

ALMA MATER STUDIORUM Università di Bologna

Presentazione del progetto BEE-RER



Luca Fontanesi

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-alimentari Università di Bologna

luca.fontanesi@unibo.it

10 Aprile 2020

Titolo completo del progetto

"L'analisi del DNA ambientale del miele e di contaminanti per la valorizzazione e la difesa delle produzioni apistiche e per il monitoraggio degli aggressori dell'alveare in Emilia-Romagna (BEE-RER)"











ministero delle politiche agricole alimentari e forestali



Progetto realizzato con il contributo del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, Regolamento UE 1308/2013, Programma 2019/2020, sottoprogramma ministeriale Regione Emilia-Romagna, Misura F (DELIBERAZIONE DELL'ASSEMBLEA LEGISLATIVA DELLA REGIONE EMILIA-ROMAGNA 27 LUGLIO 2019, N. 216 – OCM Apicoltura





DELIBERAZIONE DELL'ASSEMBLEA LEGISLATIVA DELLA REGIONE EMILIA-ROMAGNA 27 LUGLIO 2019, N. 216

Reg. (UE) n. 1308/2013 recante organizzazione comune dei mercati dei prodotti agricoli. Aiuti nel settore dell'apicoltura. Approvazione del programma triennale 2020-2022. (Delibera di Giunta regionale n. 1132 dell'8 luglio 2019)

MISURA F COLLABORAZIONE CON ORGANISMI SPECIALIZZATI PER LA REALIZZAZIONE DI PROGRAMMI DI RICERCA APPLICATA NEI SETTORI DELL'APICOLTURA E DEI PRODOTTI DELL'APICOLTURA

Progetto di ricerca presentato nell'ambito delle seguenti Azioni:

Azione f.1): miglioramento qualitativo dei prodotti dell'apicoltura mediante analisi fisico-chimiche e microbiologiche, studi di tipizzazione in base all'origine botanica e geografica; Azione f.2) ricerche finalizzate alla lotta alle malattie e agli aggressori dell'alveare.

https://site.unibo.it/bee-rer/it/





https://www.facebook.com/progettoBEERER/

@progettoBEERER

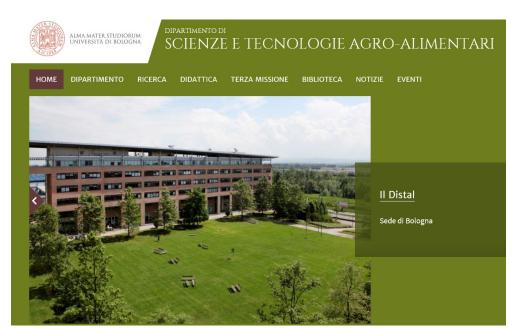


https://www.linkedin.com/company/bee-rer















Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-alimentari (DISTAL)

Samuele Bovo Anisa Ribani Giuseppina Schiavo Valerio Joe Utzeri Luca Fontanesi



Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET)

Gloria Isani Roberta Galuppi Giulia Andreani







Il contesto

- 1) Commercio mondiale dei prodotti dell'apicoltura (frodi e nuove minacce/patogeni)
- 2) Cambiamenti climatici (andamento produzioni, biodiversità, patogeni)
- 3) Interazione ape-ambiente (inquinanti/fitofarmaci)





Gli obiettivi di BEE-RER

1) Affrontare diverse problematiche del settore apistico utilizzando la **genomica**

 Sfruttare le potenzialità dell'analisi del DNA del miele





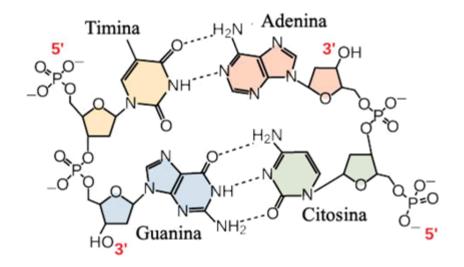
Analisi del DNA del miele

| ATTTATATAGTTTAAAAAAAACATTATATTTTC | CAA |
|--|-----|
| TATAAAATAATTAAATTTAATTAATA | AT |
| TAAGTC####ZTTAA ##### TAACA####AAATA | AC |
| CTAAAAATTATTIATTAATAAAGAAATATCA <mark>A</mark> T | 'AA |
| ATAAA GCTTCTAACTTTAACTCTAGATTCGT AA | AT |
| AATCIATATTTCTTATTATAATTTAAATAAA | ATA |
| TTAATTTTAAAATAAATTATATAATAAGCTAA | AT |
| AAAGCTAACAGGTTCATACCCTGTCGATAAATT | 'AA |

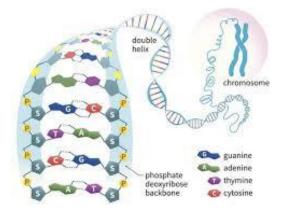


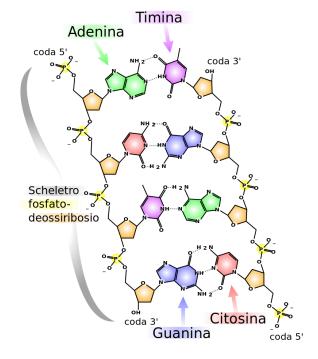


Che cos'è il DNA



A T C G









Che cos'è il DNA

TTAATTTTAAAATAAAATTATATAATAAGCTAAATAAAGCTAACAGGTTCATACCCTGTCGATAAATTAA TAATTTTTATATAAATTATTAAATTTATTTTAGTGTTTAAGCACATAAAATTTTGAATTTTATAGTATTA ATTAAATTAATAAATTGGATATTAGTTATAAATAATAACATTTAAAATTGCATTTAAAAATTAATATTTTA TATATTATATATCTAAAAAGTAATATGTCTGATAAAAGAAATATTTTGATAAAATATTAATGTATAATTTTT GAATTAGACTAATTAATATTAAATCCACAAATAAAACCCCGAGATTAATTTATTCAGTATCAGTAAT ${
m TTCAAGAATTTTTTTTTTTTTTATAATTATTGTATACTTATCATCATCTATTAGATTTACTAAAACAGATACT$ ATTTTATTTTTATTTTAGAATTAAATAAAAATATATTTTATTGCTATAATTATTTTATATTCATTTAATTA $\mathsf{T}\mathsf{T}\mathsf{T}\mathsf{T}\mathsf{T}\mathsf{T}\mathsf{T}\mathsf{T}\mathsf{A}\mathsf{T}\mathsf{T}\mathsf{A}\mathsf{C}\mathsf{A}\mathsf{T}\mathsf{T}\mathsf{C}\mathsf{T}\mathsf{A}\mathsf{A}\mathsf{A}\mathsf{T}\mathsf{T}\mathsf{T}\mathsf{A}\mathsf{A}\mathsf{T}\mathsf{T}\mathsf{T}\mathsf{A}\mathsf{A}\mathsf{T}\mathsf{T}\mathsf{T}\mathsf{T}\mathsf{A}\mathsf{A}\mathsf{T}\mathsf{T}\mathsf{T}\mathsf{T}\mathsf{A}\mathsf{A}\mathsf{T}\mathsf{T}\mathsf{T}\mathsf{T}\mathsf{A}\mathsf{T}$ CAAATATACACATTCTTAACATTAATATTTAATTATTCAATATATCCAATTTTTCTTTCATTTGTAATTA ${\tt AATGAAATCTAATTTTTATAATAGTAAGAGTTAAAGCTTATAATTGAATTTTATTTCTTTTAATAATTTC$



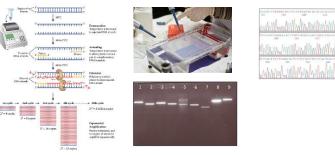


Analisi del DNA del miele in BEE-RER



1) Analisi target

1a) End-point PCR analyses



1b) Next generation sequencing









2) Analisi non-target

Next generation sequencing: Shotgun metagenomic analysis













Il progetto è suddiviso in:

4 azioni

3 fasi operative





Le 4 azioni:

- **1)** Messa a punto e utilizzo di sistemi per l'identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera* dal miele e analisi della loro diffusione nella Regione Emilia-Romagna;
- 2) Applicazione di nuovi approcci molecolari per l'identificazione dell'origine botanica del miele della Regione Emilia-Romagna, per la sua valorizzazione geografica;

• • • •





Le 4 azioni:

• • • •

- **3)** Caratterizzazione multifattoriale del miele per la messa a punto di sistemi integrati di valutazione qualitativa e sanitaria di questo prodotto e per la valutazione e il monitoraggio sanitario degli apiari;
- **4)** Analisi della distribuzione e messa a punto di metodi per il monitoraggio di diversi patogeni sul territorio regionale.

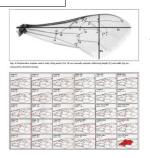
Le 3 fasi:

- 1) La fase di preparazione: raccolta dei campioni di miele e di api sul territorio regionale;
- 2) La fase analitica e di elaborazione dei dati;
- 3) La fase di disseminazione e divulgazione.

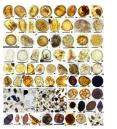




Azione 1



Analisi morfometrica delle api



Azione 2

Analisi melissopalinologica del miele





Azione 3

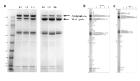


Analisi di contaminanti nel miele e nelle api



HO H OH OH

Analisi dell'emolinfa delle api





Analisi di alcuni patogeni













Azione 1

Messa a punto e utilizzo di sistemi per l'identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera* dal miele e analisi della loro diffusione nella Regione Emilia-Romagna





Azione 1

Determinazione della sottospecie di ape che ha prodotto il miele (primo step: DNA mitocondriale)

Food Control 91 (2018) 294-301



Contents lists available at ScienceDirect

Food Control





Authentication of honey based on a DNA method to differentiate *Apis* mellifera subspecies: Application to Sicilian honey bee (*A. m. siciliana*) and Iberian honey bee (*A. m. iberiensis*) honeys



Valerio Joe Utzeri, Anisa Ribani, Luca Fontanesi*

Department of Agricultural and Food Sciences (DISTAL), Division of Animal Sciences, University of Bologna, Viale Fanin 46, 40127 Bologna, Italy





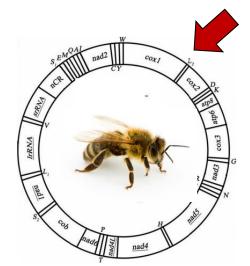
Azione 1

Determinazione della sottospecie di ape che ha prodotto il miele (primo step: DNA mitocondriale)

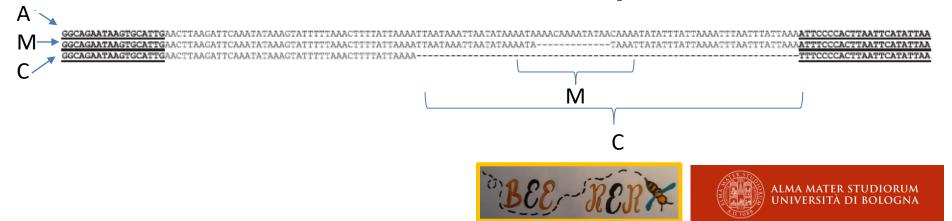
3 principali linee mitocondriali in Europa:

A, C, M

Diversa lunghezza della regione COI-COII intergenic spacer

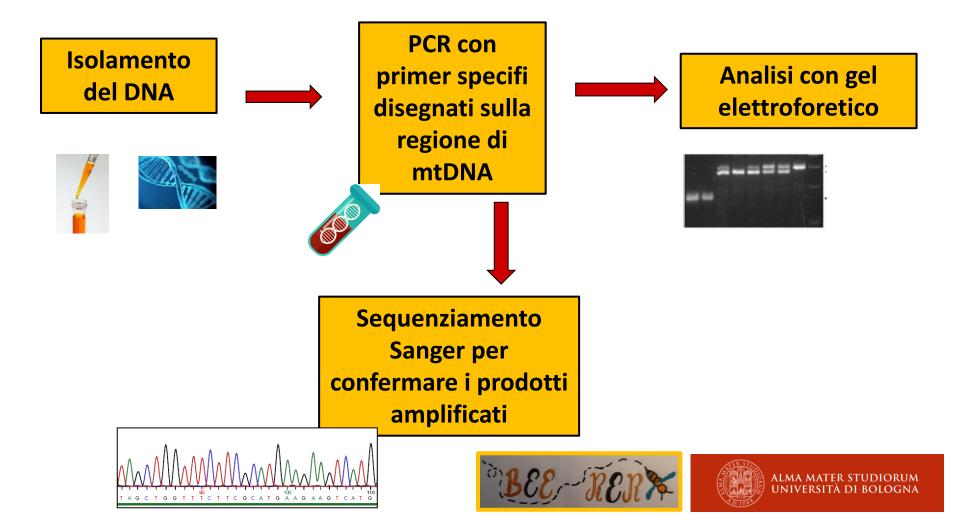


Apis mellifera mtDNA



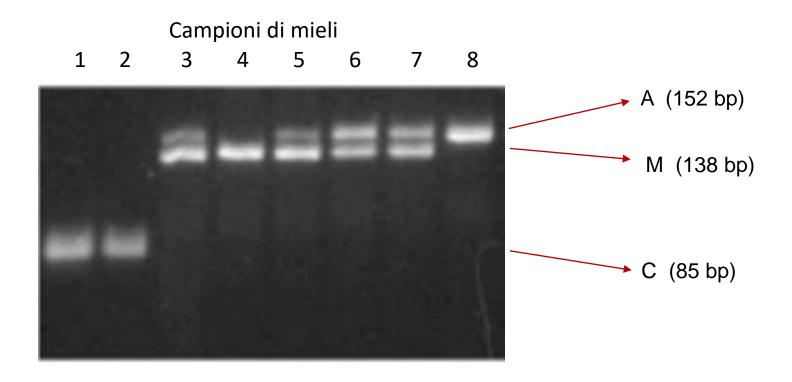
Azione 1

Determinazione della sottospecie di ape che ha prodotto il miele (primo step: DNA mitocondriale)



Azione 1

Determinazione della sottospecie di ape che ha prodotto il miele (primo step: DNA mitocondriale)

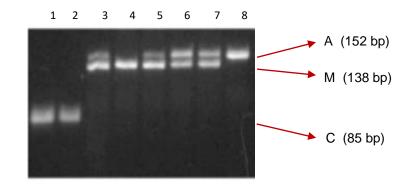






Azione 1

Agganciare l'analisi morfometrica all'analisi del DNA del miele

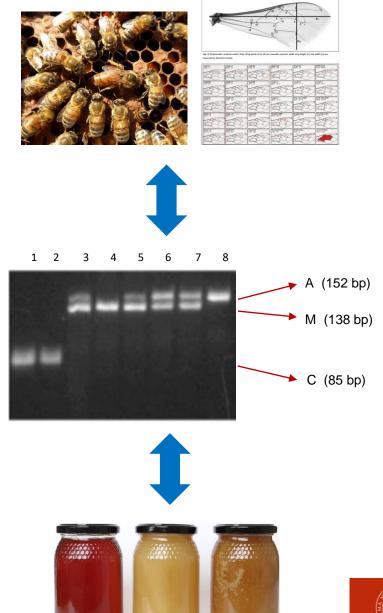






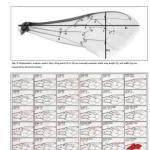
Azione 1

Agganciare
l'analisi
morfometrica
all'analisi del
DNA del miele
(mtDNA)

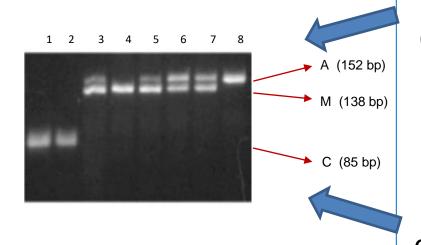




Azione 1



Agganciare
l'analisi
morfometrica
all'analisi del
DNA del miele
(mtDNA)



70-100 famiglie (2 campioni di 50 api)

+

Un pezzo di favo con miele da ciascuna famiglia



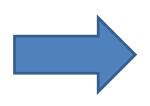


I risultati preliminari di BEE-RER

Azione 1

(oltre agli obiettivi specifici dell'Azione 1)

Agganciare l'analisi morfometrica all'analisi del DNA del miele (genoma nucleare)



Abbiamo messo a punto una prima metodologia





Azione 2

Applicazione di nuovi approcci molecolari per l'identificazione dell'origine botanica del miele della Regione Emilia-Romagna, per la sua valorizzazione geografica







Azione 2

Analisi melissopalinologica del miele





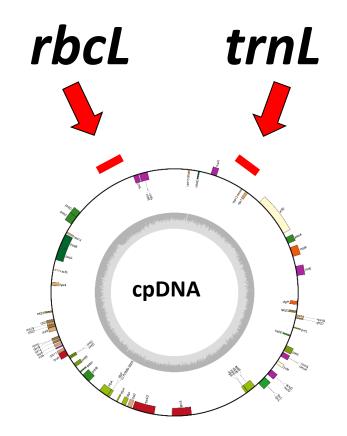


Azione 2



DNA delle piante (DNA cloroplastico)









Azione 2

Isolamento del DNA da miele





Database di riferimento con sequenze della regione target

ATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGACGCA
TCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGT
GAACTGTCAAAACTTTTAACAACGGATCTCTT
TGTTGCTTCGGCGGCGCCCCCAAAGGGTGCCCG
GGCCTGCCGTGGCAGATCCCCAACGCCGGGCC
TCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAACGCAG
CAGCATCGATGAAGAACGCAGTCGATGAAGAACGCAT
CGGATCCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAAC
ACAACGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAA
ACGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAA
CGATCCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAA
GATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATATGTAAT
GATGAAGAACGCAGCGAACGCGATGAAGAAC
GATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATATGTAAT

PCR con primer universali

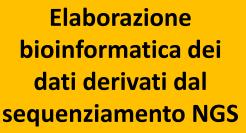






Sequenziamento NGS





- NGS data processing
- Read assignment



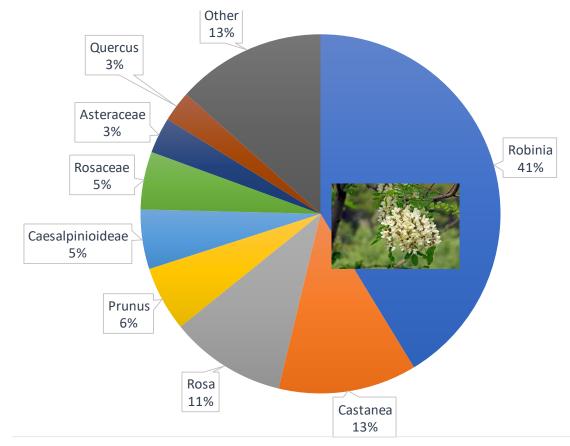
Azione 2

trnL

71 gruppi botanici

41% Robinia

Miele di Acacia







Azione 3

Caratterizzazione multifattoriale del miele per la messa a punto di sistemi integrati di valutazione qualitativa e sanitaria di questo prodotto e per la valutazione e il monitoraggio sanitario degli apiari





Azione 3



Azione 3

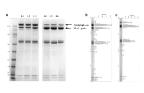


Analisi di contaminanti nel miele e nelle api



HO HOHOH

Analisi dell'emolinfa delle api





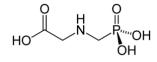


Azione 3



Analisi sul miele (da favi):

- 1) sequenziamento shotgun;
- 2) sequenziamento 16 S (analisi microbiologica);
- 3) determinazione del livello di glifosato.



Analisi sulle api:



- biomarcatori proteici sulle api elettroforesi in SDS-PAGE;
- 2) determinazione di alcuni metalli (Fe, Zn, Cu, Cd, Pb).





Azione 3

Modalità di campionamento

Da 5-10 famiglie con problemi E da 5-10 famiglie senza problemi dallo stesso apiario

Un pezzo di favo con miele da ciascuna famiglia + api vive

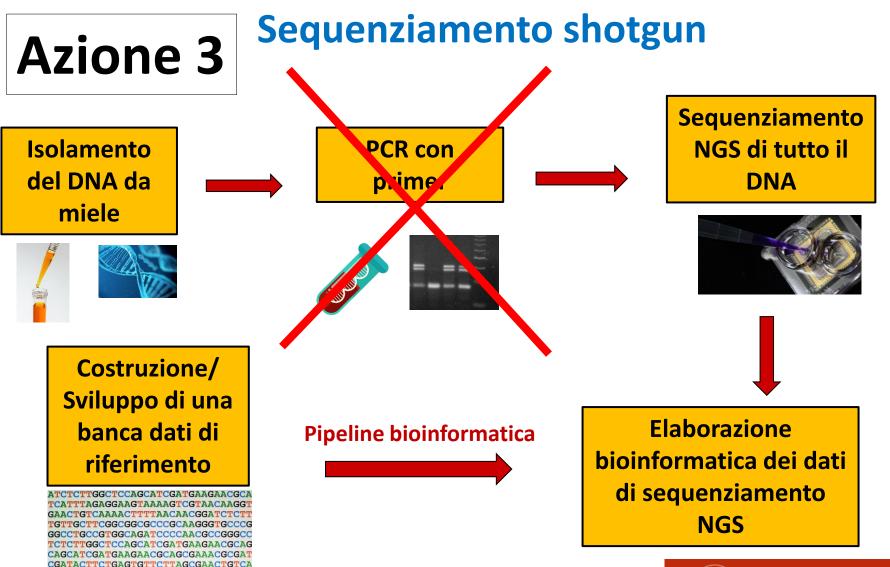
https://site.unibo.it /bee-rer/it/lineeguida-per-ilcampionamento





CGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAAC

ACAACGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAA CGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAAC GATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATATGTAAT



- NGS data processing
- Read assignment



Azione 4

Analisi della distribuzione e messa a punto di metodi per il monitoraggio di diversi patogeni sul territorio regionale





Azione 4

Analisi di alcuni patogeni









Azione 4

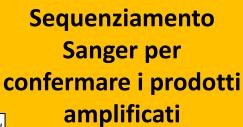
Isolamento del DNA da miele



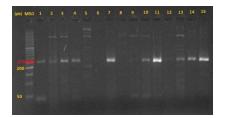


PCR con primer specifici per ciascun patogeno (end point PCR)





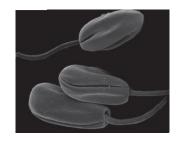
Analisi mediante elettroforesi su gel





Azione 4

Crithidia mellificae Lotmaria passim









Collaborazione con le Associazioni degli Apicoltori Regionali

- Campionamenti per le Azioni 1 e 3
 https://site.unibo.it/bee-rer/it/linee-guida-per-il-campionamento
- Confronto per migliorare gli obiettivi e i risultati
- Diffusione e disseminazione dei risultati
 - Piena disponibilità per la presentazione del progetto
 - Organizzazione seminari tecnici specifici
 - Seminario finale per presentazione dei risultati





Conclusioni

- BEE-RER è strutturato in diverse azioni che cercano di contribuire alla soluzione di diversi problemi del settore apistico regionale
- Molte azioni permetteranno di ottenere risultati preliminari
- L'applicazione pratica necessiterà di altre attività e di un lavoro insieme alle Associazioni e organizzazioni apistiche
- Il seminario finale di presentazione dei risultati sarà fissato a Luglio





https://site.unibo.it/bee-rer/it/





https://www.facebook.com/progettoBEERER/

@progettoBEERER



https://www.linkedin.com/company/bee-rer







Ringraziamenti

- Osservatorio Nazionale Miele (Alberto Contessi e Giancarlo Naldi)
- Lucia Piana
- Associazione Apicoltori Felsinei
- Riccardo Cabbri
- Molti apicoltori
- Tutte le associazioni degli apicoltori della regione



Regione Emilia-Romagna











ministero delle politiche agricole alimentari e forestali



Progetto realizzato con il contributo del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, Regolamento UE 1308/2013, Programma 2019/2020, sottoprogramma ministeriale Regione Emilia-Romagna, Misura F (DELIBERAZIONE DELL'ASSEMBLEA LEGISLATIVA DELLA REGIONE EMILIA-ROMAGNA 27 LUGLIO 2019, N. 216 – OCM Apicoltura







ALMA MATER STUDIORUM Università di Bologna

Presentazione del progetto BEE-RER



Luca Fontanesi

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-alimentari Università di Bologna

luca.fontanesi@unibo.it

10 Aprile 2020