

La biologia molecolare applicata alla Melissopalinologia



*Sviluppo di un metodo per la caratterizzazione
dei **mieli** valdostani attraverso il
riconoscimento dei **pollini***

*con **Polymerase Chain Reaction (PCR)***

C.GYPPAZ (1), M.F. BORNEY (1), P. BORRELLI (2), V. PORCARO (3).

1. LABORATORIO DI BIOLOGIA, ARPA DELLA VALLE D'AOSTA, SAINT-CHRISTOPHE, ITALY.
2. AMBULATORIO ALLERGOLOGIA E IMMUNOLOGIA CLINICA, OSPEDALE U. PARINI, AOSTA, ITALY.
3. AMBULATORIO TERRITORIALE DI ALLERGOLOGIA, AZIENDA USL VALLE D'AOSTA, AOSTA, ITALY.



CONGRESSO NAZIONALE AAITO - Alimentazione, ambiente e allergia: rischi e opportunità

22 Ottobre 2015 - BERGAMO



L'Allergia alimentare da ingestione di miele è un evento molto raro, tuttavia segnalato in letteratura*. Il miele può causare reazioni che variano da **sintomi orofaringei, fino all'anafilassi****. Può comparire in soggetti affetti da rinocongiuntivite allergica da pollini, in particolare di *Compositae**** e in allergici al veleno d'ape****.

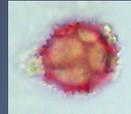
10 gr. di miele → dai 20 ai 100.000 granuli pollinici che conservano le loro proprietà allergeniche*****.

Obiettivo → messa a punto di una metodica biomolecolare, alternativa all'analisi melissopalnologica tradizionale, per l'identificazione dei pollini nei mieli.

- **Rododendro**



- **Tarassaco**



- **Tiglio**



- **Castagn**



Mieli Uniflorali

- **5 campioni** di miele per ogni tipologia
- **Due anni** di produzione (2011-2012)
- **Totale: 40 campioni**

* Vezir et al. 2014

**Popescu 2015

*** Popescu 2015; Fuiano et al. 2006; Lombardi et al. 1998

**** Helbling et al. 1992

***** Bauer et al. 1996



Lo studio condotto ha previsto:

- ricerca delle sequenze d'interesse;
- costruzione dei primers non pubblicati (*Taraxacum* e *Rhododendron*);
- estrazione del DNA;
- analisi in PCR end-point ;
- successiva rivelazione elettroforetica.

TARASSACO

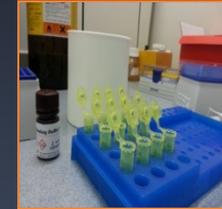
Seq. Scelta: Taraxacum officinale ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (trnL) gene, partial cds, chloroplast Contig: AR295562.1

ORIGIN

```

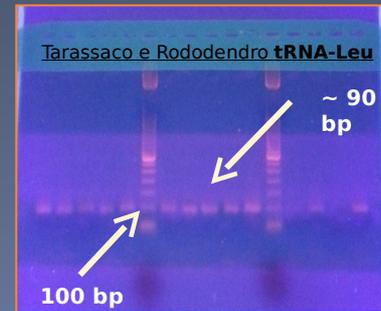
120 taagaagatg gttgattca aaagtggrrt taagaattat aaattgatt atratracc
121 tgcattgaa accgaaagaa caatattata aacacacata caatgaa acc ctcaactt
122 atttcttctt caaaagaaa gggccgcaat agtgcgaaa tctctctcag atg gaa
123 aaatgaaatg accgat tggc tttggpccg ttgcctgctt aaagagatc gcttca
124 ttggtctggt cctgagaaa aaagtcaatt tattgcttat gtagttacc caatgagaa
125 caaagccctg cgtgctcac gctcgaaa ttgcgaaic cctgctgca atgttaaac
126 ttccagatg aagcagaa gtaacacatg taccacatc caagagaaa tctgagct
127 caactcttg gattgctca caatgaa caa ctggpca caatgaaatg
128 aagcgttat gaaigtcttc gttggtcct ttatttacc aaagtgatt gaaagcama
129 cttccacac ttgagcgt gaaagaaa tctctctt ttgcaaaa caattttaa
130 accaaagct gaaaagcgt aaaaacaaag gcaattactg aatgctactc cgggtatg
131 ccaaaaag gaaagaaag ctatcttg caaaaatg gattctctca ttgaaaga
132 ttacaccata accgtgatt tcaactgaaa taactacttg gctcatatt gccagataa
133 ttactctt ctatgctac aatgacatc gctatgact gctgagaaa gaaagaaa
134 ttgatatac ttgctgatac taactaaag gttatgatac tctgagaaa atcaatata
135 ttgctctac gtaagatta aactcaaaa gaaagaaa acatcttca cctgctgaa
136 ttactactg gattttta ttgaaagaa tgaagctgc gattttat tcaacaaga
137 ttgactctc ttcaagata ttgctgctt agttctgca gattttca ttgctgata
138 gctgctctg accagattc ttgaaataa ttcaacta caatctctg gaaagattt
139 agggatctt aagaaa accgattc tgcctc gaaagaaa caagagatt
140 gttgaaagt cgaatgaa accgattc tgcctc gaaagaaa caagagatt
141 ttccacaaa tggpccg gaaagattc tgcctc gaaagaaa caagagatt
142 taattctga gttgagaa ctctgaa
  
```

- Tarassaco Forward 5'-AATGCACCCGGTGCCGTA-3'
- Tarassaco Reverse 5'-TTCACAAGCAGCAGCTAGTT-3'
- Rododendro Forward 5'-TAATATCCCACCCATCCA-3'
- Rododendro Reverse 5'-ATTCCAATAGGATACTCGTGT-3



Protocollo termico

Denaturazione: 95°C x 10min.	} x 35 cicli
Annealing: 95°C x 1min.	
T _a x 1min. 72°C x 1min.	
Estensione: 72°C x 10min.	
Totale circa 2.40 ore	





I risultati ottenuti hanno permesso di confermare l'applicabilità della metodica utilizzata su tutti i mieli testati e l'idoneità, per le sequenze specifiche disegnate durante lo studio, a rilevare il target.

E' stato altresì possibile verificare il funzionamento dei primers individuati in letteratura anche sui mieli valdostani.

Riscontrate criticità per il TIGLIO



In conclusione, la metodica proposta per l'estrazione del DNA dal miele è risultata adeguata. Inoltre, la **caratterizzazione molecolare** può essere utilizzata, in appoggio alla melissopalinoologia classica, come un complemento per la valorizzazione dei prodotti contenenti pollini, comportando possibili ricadute anche in ambito allergologico.

GRAZIE per l'ATTENZIONE!