

Differenzierung von *Theobroma cacao* und *Theobroma grandiflorum* mittels PCR

I. Haase und M. Fischer

Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Universität Hamburg

Korrespondenz an: Dr. Ilka Haase, Prof. Dr. Markus Fischer, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Universität Hamburg, Grindelallee 117, D-20146 Hamburg, Tel.: 040 428384357; Fax: 040 428384342; E-mail: ilka.haase@chemie.uni-hamburg.de, markus.fischer@chemie.uni-hamburg.de

Eingegangen: 20. Juli 2007; angenommen: 8. August 2007

Key Words: Kakao, *Theobroma cacao*, *Theobroma grandiflorum*, artenspezifische PCR, PCR-RFLP.

Abkürzungen: DNA = Desoxyribonukleinsäure, dNTP = Desoxynukleosidtriphosphat, PCR = Polymerase-Kettenreaktion, RFLP = Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus, DTT = Dithiothreitol.

Zusammenfassung: Die Gattung *Theobroma* umfasst etwa 20 Arten, von denen insbesondere die Art *Theobroma cacao* L. mit den beiden Hauptsorten (Varietäten) „Criollo“ und „Forastero“ wirtschaftliche Bedeutung hat. Bislang erfolgte die Unterscheidung der Kakaosorten und -arten nur morphologisch und, dadurch bedingt, nur in einem sehr frühen Verarbeitungsstadium, d.h. eine Reinheitskontrolle ist zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr möglich. Andererseits erfolgt die Herstellung von Kakaomasse heute zunehmend im Erzeugerland, Schokolade oder Kakaohalberzeugnisse werden vom verarbeitenden Unternehmen zugekauft. Eine genaue und reproduzierbare Spezifikationskontrolle ist aus den skizzierten Gründen bislang nicht möglich. Im Gegensatz zur alten Kakaoverordnung liefert die neue Kakaoverordnung vom 15. Dezember 2003 keine Definition des Kakao mehr. Die Kakao- und Schokoladenindustrie geht aber nach wie vor davon aus, dass nur die Kakaoart *T. cacao* bei der Herstellung von Schokolade zur Anwendung kommt (allgemeine Verkehrsauffassung in Anlehnung an die alte Kakaoverordnung). Die Kakaoart *T. grandiflorum* (Cupuassu) gewinnt auf dem südamerikanischen Markt immer mehr an Bedeutung. Beispielsweise werden die Bohnen vermehrt zu Schokolade-artigen Produkten (Cupu-lade) verarbeitet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine PCR- und eine PCR-RFLP Methode entwickelt, die eine Detektion beider *Theobroma*-Arten in Kakao und Schokoladenprodukten erlauben.

Abstract: The genus *Theobroma* comprises about 20 species. The highest economic attention is paid to the cultivars (varieties) “Criollo” and “Forastero” of the species *Theobroma cacao* L.,

which are used for chocolate production. Up to now, the differentiation of cocoa species and cultivars is performed morphologically. Hence, a purity control in late processing steps of chocolate production is not possible. However, most of the cocoa mass production takes place in the countries of cocoa origin and is then bought as semi-finished products by the chocolate industry. Species identification is not possible at this stage due to the manufacturing process. In the former “Kakaoverordnung” a definition of the cocoa species (*T. cacao*) used for chocolate production was given. The current “Kakaoverordnung” (passed in December 2003) lacks such a definition. Nevertheless, it is general acceptance in the chocolate industry to exclusively use the species *T. cacao* for chocolate production. On the other hand, the species *T. grandiflorum* (Cupuassu) is getting more and more important on the South American market where beans are used for the creation of chocolate-like products e.g. Cupu-late. This work describes the development of a PCR and a PCR-RFLP method for the detection of cocoa species in chocolate products.

1. Einleitung

Die Herstellung und das Inverkehrbringen von Lebensmitteln unterliegen in Deutschland rechtlichen Vorschriften. Diese sollen nicht nur die Gesundheit der Bevölkerung schützen, sondern auch zugleich den Wettbewerb auf den Lebensmittelmärkten (Qualitätsanforderungen) und den Täuschungsschutz regeln. Das Lebensmittelrecht besteht aus zahlreichen Gesetzen und Verordnungen. Neben dem Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFBG) gibt es weitere Vorschriften, die grundsätzlich bei der Herstellung und dem Inverkehrbringen von Lebensmitteln zu beachten sind, wie die Lebensmittelhygieneverordnung (LMHV) und die Lebensmittelkennzeichnungsverordnung (LMKV). Für die Herstellung und das Inverkehrbringen von Kakao und Schokoladenprodukten sind zudem die Vorgaben der Kakaoverordnung (2003) einzuhalten.

Die deutsche Schokoladenindustrie produzierte 2006 in ca. 120 mittelständischen Unternehmen 925 kt Kakaoverzeugnisse im Wert von etwa 4 Milliarden € (BDSI, 2007). Zur Herstellung von Kakaomasse werden die Samen (Kakaobohnen) des Kakaobaumes (*T. cacao*) zunächst direkt auf der Plantage einer Fermentation unterworfen. Bei dem Gärprozess dient das anhaftende Fruchtfleisch als Nährboden für Mikroorganismen. Anschließend erfolgen eine Röstung der Bohnen und das sog. „Brechen“. Hierbei werden die Kakaobohnen zerbrochen und die Samenschale und das Keimwürzelchen vom „Kakaokern“ (Speicherkeimblätter) entfernt. Durch Mahlen entsteht die Kakaomasse, aus der, je nach Weiterverarbeitung, Kakaopulver oder Schokoladenprodukte hergestellt werden. Nach allgemeiner Verkehrsauffassung (in Anlehnung an die alte Kakaoverordnung von 1975) wird für die Herstellung von Kakao und Schokoladenprodukten nur Bohnen der Kakaoart *T. cacao* eingesetzt; die Sorte „Criollo“ für die Herstellung von Edelkakao, „Forastero“ für die Produktion von Konsumkakao. Die Kakaoart *T. grandiflorum* (Cupuassu) gewinnt jedoch auf dem südamerikanischen Markt immer mehr an Bedeutung: Aus der Pulpe werden Marmeladen-artige Produkte hergestellt, aber auch die Bohnen werden immer häufiger zu Schokolade-artigen Produkten (Cupu-lade) verarbeitet. Eine Unterscheidung der beiden Arten erfolgt bisher nur morphologisch und dadurch bedingt, in einem sehr frühen Verarbeitungsstadium (Silva et al., 2004), d.h. eine Artendifferenzierung ist im verarbeiteten Produkt auf dieser Basis nicht mehr möglich. Andererseits erfolgt die Kakaomassenherstellung zunehmend im Erzeugerland. Schokoladenhersteller greifen auf diese im Ausland hergestellte Kakaomasse zurück und müssen sich auf die angegebenen Spezifikationen verlassen können.

Publikationen, die sich mit der Unterscheidung der *Theobroma*-Arten befassen, zielen auf eine botanische Charakterisierung der Gattung *Theobroma* ab. Mit Hilfe von verschiedenen PCR Methoden, wie RAPD (random amplified polymorphic DNA), PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism), AFLP (amplified fragment length polymorphism) und SSRPCR (simple sequence repeats), angewendet auf isolierte DNA aus frischem Blattmaterial, wurde die phylogenetische Verwandtschaft der Arten innerhalb der Gattung *Theobroma* untersucht (Lerceteau et al., 1997a und 1997b; Lanaud et al., 1999; Saunders et al., 2001; Jones et al., 2002; Alves et al., 2003; Pugh et al., 2004; Charters and Wilkinson, 2000). Die lebensmittelanalytische Fragestellung der Artendifferenzierung in verarbeiteten Produkten wurde bislang noch nicht bearbeitet. Im Rahmen dieser Arbeit werden eine PCR mit artenspezifischen Oligonukleotiden und eine PCR-RFLP Methode vorgestellt, die eine Differenzierung von *T. cacao* und *T. grandiflorum* in Kakao und Schokoladenprodukten ermöglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Probenmaterial

Umfangreiches Probenmaterial wurde von Herrn Prof. Lieberei (Universität Hamburg, Deutschland), Herrn Prof. Matissek

(LCI, Köln, Deutschland) und Herrn Dr. Noske (August Storck KG, Halle, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die *Taq* Polymerase stammte von Eurogentec (Seraign, Belgien), die dNTPs von Bioline (Luckenwalde, Deutschland), Oligonukleotide wurden von Metabion International AG (Martinsried, Deutschland) synthetisiert. Das Stool-Kit stammte von Qiagen (Hilden, Deutschland), die SYBR-Green I-Lösung (Konzentrat in DMSO) von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland). Die Restriktionsenzyme *ClaI* und *MscI* (inkl. Restriktionspuffer) wurden von New England Biolabs GmbH (Frankfurt, Deutschland) bezogen.

2.2 DNA-Isolierung

Etwa 300 mg Probenmaterial wurden in einem 2 ml-Eppendorf-Gefäß mit 2 Stahlkugeln (\varnothing 3 mm) versetzt und mit Hilfe einer Kugelmühle (Tissue Lyser, Qiagen, Hilden, Deutschland) für 10 min bei 30 Hz mechanisch zerkleinert. Anschließend wurde die zerkleinerte Probe mit 1.4 ml Aufschlusspuffer (Puffer ASL) des Stool-Kits (Qiagen) versetzt, für weitere 10 min mit Hilfe der Kugelmühle bei 30 Hz mechanisch zerkleinert und die Aufarbeitung analog zu den Hersteller-Angaben durchgeführt. Die Elution der DNA von den Kartuschen erfolgte mit $2 \times 50 \mu\text{l}$ sterilem Wasser (Zentrifugation bei 1 min, 13000 rpm, Raumtemperatur). Die Lagerung von isolierter DNA erfolgte bei -20°C .

2.3 Fluorimetrische Bestimmung der DNA-Konzentration mit Hilfe von SYBR-Green I

Für die Konzentrationsbestimmung wurde zunächst eine Kalibriergerade mit einem Plasmid ($10 \text{ ng}/\mu\text{l}$) aufgestellt. Die Konzentration des Plasmides wurde photometrisch bestimmt (Sambrook, 1989). Das SYBR-Green I-Konzentrat wurde 1:6250 in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, 2 mM EDTA, pH 8.2) verdünnt. $1 \mu\text{l}$, $2 \mu\text{l}$, $5 \mu\text{l}$ und $10 \mu\text{l}$ des Plasmids wurden mit der entsprechenden Menge SYBR-Green-I-Lösung auf $100 \mu\text{l}$ komplettiert (in $100 \mu\text{l}$ LightCycler-Kapillaren, Roche, Mannheim, Deutschland). Von den DNA-Lösungen der Proben wurden jeweils $2 \mu\text{l}$ und $5 \mu\text{l}$ mit der SYBR-Green-I-Lösung versetzt (Endvolumen $100 \mu\text{l}$). Als Nullwert dienten $100 \mu\text{l}$ SYBR-Green-I-Lösung. Nach Zentrifugation erfolgte die Quantifizierung im LightCycler 2.0 und die anschließende Auswertung mit Hilfe der LightCycler 2.0 Software („Nucleic Acid Quantification“).

2.4 Oligonukleotide

Verwendete Oligonukleotide sind in Tab. 1 aufgelistet.

2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Ein $20 \mu\text{l}$ -PCR-Ansatz bestand aus 10-fach Pufferkonzentrat (Endkonzentration: 75 mM Tris/HCl, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% (w/v) Tween 20, 1.5 mM MgCl_2 , pH 9.0, Finnzymes, Espoo, Finnland), dNTP's (je $16 \mu\text{M}$), Forward-Oligonukleotid ($1 \mu\text{M}$), Reverse-Oligonukleotid ($1 \mu\text{M}$), Template ($\sim 1 \text{ ng}/\mu\text{l}$), $1 \mu\text{l}$ *Taq*-Polymerase (0.75 U) und wurde mit sterilem Wasser komplettiert. Die PCR wurde mit einem initialen Denaturierungsschritt bei 94°C (5 min) gestartet, dem sich 40 Zyklen (30 s , 94°C ; 30 s , 50°C ; 30 s , 72°C) und ein 5 minütiger Elongationsschritt bei 72°C anschlossen. Abschließend wurde auf 4°C gekühlt.

Name	Sequenz	Quelle
mTcCIR2-Vo	5'-CAG GGA GCT GTG TTA TTG GTC A-3'	Lanaud et al., 1999
mTcCIR2-Hi	5'-AGT TAT TGT CGG CAA GGA GGA T-3'	Lanaud et al., 1999
mTcCIR8-Vo	5'-CTA GTT TCC CAT TTA CCA-3'	Lanaud et al., 1999
mTcCIR8-Hi	5'-TCC TCA GCA TTT TCT TTC-3'	Lanaud et al., 1999
mTcCIR58-Vo	5'-TTT TTG GTG ATG GAA CTA T-3'	AJ271957, Alves et al., 2003
mTcCIR58-Hi	5'-TGG TTA AGC AAC ACT AAA CT-3'	AJ271957, Alves et al., 2003
TC-Ti-Fw	5'-ATG CCG ATA GCA AAG ATG AT-3'	diese Arbeit
TC-Ti-Rev	5'-CTG AAT TTG TAA CCG AGT A-3'	diese Arbeit
TG-Ti-Fw	5'-TAC GTT TTG TCA GAC TTA TG-3'	diese Arbeit
TG-Ti-Rev	5'-AAC CTA AAT TTG TAA ACG TTT C-3'	diese Arbeit
Vic-Fw	5'-AAG AGG GCA ACT TCA AGA TC-3'	diese Arbeit
Vic-Rev	5'-CGC TGT ACA TTA TAG GAC TC-3'	diese Arbeit

Tab. 1 Verwendete Oligonukleotide.

2.6 PCR-RFLP

Der PCR Schritt der PCR-RFLP wurde analog zu oben durchgeführt. Anschließend wurden 17 µl PCR Ansatz mit 1 µl Restriktionsenzym (*Cla*I, 5000 U/ml bzw. *Msc*I, 3000 U/ml) und 2 µl 10-fach Pufferkonzentrat (20 mM Tris/Acetate, 50 mM Kaliumacetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1 mM DTT, pH 7.9) versetzt und 2 h bei 37 °C inkubiert.

2.7 Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Probenpuffer (50% (v/v) Glycerin, 0.25% (w/v) Bromphenolblau, 0.25% (w/v) Xylencyanol, in TAE-Puffer versetzt und die Gelelektrophorese auf 3% Agarosegelen in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetate, 2 mM EDTA, pH 8.2) durchgeführt (120 V, 45 min). Die Detektion der DNA-Banden erfolgte, nach 15 minütiger Inkubation in Ethidiumbromidlösung (0.1%) unter Lichtausschluss, durch Betrachtung im UV-Licht bei 323 nm.

2.8 DNA-Sequenzvergleiche

Sequenzvergleiche wurden mit Hilfe des Programms „ClustalW Multiple Sequence Alignment (for DNA or proteins)“ durchgeführt.

2.9 Reinigung von PCR-Fragmenten

Die Reinigung von DNA erfolgte nach Agarosegelelektrophorese mit dem Gel Extraction Kit von Peqlab (Biotech GmbH, Erlangen, Deutschland). Die Aufarbeitung erfolgte analog der Herstellerangaben.

2.10 Ligation und Transformation

Ligation und Transformation wurden mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Für die Ligation wurden folgende Komponenten in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert: 2 µl des gereinigten PCR-Produktes, 1 µl Salz-Lösung (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl₂), 2 µl steriles Wasser und 1 µl pCR-4-TOPO-Vektor (10 ng/µl in 50% Glycerin, 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.1% Triton X-100, 100 µg/ml BSA, 30 µM Phenolrot). Nach vorsichtigem Mischen wurde der Reaktionsansatz 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach auf Eis zwischengelagert. Für die Transformation wurden 2 µl des Ligationsansatzes in ein Reaktionsgefäß mit 50 µl One Shot Mach1-TM-T1R chemisch kompeten-

ter *E. coli*-Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und 20 min bei 4 °C inkubiert. Nach 30 s bei 42 °C wurde wieder auf 4 °C abgekühlt und nach 2 min 250 µl S.O.C.-Medium (2% Trypton, 0.5% Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) zugegeben. Nach 1 h bei 37 °C wurden abschließend je 50 µl bzw. 100 µl des Ansatzes auf Selektivagarplatten (Vollmedium nach Luria-Bertani (Miller, 1972) mit 20 g Agar pro Liter) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Für die Fermentation wurden 50 ml des Vollmediums verwendet und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte in 10 ml Fraktionen mittels Zentrifugation (4000 rpm, 4 °C, 10 min).

2.11 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem Plasmidisolierungskit QIAprep Spin Miniprep von Qiagen (Hilden, Deutschland) analog den Angaben des Herstellers.

2.12 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte aus den isolierten Plasmiden. Die Sequenzanalyse erfolgte durch den *Custom-DNA-Sequencing-Service* von GATC (Konstanz, Deutschland).

3. Ergebnisse

Bei der Entwicklung einer PCR-Methode zur Unterscheidung der Kakaoarten *T. cacao* und *T. grandiflorum* wurde zunächst die Eignung literaturbekannterer Oligonukleotidpaare untersucht. Ziel war es, zwei spezifische Oligonukleotidpaare zu finden, die entweder bei *T. cacao* (Oligonukleotidpaar 1) oder bei *T. grandiflorum* (Oligonukleotidpaar 2) ein Amplifikat liefern. Eine Publikation von Lanaud et al. (1999) lieferte erste mögliche Oligonukleotidkombinationen. Vier der konstruierten Oligonukleotidkombinationen (mTcCIR6, mTcCIR8, mTcCIR16 und mTcCIR24) ergaben ein Amplifikat bei *T. cacao*, aber nicht bei *T. grandiflorum*, während der Einsatz von Oligonukleotidpaar mTcCIR2 nur zu einem Amplifikat bei *T. grandiflorum* nicht, aber bei *T. cacao* führte. Entsprechende Analysen erfolgten jedoch mit frischer, nicht-prozessierter DNA aus Kakaoblättern. Daher mussten die Oligonukleotide erst auf ihre Eignung bei PCR-Versuchen mit isolierter DNA aus fer-

Proben ein eindeutiges Amplifikat nur bei Einsatz des entsprechenden artenspezifischen Oligonukleotidpaares zu erkennen ist (232 bp bei Oligonukleotidpaar TC-Ti-Fw/TC-Ti-Rev bzw. 368 bp bei Oligonukleotidpaar TG-Ti-Fw/TG-Ti-Rev), während die Mischungen bei beiden Oligonukleotidpaaren ein Amplifikat zeigen. Des Weiteren wurde die Möglichkeit überprüft, beide Arten in einer Eintopfreaktion zu bestimmen, um in der Routineanalytik die Anzahl der zu pipettierenden PCR Ansätze zu verringern. Es zeigte sich bei PCR-Ansätzen, bei denen jeweils beide artenspezifischen Oligonukleotidpaare (d. h. 4 Oligonukleotide pro Ansatz) zugegeben wurden, keine Beeinträchtigung der Spezifität.

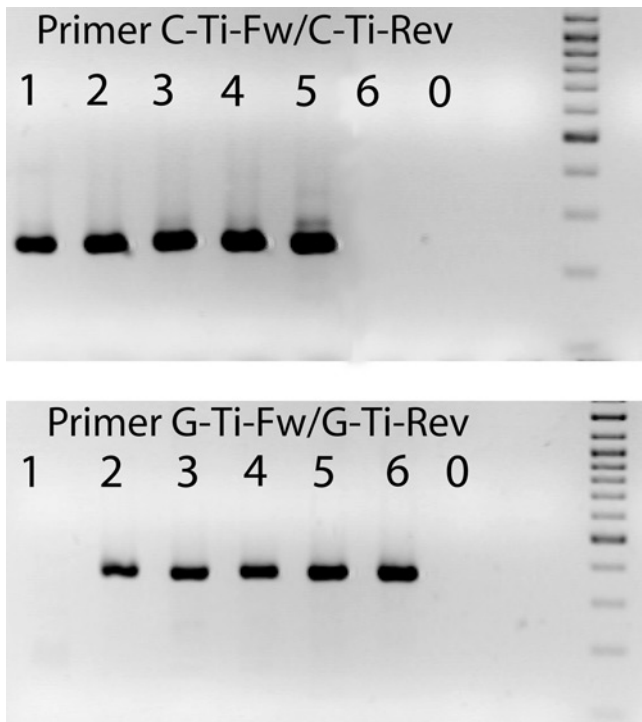


Abb. 3 Agarosegel einer PCR mit den artenspezifischen Primerpaaren TC-Ti-Fw/TC-Ti-Rev oder TG-Ti-Fw/TG-Ti-Rev und isolierter DNA aus Kakao-Kernmischungen beider Arten als Template. **1**, 100% *T. cacao*-Kakaokerne (Ghana); **2 und 3**, 75% *T. grandiflorum*- und 25% *T. cacao*-Kakaokerne; **4**, 50% *T. grandiflorum*- und 50% *T. cacao*-Kakaokerne; **5**, 25% *T. grandiflorum*- und 75% *T. cacao*-Kakaokerne; **6**, 100% *T. grandiflorum*-Kakaokerne (Brasilien); **7**, Blindwert.

Als Alternative wurde eine PCR-RFLP-Methode zur Differenzierung von *T. cacao* und *T. grandiflorum* entwickelt. Die PCR-RFLP-Analyse ermöglicht eine Differenzierung von sehr homologen Sequenzen. Zunächst wird eine PCR mit Universalprimern durchgeführt und anschließend das Amplifikat mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease behandelt. Bereits geringfügige Unterschiede (Einzelbasenaustausche, single nucleotide polymorphism, SNP) zwischen den Sequenzen können hierbei Erkennungssequenzen erzeugen bzw. zerstören.

Abb. 4 zeigt einen Ausschnitt der stark konservierten Vicilingensequenzen der beiden Kakaoarten *T. cacao* und

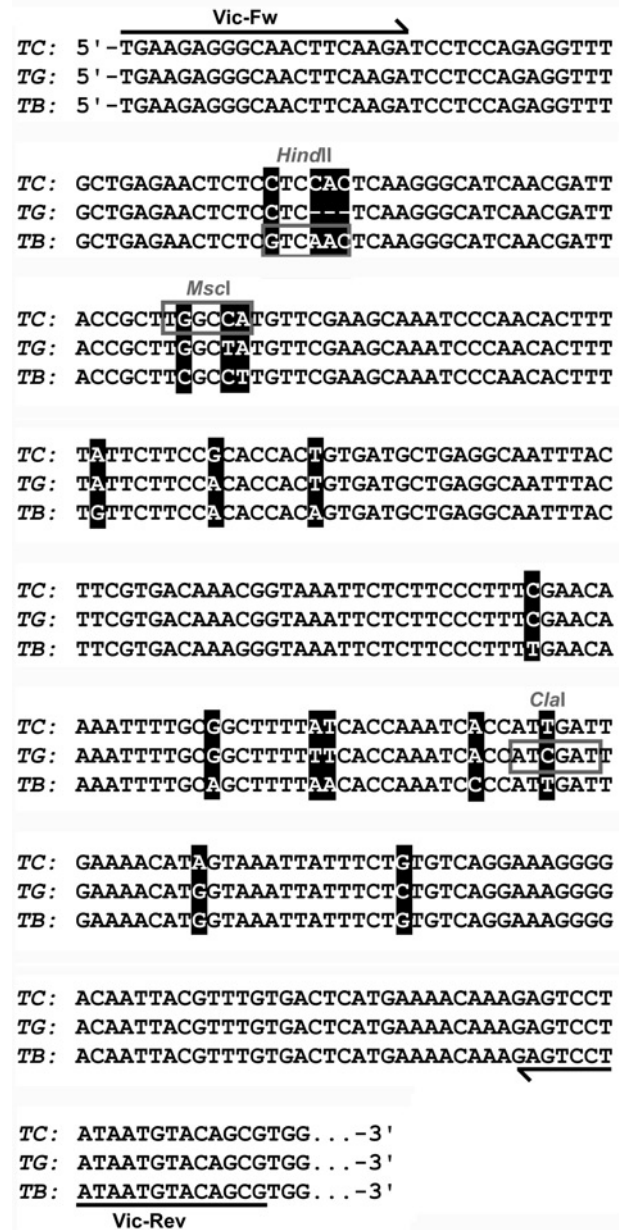


Abb. 4 Vergleich der Anfangssequenz der Vicilingene von *T. cacao* (TC), *T. grandiflorum* (TG) und *T. bicolor* (TB). TC, Ausschnitt aus AF113046.1/AF113047.1; TG, Ausschnitt aus AF113042.1/AF113043.1; TB, Ausschnitt aus AF113038.1/AF113039.1. **Pfeile**: Universalprimer (Vic-Fw; Vic-Rev); **graue Boxen**: Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *MscI*, *ClaI* bzw. *HindIII*. Sequenzunterschiede sind schwarz unterlegt.

T. grandiflorum (Whitlock and Baum, 1999). Für dieses Gen wurden Oligonukleotide (Vic-Fw und Vic-Rev, Pfeile) entwickelt, die auf einem homologen Sequenzabschnitt liegen und somit im Rahmen einer PCR ein Fragment bei beiden Kakaoarten erzeugen. Unterschiede in den Sequenzen der beiden Kakaoarten sind schwarz unterlegt. Unterschiede in den Sequenzen, die Auswirkungen auf Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen haben, sind mit einem Kasten markiert.

Die PCR-RFLP Methode wurde zunächst an isolierter DNA aus Kakaokernen von *T. cacao* und *T. grandiflorum* getestet. Bei beiden Arten konnte aus der DNA mittels PCR mit den Universalprimern ein 303 bp großes Fragment amplifiziert werden. Der anschließende Restriktionsverdau der Amplifikate erfolgt beim Einsatz von *MscI* (→ 225 bp+78 bp) nur bei den Amplifikaten aus *T. cacao* DNA, nicht jedoch bei Amplifikaten aus *T. grandiflorum* DNA. Umgekehrt verdaut *ClaI* (→ 209 bp+94 bp) nur das Amplifikat aus *T. grandiflorum* DNA und nicht das Amplifikat aus DNA von *T. cacao*.

Im nächsten Schritt wurden zerkleinerte Kakaokerne der beiden Kakaoarten in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt und die DNA isoliert. Abb. 5 zeigt das Ergebnis des Restriktionsverdaus nach PCR. Auch in den Mischungen konnten beide Arten eindeutig identifiziert werden.

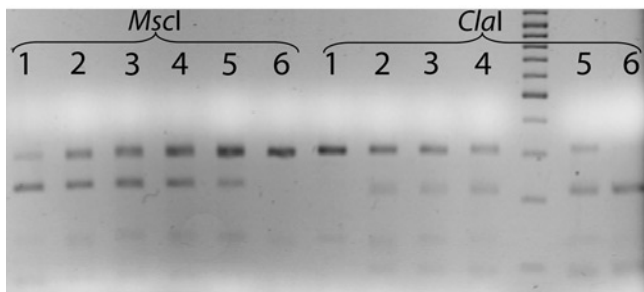


Abb. 5 Agarosegel von PCR-RFLP-Untersuchungen mit isolierter DNA aus Kakaokernmischungen beider Arten. **1**, 100% *T. cacao*-Kakaokerne (Ghana); **2 und 3**, 75% *T. grandiflorum*- und 25% *T. cacao*-Kakaokerne; **4**, 50% *T. grandiflorum*- und 50% *T. cacao*-Kakaokerne **5**, 25% *T. grandiflorum*- und 75% *T. cacao*-Kakaokerne **6**, 100% *T. grandiflorum*-Kakaokerne (Brasilien).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit werden zwei PCR Methoden (artenspezifische PCR und PCR-RFLP) beschrieben, die es ermöglichen, die Kakaoarten *T. cacao* und *T. grandiflorum* in Kakao- und Schokoladenprodukten zu identifizieren. Für die artenspezifische PCR konnten anhand der Trypsininhibitor-Sequenzen ein für *T. cacao* spezifisches und ein für *T. grandiflorum* spezifisches Oligonukleotidpaar konstruiert werden. Eine Spezifität konnte bei allen untersuchten Kakaoproben nachgewiesen werden. Die zweite Methode, basierend auf den Vicilingensequenzen verschiedener Kakaoarten ermöglicht, nach artenspezifischer PCR, ebenfalls eine Differenzierung von *T. cacao* und *T. grandiflorum* durch das Vorhandensein von artenspezifischen Restriktionsschnittstellen im PCR-Amplifikat. Die Spezifität dieser Methode konnte an Kakaobohnenmischungen beider Arten gezeigt werden. Bei Proben mit unterschiedlichem Mischungsverhältnis ist sogar eine semiquantitative Abschätzung des Mischungsverhältnisses anhand der Bandenintensitäten möglich (Abb. 5). Wie der Sequenzvergleich in Abb. 4 zeigt, ist es möglich, die entwickelte PCR-RFLP auf die Kakaoart *T. bicolor* auszuweiten. Auch in dieser Sequenz ist eine artenspezifische Schnittstelle (*HindII*, hellgraue Box, Abb. 4) im amplifizierten Sequenzabschnitt

vorhanden. Proben der Art *T. bicolor* wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Für eine endgültige Validierung beider Methoden sind noch eine größere Anzahl an Proben von Kakaobohnen beider Arten sowie besonders von Schokolade und Cupu-lade notwendig. Beide Methoden sind bisher qualitativer (semiquantitativer) Art. Es besteht jedoch die Möglichkeit, beide Methoden zu quantitativen PCR-Methoden zu erweitern. Für eine artenspezifische quantitative real time PCR wären neben den artenspezifischen Primern zusätzlich (artenspezifische) fluoreszenzmarkierte Hybridisierungs sonden notwendig. Eine Quantifizierung des Mischungsverhältnisses ist auch nach der PCR-RFLP-Methode mit Hilfe einer Kapillarelektrophorese möglich.

5. Acknowledgements

Das Projekt wird vom Bundesministerium für Wirtschaft und Arbeit/Aif und dem Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) in Zusammenarbeit mit dem Bundesverband der Deutschen Süßwarenindustrie e.V. (BDSI) gefördert (Projekt Aif-FV-14387N). Wir danken Frau Gabriele Ostermeier für die Hilfe bei der Probenaufarbeitung.

6. Literatur

- Alves, R. M., Artero, A. S., Sebbenn, A. M. und Figueira, A. (2003) Mating system in a natural population of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum. by microsatellite markers. *Genet Mol Biol* 26: 373–379.
- BDSI (2007) Bundesverband der deutschen Süßwarenindustrie. Zahlen und Fakten., <http://www.bdsi.de>.
- Charters, Y. M. and Wilkinson, M. J. (2000) The use of self-pollinated progenies as "in-groups" for the genetic characterization of cocoa germplasm. *Theor Appl Genet* 100: 160–166.
- Jones, P. G., Allaway, D., Gilmour, D. M., Harris, C., Rankin, D., Retzel, E. R. und Jones, C. A. (2002) Gene discovery and microarray analysis of cacao (*Theobroma cacao* L.) varieties. *Planta* 216: 255–264.
- Pugh, T., Fouet, O., Risterucci, A. M., Brottier, P., Abouladze, M., Deletrez, C., Courtrois, B., Clement, D., Larmande, P., N'Goran, J. A. K. und Lanaud, C. (2004) A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1151–1161.
- Kakaoverordnung (1975) Verordnung über Kakao und Kakaoverzeugnisse (Kakaoverordnung) vom 30. Juni 1975 (BGBl. I S. 1760) zuletzt geändert durch Art. 14 VO zur Neuordnung lebensmittelrechtlicher Vorschriften über Zusatzstoffe v. 19. 01. 1998 (BGBl. I S 230, 296).
- Kakaoverordnung (2003) Verordnung über Kakao und Schokoladenerzeugnisse (Kakaoverordnung) vom 15. Dezember 2003 (BGBl. 2003 Teil I Nr. 63 S. 2738–2743, 23.12.2003).
- Lanaud, C, Risterucci, A. M., Pieretti, I., Falque, M., Bouet, A. und Lagoda, P. J. (1999) Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. *Mol Ecology* 8: 2141–2143.
- Lerceteau, E., Flipo, S., Quiroz, J., Soria, J., Pétiard, V. und Cruzillat, D. (1997a) Genetic differentiation among Ecuadorian *Theobroma cacao* L. accessions using DNA and morphological analyses. *Eu-phytica* 95: 77–87.
- Lerceteau, E., Robert, T., Petiard, V. und Cruzillat, D. (1997b) Eva-

- uation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accessions using RAPD and RFLP markers. *Theor Appl Genet* 95: 10–19.
- Miller, J. H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Habor Laboratory Press, Cold Spring Habor, New York.
- Saunders, J. A., Hemeida, A. A. und Mischke, S. (2001) USDA DNA fingerprinting programme for identification of *Theobroma cacao* accessions. In: F. Bekele et al. (ed.) *Proc. Int. Workshop on new technologies and cocoa breeding*. Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia. 16–17 Oct. 2000. INGENIC Press, London. p. 108–114.
- Sousa Silva, C. R. und Figueira, A. (2005) Phylogenetic analysis of *Theobroma* (*Sterculiaceae*) based on Kunitz-like trypsin inhibitor sequences. *Plant Syst Evol* 250: 93–104.
- Sousa Silva, C. R., Venturieri, G. A. und Figueira, A. (2004) Description of Amazonian *Theobroma* L. collections, species identification and characterization of interspecific hybrids. *Acta Bot Bras* 18: 333–340.
- Whitlock, B. A. und Baum, D. A. (1999) Phylogenetic relationships of *Theobroma* and *Herrania* (*Sterculiaceae*) based on sequences of the nuclear gene Vicilin. *Syst. Bot.* 24: 128–138.

To access this journal online:
<http://www.birkhauser.ch/JVL>
