



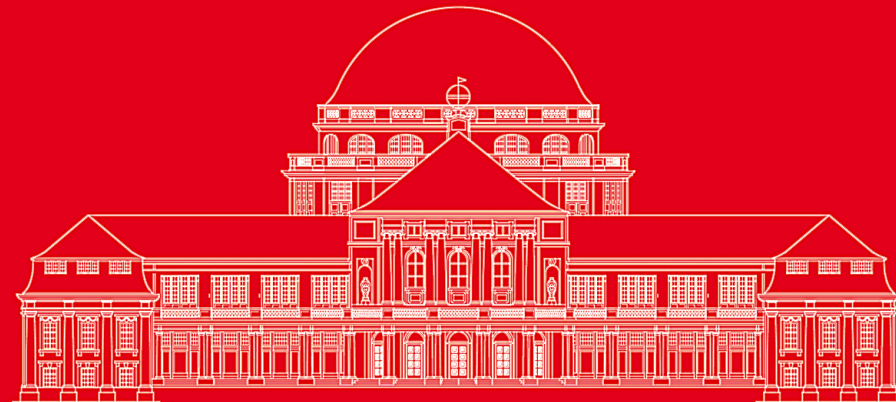
Universität Hamburg

DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG



# FOOD PROFILING: Authentizitätsüberprüfung von Edelkakao basierend auf Sequenzunterschieden im Chloroplastengenom

Luise Herrmann  
HAMBURG SCHOOL OF FOOD SCIENCE  
Institut für Lebensmittelchemie  
Universität Hamburg

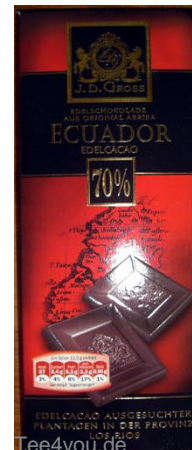


## AiF/ FEI 16796 N

### Evaluierung chemisch-analytischer und molekularbiologischer Methoden zur Differenzierung von hochwertigem Arriba-Edelkakao und Konsumkakao (CCN 51)

Interesse der deutschen Kakaoindustrie:

- Garantie der Qualität edler Kakaoprodukte, deren Beliebtheit nach wie vor steigt
- Möglichkeit der Vermischung von edlem mit kostengünstigerem Kakao in Ecuador (gewollt und unbeabsichtigt)



## CCN 51 und Arriba

### CCN 51



- Ertragsreicher
- Schwächeres Aroma
- Resistenter, robuster

### Arriba

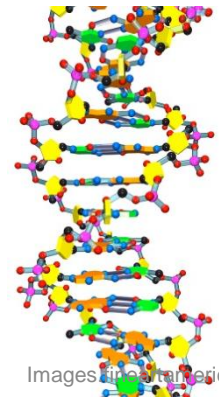


- Geringerer Ertrag
- Aromaintensiv
- Anfälliger gegenüber Krankheiten

Bohnen und Früchte sind nur bis zur Verarbeitung voneinander zu unterscheiden

# DNA

- Geeigneter Biomarker: stabil, konstant
- In einer pflanzlichen Zelle: u.a. nukleäre und plastidäre DNA



Images.com/ma/magica.com

## cpGenom:

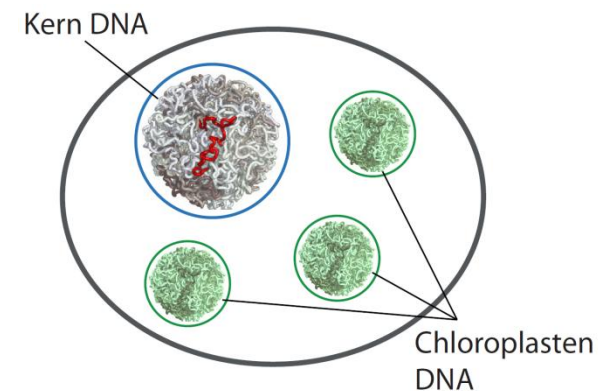
- Höhere Variabilität
- Hohe Kopienzahl pro Zelle
  - ein Kern und etwa 3-4 Chloroplasten

330 000 000 bp

Diploid

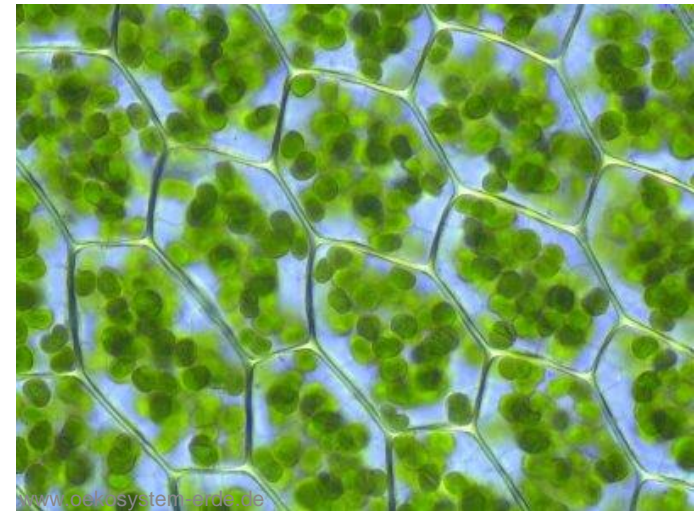
160 000 bp

70 Kopien



## Sequenzierung des cpGenoms

- Grundlage für die Recherche nach Sequenzunterschieden
- Üblicherweise Isolierung des cpGenoms von der nukleären DNA
- KANE et al., 2012
  - Sequenzierung des cpGenoms in Anwesenheit der nukleären DNA/ ohne vorherige Isolierung der Chloroplasten
  - Low-coverage whole genome shotgun sequence (next generation sequencing): Fokus auf die high copy Fraktion der Gesamt-DNA\*



\*Kane et al. , 2012, Am. J. Botany, Ultra-Barcoding in cacao (*Theobroma* ssp. *Malvaceae*) using whole chloroplast genomes and nuclear ribosomal DNA

# Sequenzierung des cpGenoms

- 4 CCN 51                      2 x Ecuador, 1 x Botanischer Garten Hamburg, 1 x ICGD (Reading UK)
- 3 Arriba                      EET 95, EET 103, EET 544, Ecuador
- 3 Eltern von CCN 51      IMC 67, ICS 97, Canelo, Ecuador

Alignment: pdf-Datei, 2000 Seiten

	(43603)	43603	43610	43620	43630	43640	43650	43660	43670	43688
HQ244500	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							
ICS-95	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							
Canelo	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							
IMC-57	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							
CCN51-C1	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							
CCN51-C2	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							
CCN51-BG1	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							
CCN51-RD	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							
EET-544	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							
EET103	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							
EET95	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							
JQ228384	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							
JQ228379	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							
JQ228380	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							
JQ228381	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							
JQ228382	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							
JQ228383	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							
JQ228385	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							
JQ228386	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							
JQ228387	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							
JQ228388	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							
JQ228389	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							
HQ336404	(43575)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAA	GCCGCAAAAGCAAAATGCACCAATTCGCGGTACAATAGAGTTGTAATTCACACTAGTTATT							

Etwa 30-50 SNPs (Single Nucleotid Polymorphism/Einzelbasenaustausche)  $\approx 0,03 \%$

# SNPs und PCR-RFLP

	(43603)	43603	43610	43620	43630	43640	43650	43660	43670	43688	Section 508
HQ244500	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						
ICS-95	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						
Canelo	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						
IMC-57	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						
CCN51-C1	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						
CCN51-C2	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						
CCN51-BG1	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						
CCN51-RD	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						
EET-544	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						
EET103	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						
EET95	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						
JQ228384	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						
JQ228379	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						
JQ228380	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						
JQ228381	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						
JQ228382	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						
JQ228383	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						
JQ228385	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						
JQ228386	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						
JQ228387	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						
JQ228388	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						
JQ228389	(43590)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						
HQ336404	(43575)	AATGGAACCAACCGGCAAAAAGC	ATTAA	TGCCGCAAAGACCAATGCACCAATTGCGGTACAATAGAGTTGTAATTC	ACTAGTTATT						

CCN 51  
Arriba

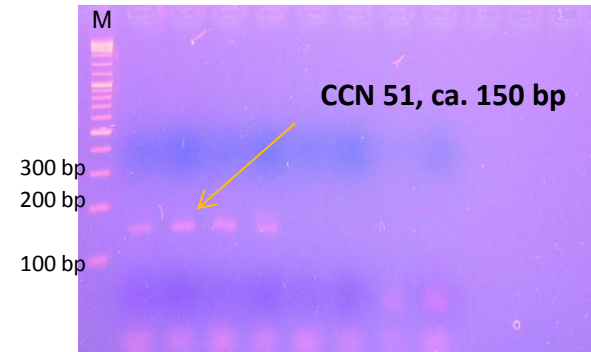
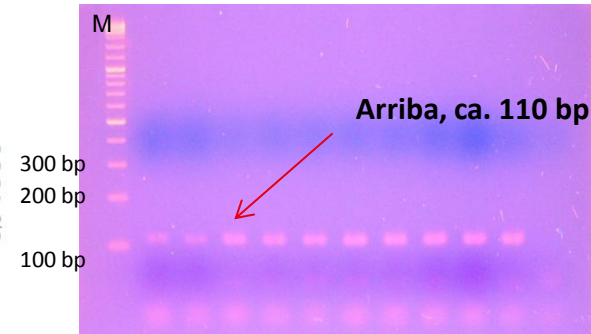
Erkennungssequenz Asel: ATTAAT





# (TAAAG)<sub>n</sub>-Repeat

A1, B1.	GCAGCACCTTAGGATGGCATAGCCTTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG	TTAAGGGCGAGGTTCAAACGAGGAA	80
A2, B1.	-----TTAGGATGGCATAGCCTTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG	TTAAGGGCGAGGTT-AAACGAGGAA	71
A3, B1.	-----TTAGGATGGCATAGCCTTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG	TTAAGGGCGAGGTTCAAACGAGGAA	72
A4, B1.	-----TTAGGATGGCATAGCCTTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG	TTAAGGGCGAGGTTCAAACGAGGAA	72
A5, B1.	-----CTTAGGATGGCATAGCCTTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG	TTAAGGGCGAGGTTCAAACGAGGAA	73
A6, B1.	-----TTAGGATGGCATAGCCTTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG	TTAAGGGCGAGGTTCAAACGAGGAA	72
A7, B1.	-----TAGGATGGCATAGCCTTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG	TTAAGGGCGAGGTTCAAACGAGGAA	71
A8, B1.	GCAGCACCTTAGGATGGCATAGCCTTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG	TTAAGGGCGAGGTTCAAACGAGGAA	80
C1, B1.	GCAGCACCTTAGGATGGCATAGCCTTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG	TTAAGGGCGAGGTTCAAACGAGGAA	120
C2, B1.	GCAGCACCTTAGGATGGCATAGCCTTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG	TTAAGGGCGAGGTTCAAACGAGGAA	120
C3, B1.	GCAGCACCTTAGGATGGCATAGCCTTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG	TTAAGGGCGAGGTTCAAACGAGGAA	120
C5, B1.	--GCACCTTAGGATGGCATAGCCTTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG	TTAAGGGCGAGGTTCAAACGAGGAA	117
C6, B1.	CAGCACCTTAGGATGGCATAGCCTTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG	TTAAGGGCGAGGTTCAAACGAGGAA	119
CCN51	GCAGCACCTTAGGATGGCATAGCCTTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG	TTAAGGGCGAGGTTCAAACGAGGAA	120



Bspw. Agarosegelelektrophorese

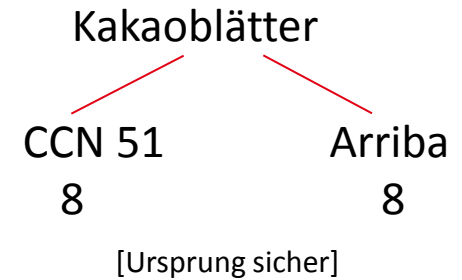
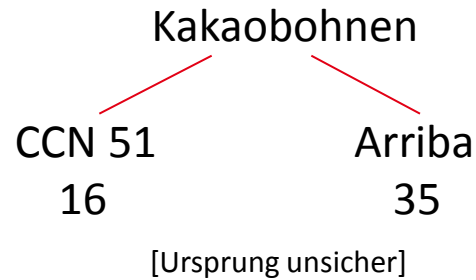
(TAAAG)<sub>n</sub>-Repeat in der Inverted Repeat Region des cpGenoms mit n = 14 (CCN 51) und n = 6 (Arriba)

Durchführung einer unspezifischen PCR:  
Amplifikate unterschiedlicher Größe (40 bp Unterschied)

# CCN 51 – ein Klon?



## Probenumfang

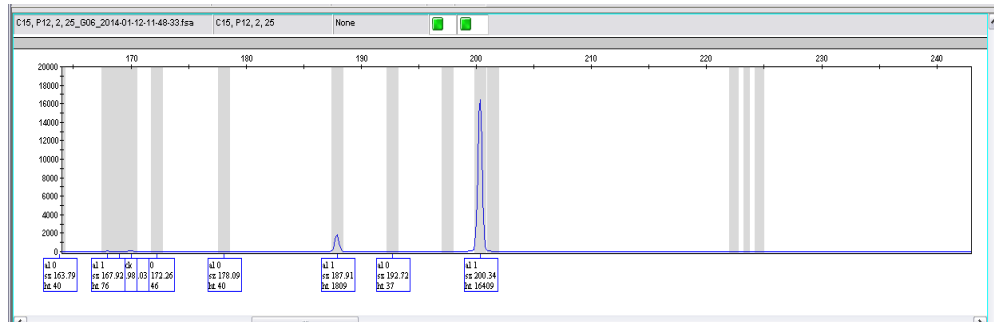
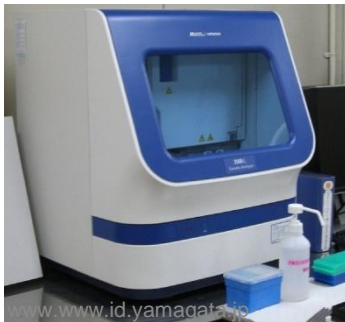


Einige wenige Ausnahmen

Überprüfung der CCN 51-Proben mittels Mikrosatellitenanalyse im nukleären Genom

# Mikrosatelliten

- Kurze, nichtcodierende, repetitive Sequenzen
- Anzahl der Wiederholungen bei unterschiedlichen Individuen variabel



Vorläufige Ergebnisse: Abweichungen im Mikrosatellitenmuster bei den CCN 51-Proben



Universität Hamburg

DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG



# Vielen Dank

N. Barz, M. Blauhut, T. Hünninger, Dr. F. Focke, Dr. I. Haase, Prof. Dr. M. Fischer  
J. Humin, Dr. M. Steinhaus, Prof. Dr. P. Schieberle



Stiftung der Deutschen Kakao- & Schokoladenwirtschaft

