



La “carta d’identità” del miele



Un nuovo approccio basato sull’analisi del DNA ci dice la sua origine botanica

Le caratteristiche del miele dipendono in larga misura dalla sua origine e composizione botanica che rappresenta a tutti gli effetti la “carta d’identità” del miele. L’origine botanica del miele permette la sua differenziazione nei diversi tipi botanici. Inoltre, la composizione botanica permette di risalire indirettamente e almeno in parte all’origine

geografica del miele. Quindi ci comunica anche il suo “indirizzo” che è un altro elemento essenziale per la differenziazione del miele. Infatti è ben noto che molte specie di piante possono crescere solo in alcune regioni o parti del mondo. Quindi questa “carta d’identità” ci può dare una indicazione geografica potenzialmente globale.



Da dove possiamo recuperare questa “firma” botanica? È ben noto che il miele contiene il polline che deriva principalmente dai fiori che l’ape ha visitato durante la raccolta del nettare. Questo polline viene detto primario. Non è il solo. Altro polline che si trova nel miele può derivare dal polline raccolto e conservato nell’alveare per la nutrizione della colonia (polline secondario) o può derivare dalle operazioni di smielatura (terziario) o

può essere presente nell’ambiente e trasportato dal vento (quaternario). I pollini secondari, terziari e quaternari possono far variare il contenuto pollinico del miele. Altri elementi di variazione del contenuto pollinico sono la specie botanica che può produrre più o meno polline, la stagione, i metodi di estrazione del miele e l’esposizione dell’apiario a correnti d’aria o venti. Altre forme non naturali che determinano variazione del contenuto pollini-

co sono le operazioni di filtrazione, le miscelazioni di mieli di diversa origine e le frodi commerciali.

Tradizionalmente, l’identificazione del polline nel miele viene effettuata mediante l’analisi melissopalinologica. Questa consiste nel riconoscimento visivo al microscopio dei pollini e la loro attribuzione ad una specie o a un gruppo botanico attraverso il confronto comparativo con la forma dei granuli rappresentati in uno specifico

atlante palinologico. La precisione di attribuzione dipende da quanto informativa è la forma del polline e dal livello di competenza e preparazione dell'operatore che fa questa analisi, oltre che dalla completezza dell'atlante di riferimento. L'analisi è comunque particolarmente laboriosa, molto spesso non permette di raggiungere una precisione assoluta di assegnazione ad una specie di pianta, è difficilmente standardizzabile e varia a seconda delle competenze dell'analista. Quindi, innovazioni tecnologiche in questo ambito potrebbero essere molto utili.

Ed ecco l'innovazione che cambia radicalmente il modo di approcciare questo problema. Presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroalimentari dell'Università di Bologna

è stato messo a punto un metodo, basato sull'analisi del DNA, pubblicato recentemente sulla rivista scientifica Food Control [Utzeri, V. J., Ribani, A., Schiavo, G., Bertolini, F., Bovo, S., & Fontanesi, L. (2018). Application of next generation semiconductor based sequencing to detect the botanical composition of monofloral, polyfloral and honeydew honey. *Food Control*, 86, 342-349: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.033>]. Il metodo utilizza l'informazione che è presente nel DNA, che a sua volta è contenuto nel polline, il quale è presente e isolabile dal miele. Il DNA del polline è infatti specifico della specie di pianta da cui questo deriva. L'informazione contenuta nel DNA è recuperabile attraverso il sequenziamento del DNA che permette

di ricostruire l'ordine in cui i quattro nucleotidi (i mattoncini del DNA indicati con le lettere A, C, G e T) sono appunto pre-ordinati in un piccolo frammento del genoma della pianta da cui il polline è stato prodotto. L'articolo menzionato descrive l'applicazione di un particolare sistema di sequenziamento massivo del DNA, indicato in gergo tecnico con i termini di *next generation sequencing*. Questo approccio riesce ad analizzare contemporaneamente il DNA proveniente da migliaia o centinaia di migliaia di granuli pollinici presenti nel miele. L'informazione che ne deriva è rappresentativa del reale contenuto pollinico del miele e, di conseguenza, permette di stabilire con precisione la sua composizione botanica e l'origine floreale.

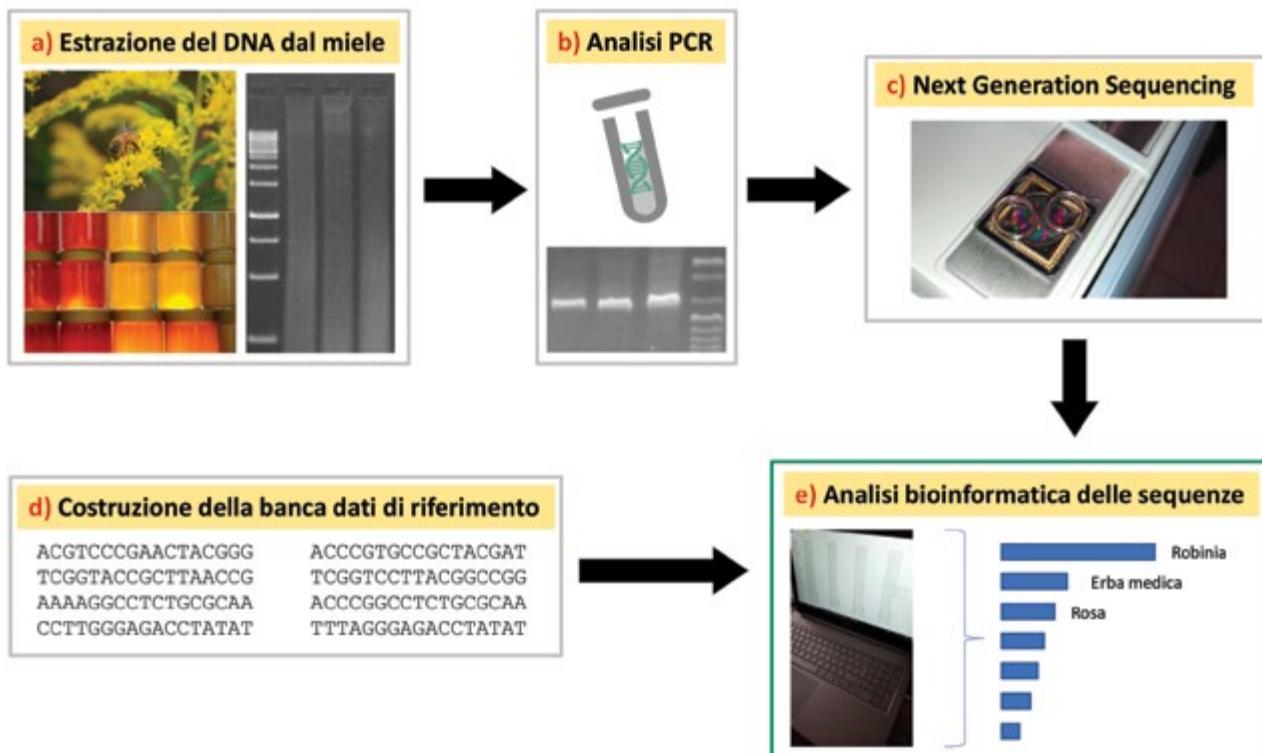
Come funziona in pratica questa analisi? Ecco qui di seguito i passaggi fondamentali:
(vedi Figura 1)

- a) il DNA del polline viene estratto dal miele;
- b) mediante la tecnica della Polymerase Chain Reaction (PCR), dal DNA estratto, viene amplificato milioni di volte un breve frammento di DNA plastidico o nucleare per mezzo di un ap-

proccio detto di barcoding: questo permette di analizzare una regione standard di DNA da cui è possibile risalire alle specie di piante da cui il DNA è stato estratto;

- c) successivamente, il sequenziamento massivo (*next genera-*

Figura 1. Rappresentazione schematica dei vari passaggi per ottenere le informazioni sull'origine botanica del miele mediante l'approccio di sequenziamento massivo del DNA



tion sequencing) dei frammenti amplificati produce contemporaneamente la sequenza del DNA amplificato e proveniente dal polline presente nel miele: sono prodotte milioni di brevi sequenze di DNA in ciascuna analisi;

d) è necessario poi interpretare i risultati, cioè tradurre le brevi sequenze di DNA prodotte dal sequenziamento massivo: questo avviene attraverso un'analisi bioinformatica che si basa su algoritmi, messi a punto a questo scopo, che confrontano le brevi sequenze di DNA, ottenute grazie alla tecnica di *next generation sequencing*, con le informazioni di sequenza note per ciascuna pianta presenti in una banca dati;

e) un punto chiave in questi passaggi è la costruzione della banca dati che permette l'effettiva traduzione delle informazioni di sequenza prodotte.

In linea di principio questa analisi basata sul DNA è simile all'analisi melissopalinologica: il polline anziché essere identificato visivamente viene indirettamente identificato attraverso un suo componente, il DNA; l'atlante palinologico che contiene le informazioni che permettono l'identificazione del polline è sostituito dalla banca dati delle sequenze di DNA di riferimento; l'analisi visiva dell'esperto è sostituita dall'analisi bioinformatica automatizzata.

Lo studio pubblicato sulla rivista Food Control ha permesso di mettere a punto tutti i passaggi tecnici necessari per arrivare a classificare botanicamente un miele e rendere possibile questa analisi in modo routinario. In particolare, è stata costruita la banca dati indispensabile per la traduzione delle informazioni di sequenza del DNA ottenute in modo massivo. La banca dati contiene più di 150.000 sequenze di riferimento corrispondenti a circa 20.000 specie botaniche diverse. L'analisi bioinformatica è integrata ai dati generati dalla piattaforma di *next generation sequencing* per classificare in modo automatico il miele e identificare tutte le specie o gruppi botanici, recuperati come informazione presente nel polline, a sua volta contenuto nel campione analizzato. Sono stati poi testati diversi mieli di origine botanica nota e alcuni per i quali questa informazione non era disponibile per verificare l'effettiva capacità del sistema di generare la "carta d'identità" del miele. Per esempio, il miele di castagno ha riportato la presenza di 59 gruppi botanici differenti tra cui quello più frequentemente rappresentato nelle sequenze di DNA (66% sul totale) è risultato appunto quello di castagno. Anche per il miele di acacia sono stati identificate diverse specie botaniche (71 in totale) tra cui quella più rappresentata con il 41% di sequenze è risultata la robinia. L'analisi di un miele di origine sud-americana ha permesso di identificare specie di piante che crescono solo in quel continente, confermando l'origine geografica di quel miele.

Il sistema, che sfrutta le capacità delle tecnologie di *next generation sequencing*, può essere applicato contemporaneamente su molti campioni di miele riducendo al massimo i costi analitici che sono simili, se non inferiori, a quelli di una classica analisi melissopalinologica.

Con questa innovazione, l'analisi del DNA può essere considerata uno strumento utile per difendere l'apicoltura da frodi commerciali e verificare l'effettiva origine del miele. Possiamo ora anche semplicemente capire con più precisione il comportamento delle api bottinatrici. Abbiamo una nuova "carta d'identità" del miele che deriva dall'introduzione in apicoltura delle nuove tecnologie di analisi del DNA. ●



Chip Ion Torrent su cui avviene la reazione di *next generation sequencing* con le sue dimensioni derivate dalla moneta

Luca Fontanesi

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroalimentari, Università di Bologna.
luca.fontanesi@unibo.it