

## CARATTERIZZAZIONE DELLE SPECIE VEGETALI E RILEVAZIONE DI OGM IN CAMPIONI DI MIELE MEDIANTE FAST PCR REAL-TIME



Torricelli M.\*, Pierboni E., Tovo G.R., Rondini C.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche,  
\*Università degli Studi di Perugia - Dipartimento di Medicina Veterinaria, Perugia, Italia



### INTRODUZIONE

Il miele è un alimento naturale ad alto potere nutrizionale prodotto dalle api (*Apis mellifera*) a partire dal nettare delle piante, sottoposto a sempre maggiori controlli per problemi di adulterazione. Nel 2005 in Germania si è registrato, inoltre, un caso di contaminazione di miele da mais geneticamente modificato (GM) MON810. Ciò ha aperto uno scenario di cambiamenti legislativi, concluso con la Direttiva 2014/63/UE (1) secondo cui il polline, essendo una componente naturale del miele, non va considerato un ingrediente. Pertanto non è previsto il controllo degli OGM autorizzati in tale matrice (2). Negli ultimi anni, visto l'incremento della moria delle api, si è registrata una sempre maggiore richiesta di importazione di mieli da Paesi Terzi, con il rischio di introduzione nella catena alimentare e nel mercato europeo di UGM (OGM non autorizzati) (3).

Il presente lavoro è consistito nell'applicazione di una metodica di estrazione di DNA, rapida ed efficiente, precedentemente sviluppata e validata dal nostro Laboratorio, a campioni di miele e di favo di diversa origine botanica e geografica.

### MATERIALI E METODI

Il metodo di estrazione di DNA da miele è derivato da un protocollo di pre-trattamento ed estrazione modificato e validato (4). I DNA ottenuti sono stati purificati mediante kit NucleoSpin gDNA Clean-up (Macherey-Nagel). I campioni analizzati sono riportati nella Tabella 1. La qualità e la quantità dei DNA estratti è stata valutata al fotometro (Eppendorf®) e mediante test d'inibizione in Fast PCR Real-time per il gene *actina*, valutando il DNA tal quale e la sua diluizione 1:4 (5). La fase successiva ha previsto una Fast PCR Real-time per identificare i geni delle specie vegetali interessate da modificazione genetica: *alcohol dehydrogenase 1* (*Adh1*) per mais, *lectina* (*Le*) per soia, *fosfolipasi D* (*Pld*) per riso, *solanum tuberosum stem cell* (*St-Is1*) per patata, *acyl carrier protein 1* (*Acp-1*) per cotone, *cruciferina A* (*CruA*) per colza e *glutammina sintetasi* (*Gs*) per barbabietola da zucchero (6;7;8). I DNA positivi sono stati sottoposti a Fast PCR Real-time per gli elementi GM di screening: P35S, T-nos, cp4-epsps, ctp2-cp4epsps, pat, nptII, bar (6;8;9;10). Alla positività ad uno o più elementi di screening sono seguite l'identificazione e la quantificazione dell'evento GM specifico (6).

Tabella 1

ID	origine		<i>actina</i>		geni endogeni (Cq)				screening (Cq)		tipizzazione (Cq)
	botanica	geografica	Cq	$\Delta Cq$	Le	Adh1	Pld	CruA	P35S	T-nos	MON40-3-2
1	miele Madranto*	Cile	30.04	2.07		39.40		36.96			
2	miele del deserto	Cile	33.46	2.39				36.16			
3	miele millefiori	Messico	37.36	1.63							
4	miele di foresta tropicale	Sierra Leone	34.40	1.90			35.37				
5	miele di Abelha Jandaira*	Brasile	31.85	2.20							
6	miele di Tujuba*	Brasile	38.08	/							
7	miele di Jatai*	Brasile	39.62	/							
8	miele di Guaraipo*	Brasile	33.41	2.43							
9	miele di Mandacaia*	Brasile	31.03	2.22							
10	miele di Tubuna*	Brasile	37.07	/							
11	miele di Eucalipto	Italia-Uruguay	31.90	2.04	33.47			33.90	36.20	36.47	35.26/36.50**
12	miele millefiori	Italia-Ungheria-Argentina	30.27	2.30	37.27	34.74		32.68			
13	miele millefiori	Argentina-Ungheria	29.44	2.08		36.00		30.00			
14	miele di fiori	Spagna	32.34	2.22			36.30	37.00			
15	miele millefiori	Argentina-Ungheria	35.60	1.50				38.70			
16	favo	Italia (Udine)	29.15	1.87		38.80					
17	favo	Italia (Spoleto)	33.40	1.88	36.78			38.25			
18	favo	Argentina	34.85	1.50							

\*: denominazione riportata in etichetta; Cq: ciclo di quantificazione (11);  $\Delta Cq$ : differenza tra il Cq medio del DNA tal quale e il Cq medio del DNA diluito;

\*\* : risultati ottenuti da due distinte analisi.

### RISULTATI

Il polline è presente in quantità esigue e può variare da miele a miele. Dal dosaggio del DNA pollinico al fotometro si sono infatti ottenute concentrazioni variabili da 10 a 100 ng/ $\mu$ L. La quantità (Cq) e la qualità ( $1.5 \geq \Delta Cq \leq 2.5$ ) dei DNA estratti rientrano nei parametri di accettazione. Tutti i DNA sono risultati amplificabili per il gene *actina*. Dei 18 campioni analizzati, in 10 sono stati riscontrati uno o più geni endogeni pianta-specifici (Tabella 1).

L'analisi di screening è stata condotta su tutti i 10 campioni e solo uno di questi ha presentato amplificazione di due elementi transgenici, P35S e T-nos. Tali positività hanno indirizzato la ricerca dell'evento di soia GM MON40-3-2, identificato e quantificato contro il gene endogeno *Le*, risultando inferiore al limite di quantificazione (LOQ) (Tabella 1).

### DISCUSSIONE

In base alla legislazione vigente, si potrebbe attuare il controllo degli OGM sul miele utilizzato come ingrediente e sul polline puro, come supplemento alimentare. I valori ottenuti confermano il fatto che con una metodica di estrazione efficiente è possibile estrarre DNA pollinico se pur presente in quantità esigue. In conclusione, il miele può essere considerato un interessante bersaglio analitico in quanto non solo può essere un "vettore" di OGM autorizzati, di cui rimane difficile una quantificazione attendibile, ma anche di OGM non autorizzati in EU, provenienti da Paesi Terzi, per i quali è sufficiente un'analisi qualitativa.

**Bibliografia:** 1. Direttiva 2014/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 15.05.14; 2. Regolamento (CE) N. 1829/2003; 3. EUR 25008 EN (2011) ISBN 978-92-79-21800-2; 4. BVL (2011). Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, p. 1-3; 5. Laube I. et al. (2010). Food Chem, 118, 979-986; 6. UNI EN ISO 21570:2013; 7. Madeo L., Pierboni E., Curcio L., Tovo G., Gabrielli F., Rondini C. XIV Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. Sorrento (Na) 24-26.10.12. p. 364-366; 8. EUR 24526 EN 2011; 9. Weighardt F. et al. J. AOAC Inter. (2004), 87 (6): 1342-1355; 10. Cheng X.Y. et al. (2008). Analytical Biochemistry, Vol. 375, Issue 1, 01.04.08, p. 150-152; 11. Bustin S.A. et al. (2009). The MIQE Guidelines. Clin Chem 55(4): 611-622.

Progetto di Ricerca Corrente realizzato con i fondi del Ministero della Salute, RC 14/12 IZSUM

Stampato a cura dell'Unità Operativa di Supporto Biblioteca, Informazione, Editoria.

Quest'opera è stata rilasciata sotto la licenza Creative Commons Attribuzione-Non commerciale-Non opere derivate 2.5 Italia.

Per leggere una copia della licenza visita il sito web <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/it/> o spedisci una lettera a Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, California, 94105, USA.