

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****.

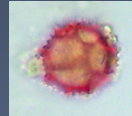
10 gr. di miele → dai 20 ai 100.000 granuli pollinici che conservano le loro proprietà allergeniche*****.

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 (lbc1) gene, partial cds, chloroplast Contig: AR295562.1

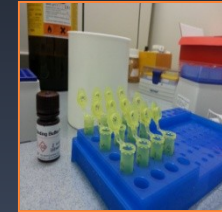
ORIGIN

```

120 taagaagatg gttgattca aaagtggrrt taagaattat aaattgatt atratracc
121 tgcattgaa accaagaaata caataataa abccccataa caaaataa acc ctcaactt
122 atttcttctt caaaaagaa gggccgcaat agtgcgcaaa tctctctcag atg
123 aaatgaaatg accgat tggc tttggpccg tttgcccgtt aaagagccat gctc
124 ttggtctggt cctgagaaq aaagtcaatt tattgcttat gtagtfac caatgaaq
125 caaagccctg cgtgctcac gctcgaaqa ttgpgaat accpttggc atgtlaaaq
126 ttctgaaga agtctgctca caaacagct tactccatc agagagaa tactgct
127 caactcttg gattgctca caaagaaata ctggpccg caaagaaatg
128 aagccttat gattgcttc gttggtcct ttatttact aaagtgaat gaaagcama
129 cttccacaa ttgagcgt gaaagaaica tctctctt ttgpgaaq caatttca
130 accaaagct gaaaagcgt aaatcaaaq gcaattact aaagtactt cggatcatg
131 ccaagaaq gpaaaagq ctatcttg caaagaaq gattctctc ttgaaaga
132 tttaccacta accgtgcat tcaactgaa tactacttg gctcatatt gccagataa
133 ttgactcct ctatctgac aaatcaaat gctatgcat gttgaaqa gaaagaaqa
134 ttgatatac ttgctgac tactaaag gttatgag ttctggaq atcaatata
135 ttgactcct gtaagpaa aaactaaq gaaagaaq aaacttcaa cctctgaa
136 ttactctgt gattttaa ttgaaaga tgaagctgc gatttatt tcaacaaga
137 ttgactcct tcaagpaa ttctgctt agttgpcg gatttcaa ttgctgaa
138 gctgctctg accagattt ttgaaata ttgacta caatctgtg gaaagattt
139 agggatctt aagaaat accgactt tgcgtt gaaatcaaa caagagatt
140 gttgaaatg cpaatgaa accgactt tgcgtt gaaatcaaa ttatctctg
141 ttgaaatg tpaatgaa accgactt tgcgtt gaaatcaaa aaagaaat
142 taatttga gttgaaat accgactt tgcgtt gaaatcaaa aaagaaat

```

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



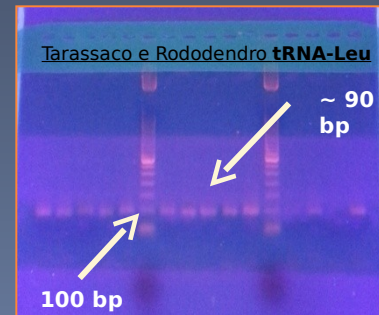
Protocollo termico

Denaturazione: 95°C x 10min.

Annealing: 95°C x 1min.
 T_m x 1min.
 72°C x 1min. } x 35 cicli

Estensione: 72°C x 10min.

Totale circa 2.40 ore

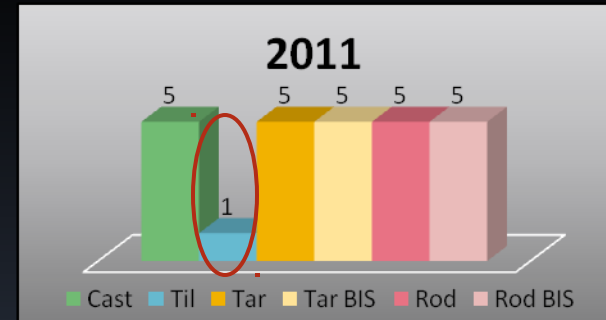




I risultati ottenuti hanno permesso di confermare l'applicabilità della metodica utilizzata su tutti i mieli testati e l'idoneità, per le sequenze specifiche disegnate durante lo studio, a rilevare il target.

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!