



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



Progetto di Ricerca Corrente IZS LT 06/14RC

Produzione locale del polline: analisi dei pericoli e studio di un modello per la loroprevenzione

Antonella Cersini,
Valeria Antognetti,
Silvia Puccica, Gabriele Pietrella

Biotechnologie, IZS LT, Roma

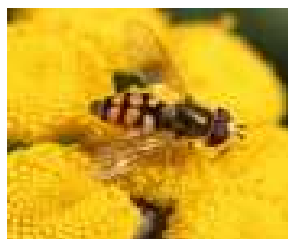




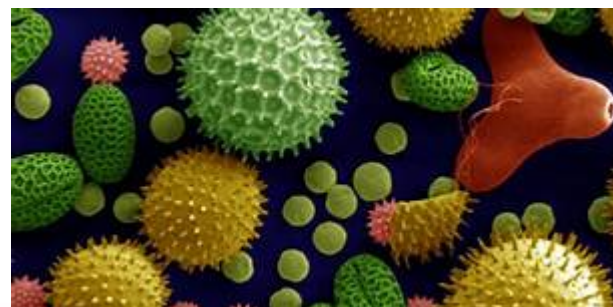
OBIETTIVO

Sviluppare analisi molecolari adatte per la caratterizzazione dei pollini alcaloidi ed allergenici permettendo agli apicoltori coinvolti di:

- mappare le aree agricole dove sono presenti pollini alcaloidi ed allergenici



- limitare la raccolta dei pollini alcaloidi ed allergenici in determinati momenti dell'anno evitando l'accumulo dei pollini potenzialmente nocivi nel prodotto commercializzato





SCELTA DEI POLLINI ALCALOIDI

Riferimento al documento CONTAM (gruppo di studio sui contaminanti nella catena alimentare) dell'EFSA (2014-2015) dove sono indicate le piante nettarifere ad alto contenuto in ALCALOIDI PIRROLIZIDINICI (derivati della pirrolizidina):

- *Senecio vulgaris* (Erba di San Giacomo, *Asteraceae*)
- *Echium vulgare* (Erba viperina, *Borraginaceae*)
- *Eupatorium cannabinum* (Canapa acquatica, *Asteraceae*)
- *Borrago officinalis* (Borragine, *Borraginaceae*)

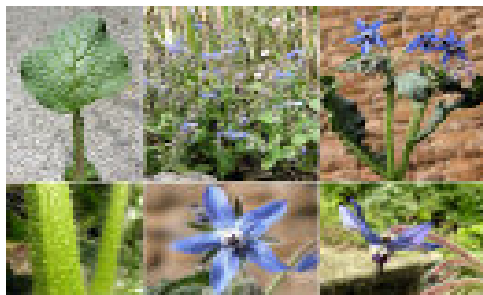




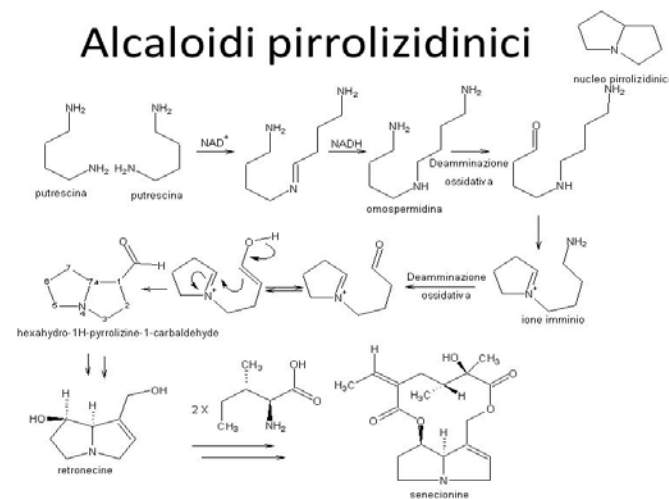
TOSSICITA' DEGLI ALCALOIDI PIRROLIZIDINICI NELL'UOMO

- Sintomi: nausea, vomito, diarrea, dolore gastrico, febbre e itterizia

- Organo colpito: fegato (epatotossicità)



Alcaloidi pirrolizidinici



- Cancerogenicità: l'EFSA (2011) ha definito la DOSE LIMITE DI ASSUNZIONE GIORNALIERA DI RIFERIMENTO, per un rischio superiore del 10% di sviluppare il cancro (BMDL 10), di **70mg/Kg di peso corporeo**.





SCELTA DEI POLLINI ALLERGENICI (1)

- 1) Consultazione della bibliografia scientifica con riferimento alle allergie alimentari al polline sia in età pediatrica che in età adulta e soprattutto dove sono stati riportati casi di fenomeni allergici acuti e shock anafilattici
- 2) Considerando l'areale di produzione (polline e miele) e la stagionalità di ciascun allevatore coinvolto nel progetto

Areale di produzione: provincia di Lucca
(Capannori)





SCELTA DEI POLLINI ALLERGENICI (2)

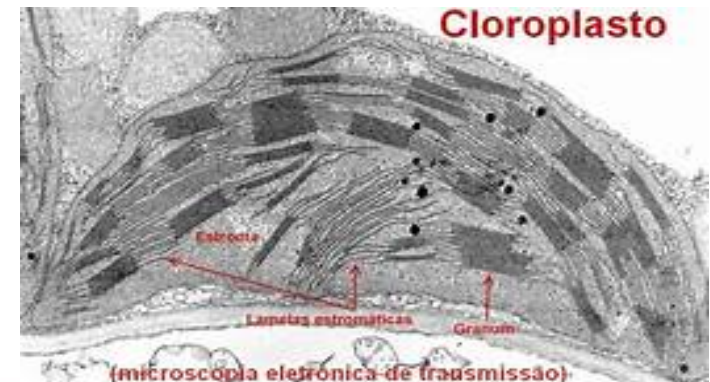
- *Artemisia vulgaris* (Assenzio, *Asteraceae*)
- *Ambrosia artemisiifolia* (Ambrosia, *Asteraceae*)
- *Salix alba* (Salice bianco, *Salicaceae*)
- *Betula pendula* (Betulla bianca, *Betulaceae*)
- *Fraxinus ornus* (Frassino comune, *Oleaceae*)
- *Alnus glutinosa* (Ontano comune, *Betulaceae*)





PROGETTAZIONE DEI PRIMER (1)

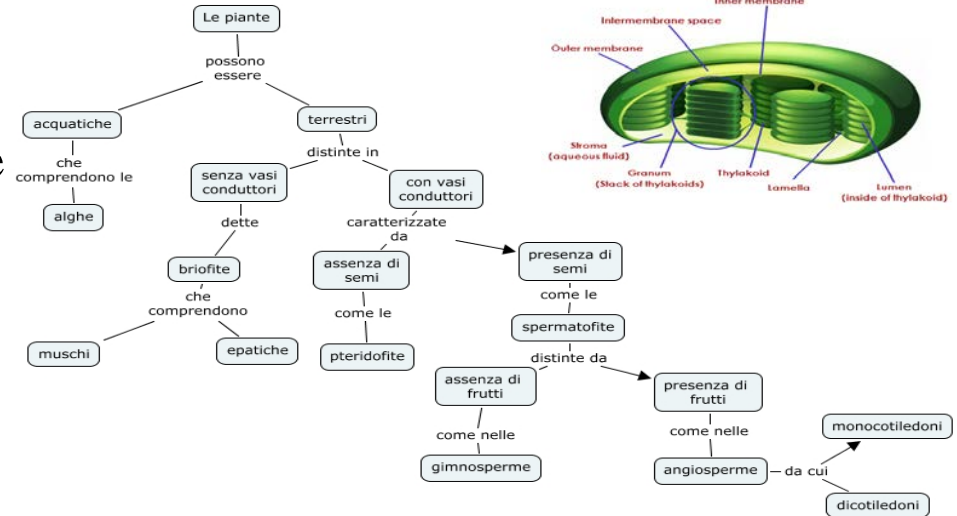
- Scelta di appropriati *tag* del cloroplasto in grado di garantire la tipizzazione molecolare del polline (riconoscimento di specie e/o varietà della pianta)
- I *tag* sono delle piccole porzioni del genoma dei cloroplasti (presenti nei pollini) la cui sequenza nucleotidica è molto conservata nell'ambito del genere, ma, tuttavia presenta piccole porzioni nucleotidiche variabili tali da permetterne il riconoscimento di specie (mediante PCR e/o sequenziamento)
- In letteratura è riportato l'impiego di svariati tag cloroplastici per il riconoscimento di specie: *rpo-trnC* (GCA); *rpS16* intron; *trnD*(GUC)-*trnt*(GGU); *trnH*(GUG)-*psbA*; *trnS*(UGA)-*trnfM*(CAU) e *trnK-matK*





PROGETTAZIONE DEI PRIMER (2)

- Sono stati scelti i seguenti *tag*: *rbcL* (Large Subunit della Ribulose Biphosphate Carboxylase) e *matK* (Maturase K)



Vantaggi:

- a) presenti in multi-copia (aumento della sensibilità);
- b) il sistema di amplificazione è molto robusto;
- c) in letteratura sono riportate diverse coppie di primer universali per protocolli di PCR in grado di rilevare le Angiosperme e le Gimnosperme;
- d) presenza di un numero ridotto di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) specifici soltanto per un genere e non per più generi



PROGETTAZIONE DEI PRIMER (3)

Impiegando il *tag rbcL* sono state disegnate le coppie di primer per specifici protocolli di PCR:

- *Borrigo officinalis*;
161bp



Accession Number HE963354; prodotto della PCR

- *Senecio vulgaris*
230bp



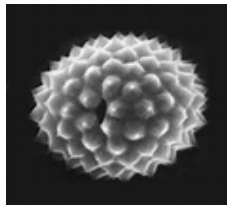
Accession Number KJ204407.1; prodotto della PCR

- *Eupatorium cannabinum*
PCR 290bp



Accession Number JN892438.1; prodotto di

- *Ambrosia artemisiifolia*
PCR 185bp



Accession Number EF590497.1; prodotto di





PROGETTAZIONE DEI PRIMER (4)

Impiegando il *tag matK* è stata disegnata la coppia di primer per uno specifico protocollo di PCR:

-*Echium vulgare*
della PCR 415bp



Accession Number AY092893.1; prodotto

- I software utilizzati per la progettazione dei primer sono stati: BioEdit e Geneious
- La banca dati di sequenze consultata: GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih>)



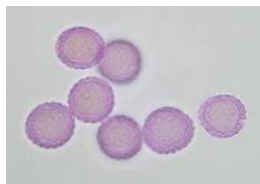


SELEZIONE IN LETTERATURA DEI PROTOCOLLI DI REAL TIME PCR

S. Longhi et al. (2009) Annals of Allergy, Asthma & Immunology; Vol. 103; pp: 508-514

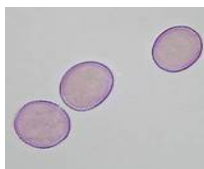
- Per il riconoscimento dei restanti pollini allergenici individuati sono stati modificati specifici protocolli di Real Time PCR riportati in letteratura

- *Artemisia vulgaris*
AF405310



gene target *squalene synthase* (Accession Number

- *Fraxinus ornus*



gene target *Phantastica* (Accession Number DQ679537)

- *Alnus glutinosa*



gene target *Adh1* (Accession Number AM062702)

- *Betulla pendula*



gene target *BP8* (Accession Number Z18891)





FASI OPERATIVE PER L'ATTUAZIONE DEI PROTOCOLLI MOLECOLARI (1)

Una volta completata la progettazione, la selezione dei primer e delle sonde sono stati messi a punto i protocolli molecolari che hanno richiesto diverse fasi operative:

- a) Estrazione del DNA dai granuli pollinici
- b) Allestimento dei protocolli di PCR End Point per 5 specie (*Ambrosia artemisiifolia*, *Borrigo officinalis*, *Echium vulgare*, *Eupatorium cannabinum*, *Senecio vulgaris*)
- c) Allestimento dei protocolli di Real Time PCR per 4 specie (*Artemisia vulgaris*, *Fraxinus ornus*, *Alnus glutinosa*, *Betula pendula*)





FASI OPERATIVE PER L'ATTUAZIONE DEI PROTOCOLLI MOLECOLARI ESTRAZIONE DEL DNA DAL POLLINE (2)

- Contare 40-50 granuli pollinici (già precedentemente selezionati per stessa forma, colore, dimensioni e granulosità dall'U.O. Apicoltura)
- Incubare i granuli pollinici a 37°C in Buffer fosfato (PBS1x) in modo tale da ammorbidire la spessa parete dei granuli pollinici (costituita da uno strato esterno- esina e da uno strato interno-intina)
- Procedere con l'utilizzo di un kit commerciale (Invisorb® Spin Food kit II, INVITEK) dotato di apposite colonnine di pre-filtraggio dei granuli pollinici omogenati capaci di rimuovere gli zuccheri complessi (componenti delle fibre di cellulosa)





FASI OPERATIVE PER L'ATTUAZIONE DEI PROTOCOLLI MOLECOLARI MESSA A PUNTO DEI PROTOCOLLI DI PCR END POINT E DI REAL TIME PCR (3)

Per la messa a punto dei protocolli molecolari sono stati utilizzati:

- a) 9 standard a DNA, ossia sequenze di DNA a doppia elica ciascuno dei quali rappresenta il prodotto (amplificato) di uno dei 9 specifici protocolli molecolari da sviluppare
- b) 14 campioni di polline (appartenenti alla collezione in dotazione all'U.S. Biotenologie)





CAMPIONI ANALIZZATI NELL'AMBITO DELLA RC IZS LT 06/14 E RISULTATI OTTENUTI (1)

Sono stati analizzati con i protocolli molecolari sviluppati i seguenti campioni di polline inviati dall'azienda apistica Aldo Metalori, localizzata in provincia di Lucca (Capannori):

-3 campioni di polline relativi alle raccolte di marzo 2017. **Pollini rilevati:** *Borrago officinalis*, *Eupatorium cannabinum*, *Senecio vulgaris*, *Echium vulgare*, *Ambrosia artemisiifolia* e *Salix alba*. **Pollini assenti:** *Artemisia vulgaris*, *Fraxinus ornus* e *Alnus glutinosa*.

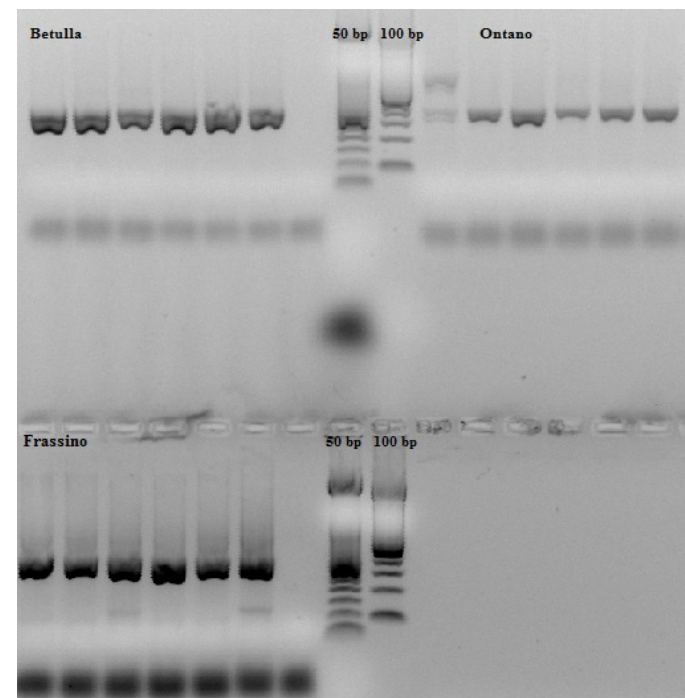
-3 campioni di polline relativi alle raccolte di aprile 2017. **Pollini rilevati:** *Borrago officinalis*, *Eupatorium cannabinum*, *Senecio vulgaris*, *Echium vulgare*, *Ambrosia artemisiifolia*. **Pollini assenti:** *Artemisia vulgaris*, *Fraxinus ornus*, *Alnus glutinosa* e *Salix alba*.





CAMPIONI ANALIZZATI NELL'AMBITO DELLA RC IZS LT 06/14 E RISULTATI OTTENUTI (1)

Gli amplificati ottenuti dai 6 campioni di polline (raccolta marzo 2017 e raccolta aprile 2017) sono stati sequenziati confermando le specie botaniche rilevate





GRAZIE PER L'ATTENZIONE

