigilant, L. (1999) : An Evaluation of Techniques for the Extraction and Amplification of DNA from Naturally Shed Hairs. Biol. Chem. 380: 1329-1331
- [10] Garnery L., Vautrin D., Cornuet J. M., Solignac M. (1991) : Phylogenetic relationships in the genus *Apis* inferred from mitochondrial DNA sequence data. Apidologie 22: 87-92
- [11] Garnery L., Solignac M., Celebrano G., Cornuet J. M. (1993): A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. Experientia 49: 1016-1021

## Schlussfolgerungen

1. Aus Honig lässt sich Bienen-DNA extrahieren
2. Sequenzen bestimmter Bereiche der DNA lassen sich mittels PCR vervielfältigen
3. Honig kann hinsichtlich des Vorhandenseins von DNA der Bienenarten *Apis mellifera*, *Apis cerana* und *Apis dorsata* charakterisiert werden