

SCHEDA APENET Monitoraggio e ricerca in apicoltura

Titolo “Analisi dei fattori di rischio per la salute delle api”

Studio effettuato da: CRA – unità di ricerca di apicoltura e bachicoltura

Descrizione attività:

Premessa

Il progetto nasce dall'esigenza di mettere in atto delle misure in grado di fornire risposte alle problematiche legate ai fenomeni di mortalità o di spopolamento di famiglie di api segnalati da diversi anni in numerosi Paesi, tra cui l'Italia.

A tale riguardo, fondamentale e urgente è la creazione di una rete di **monitoraggio nazionale**, accompagnata dalla messa a punto del sistema delle segnalazioni. I dati ottenuti dalle due azioni indicate (monitoraggio e segnalazioni) potranno essere utilizzati sia per ottenere risposte immediate circa lo stato di salute dell'apicoltura italiana, sia come elementi per studiare e valutare singolarmente tutti i fattori di rischio identificati.

Attività di ricerca

Verifica della tossicità, pericolosità e degli effetti sub-letali verso le api degli agrofarmaci di impiego più diffuso, attraverso **studi ecotossicologici ed etologici** che permettano di classificare i prodotti fitosanitari in base al loro reale rischio verso le api. Verranno effettuate prove di laboratorio, di semi-campo e di campo, poichè gli effetti di un fitofarmaco sono la risultante di diverse variabili, tra cui particolare rilevanza assume l'ambiente. In particolare le sperimentazioni in campo saranno condotte in varie zone e in diversi periodi dell'anno per valutare l'impatto dei prodotti fitosanitari in varie situazioni agroambientali.

Verrà inoltre studiata la **dispersione delle polveri**, nella zona trattata e nella zona circostante, proveniente dalle **seminatrici pneumatiche**. Si individueranno proposte tecniche per ottenere sistemi di filtrazione dell'aria atti a ridurre, se non evitare, tale rischio. Saranno considerati i processi di concia, nell'ottica di un loro miglioramento, e i metodi di certificazione delle caratteristiche di resistenza all'abrasione delle superfici conciate dei semi. Gli studi riguarderanno anche i trattamenti fogliari, indagando sulla deriva del trattamento e sulla persistenza delle molecole in studio nei differenti comparti ambientali.

Elaborazione di **mappe di rischio** per la presenza di fitofagi ipogei nelle regioni maidicole.

Si valuterà il ruolo delle principali **patologie** parassitarie e di quelle ad esse correlate nella mortalità invernale delle famiglie: si intende pertanto quantificare il ruolo delle principali patologie dell'alveare e le interazioni fra esse, nei fenomeni di spopolamento autunnale e di mortalità invernale. L'interazione fra alcuni patogeni quale quella intercorrente tra varroa e virus e tra nosema e virus potrebbe aggravare significativamente la situazione sanitaria delle famiglie: verranno quindi studiate, in vivo e in vitro, l'importanza di tali interazioni e gli effetti prodotti sul benessere delle api adulte e della covata. Verranno studiati i **parametri micro- e macro-climatici** suscettibili di influire sullo sviluppo della varroa, i metodi per il suo contenimento, e la risposta del sistema immunitario attraverso la valutazione dell'effetto delle infezioni virali latenti e conclamate sul trascrittoma e proteoma dell'ape.

Clima: valutazione degli effetti climatici sulle famiglie di api tramite gli alveari utilizzati nelle reti di monitoraggio nazionale (Apenet), distribuite alle diverse latitudini del nostro Paese. Questi alveari saranno controllati in differenti momenti dell'anno per verificarne la consistenza, la mortalità, la presenza di patologie, la produzione di miele e vari altri parametri in relazione ai dati meteorologici.

Campi elettromagnetici: si rileverà l'intensità elettromagnetica in aree in cui in passato si sono verificati fenomeni di mortalità o spopolamento di api e, mediante apposite sperimentazioni, si valuteranno eventuali effetti sul sistema di orientamento delle api.

Stress ambientali: saranno studiati gli effetti tra l'impiego degli agrofarmaci, l'uso del territorio, le coltivazioni presenti, la disponibilità e la qualità del pascolo, la presenza di campi elettromagnetici. Le sperimentazioni verranno svolte soprattutto in ambiente aperto e, quando possibile, in laboratorio.

Interazione genotipo-ambiente: valutazione dei parametri di sviluppo delle famiglie e importanza della biodiversità genetica nella tolleranza ai parassiti.

Inquadramento del progetto negli obiettivi della programmazione del settore

Il Mipaaf riconosce nel settore Agroalimentare un “ruolo multifunzionale, fondamentale per l'attuazione e gestione di uno sviluppo sostenibile”, di fatto quindi individua questo settore come strategico per rispondere agli attuali bisogni della società. Inoltre nelle “Linee guida per la ricerca agricola” così come recentemente definite congiuntamente da

Mipaaf e Regioni, sono espressamente menzionate le “nuove tecnologie biologiche, di processo e organizzative per la valorizzazione dell’intera filiera alimentare a tutela del consumatore, delle specificità territoriali, dei livelli di reddito e occupazionali”. Il miglioramento dell’efficienza e la ottimizzazione dei processi produttivi vegetali perseguito nel rispetto degli ecosistemi, così come enunciato nella linea strategica 1.2.6 del Piano Triennale della Ricerca, trova piena applicazione nella volontà di sviluppare macchine agricole idonee a soddisfare le nuove esigenze dei processi produttivi anche in funzione della salvaguardia ambientale e della sicurezza dei lavoratori. In particolare le macchine seminatrici e l’effetto delle polveri disperse nell’attività di queste. In questo contesto l’importanza dello studio dell’azione pronuba degli Apoidei, con particolare riferimento al ruolo generalista sia in termini qualitativi che quantitativi svolto dalle api, entra a pieno titolo tra i principali fattori di successo dell’intera filiera agroalimentare sia per prodotti ‘Food’ che ‘Non-Food’. La comprensione delle complesse interazioni tra la biologia delle api e i molteplici fattori, siano essi interni o esterni all’alveare, di natura antropica ovvero ambientale, è alla base del principio della sostenibilità ambientale della produzione agricola. Sforzi e ricerche a tutela dei pronubi generalisti hanno diretto ritorno nella salvaguardia e conservazione della biodiversità vegetale di specie coltivate e non; inoltre sempre dall’azione generalista delle api, mediata dall’abilità degli apicoltori, scaturiscono effetti di valorizzazione del prodotto in quanto sul territorio italiano si è in grado di ottenere una diversificazione produttiva (oltre 20 mieli uniflorali costanti e un’ ampia varietà di mieli millefiori) per soddisfare le esigenze dei consumatori; alcuni di questi prodotti hanno peculiarità legate alla flora e al territorio di origine, dove creano un indotto occupazionale legato al commercio e al turismo gastronomico. Le segnalazioni degli anni scorsi sulle morie massive di api, apparentemente senza spiegazione, hanno portato all’attenzione pubblica una situazione che giunge all’orlo del collasso dopo aver comunque attraversato anni di stenti e sofferenze: non è comunque troppo tardi per invertire la tendenza, per comprendere ciò che è accaduto e iniziare a sviluppare nuove pratiche sperimentali necessarie prima della commercializzazione di agrofarmaci e sementi GM; capire per sviluppare sistemi innovativi di lotta e prevenzione alle patologie e ai parassiti dell’alveare, parallelamente all’ottimizzazione di tecniche diagnostiche innovative e precoci, finalizzate all’elaborazione di protocolli ufficiali di monitoraggio e di intervento, che in conclusione determinino un miglioramento qualitativo, produttivo e sanitario degli allevamenti apistici e dunque una incrementata qualità e competitività del prodotto.

Stato dell'arte generale sull'argomento del progetto

I fenomeni di mortalità o di spopolamento di famiglie di api vengono segnalati da diversi anni in numerosi Paesi, tra cui l’Italia. Più recentemente tali episodi hanno assunto aspetti particolarmente preoccupanti.

Il controllo dello spopolamento degli alveari e della mortalità delle api è in atto in diversi Paesi europei tra cui l’Italia, dove tuttavia non è ancora sufficientemente articolato. Le ricerche svolte fino ad ora nel nostro Paese hanno messo in evidenza che i fattori di rischio più probabili sono le malattie che colpiscono le famiglie di api, i trattamenti fitosanitari, le pratiche apistiche, l’andamento climatico, la drastica diminuzione dei luoghi di bottinamento, lo scarso valore nutrizionale del polline raccolto dalle api, la gestione del territorio e ancora altri possibili fattori, quali i campi elettromagnetici e le coltivazioni OGM.

Tra i fattori esterni all’alveare, sono particolarmente critici e rilevanti i trattamenti fitosanitari soprattutto quelli effettuati in primavera-estate nelle aree a coltivazione intensiva. La maggior parte delle sostanze attive utilizzate sono altamente tossiche per le api e gli effetti possono essere immediati e vistosi se le api vengono colpite e uccise direttamente, più subdoli e difficili da collegare alla causa quando si tratta, ad esempio, di prodotti usati nella concia delle sementi (es. neonicotinoidi), microincapsulati e regolatori di crescita (IGR). L’azione del principio attivo può avvenire anche a dosi subletali e provocare anomalie di comportamento delle api che possono condurre a uno spopolamento degli alveari.

Tali manifestazioni sono attenuate o aggravate da altri fenomeni non facilmente controllabili quali la disponibilità e la qualità del pascolo, la contaminazione ambientale e, soprattutto, le condizioni climatiche. Primavere calde e secche, infatti, possono favorire la presenza di varie molecole chimiche di uso agricolo sulla vegetazione visitata dalle api per raccogliere nettare, polline, melata e rugiada.

Anche in altri Paesi, europei e non, è stata documentata una rilevante scomparsa di famiglie di api denominata “sindrome del collasso della colonia” (CCD) attribuita ad una interazione fra cause ambientali e parassiti di varia natura e si cerca di conoscerne le cause mettendo in atto diversi strumenti, anche in base alle caratteristiche dell’apicoltura nei diversi Paesi.

Per quanto riguarda altri Paesi europei, in Francia, è stata disposta la sospensione cautelativa di alcuni prodotti concianti su girasole e mais, a seguito di mortalità di alveari su colture di girasole in fioritura. L’AFSSA (Agence française de sécurité sanitaire des aliments) ha quindi condotto un’indagine nel quinquennio 2002–2005, i cui dati preliminari non hanno fornito risultati risolutivi e, in ogni caso, la situazione verificatasi in Francia non è confrontabile con quanto avviene in Italia, in concomitanza delle semine di mais.

In Germania è stata avviata nel 2004 un’indagine che terminerà nel 2009. I primi risultati forniti dal Federal Bee Research Center rilevano che i fattori associati più frequentemente alle perdite delle famiglie di api sono:

- Varroasi e patogeni associati
- Nosemiasi

- Tecniche apistiche.

Tuttavia, nel maggio del 2008 nella regione del Baden-Württemberg, in Alsazia e in Baviera sono morte circa 15.000 famiglie di api, in concomitanza con le semine di mais conciato. Le analisi condotte sui campioni di api morte hanno rilevato la presenza di residui soprattutto di clothianidin e, in seguito a ciò, le autorità competenti hanno sospeso in maniera cautelativa i principali prodotti usati per la concia delle sementi. Il fenomeno è stato comunque attribuito ad un errore nelle operazioni di concia del seme, che ha determinato un'eccessiva abrasione del p.a. in fase di semina ed il suo conseguente rilascio nell'ambiente.

Situazione in Italia

In Italia, le prime segnalazioni degli apicoltori riguardo alle morie di api e agli spopolamenti degli alveari risalgono al 1999, relative principalmente al periodo primaverile-estivo e concomitanti con le pratiche agronomiche connesse alla semina del mais. Attualmente, con l'insorgere anche di mortalità invernali, si può affermare che il fenomeno riguarda 4 periodi ricorrenti dell'anno: 1) gennaio-febbraio, alla ripresa dell'attività apistica, in conseguenza di stati di orfanità e/o di insufficienza di scorte; 2) marzo-aprile, in corrispondenza delle semine primaverili di alcune colture erbacee e dei trattamenti sui fruttiferi; 3) metà giugno in corrispondenza dei trattamenti sulla vite contro *Scaphoideus titanus*, vettore della flavescenza dorata; 4) in autunno, nel periodo in cui all'elevata infestazione da parte dell'acaro *Varroa destructor*, si associa la diffusione di virus particolarmente letali, che possono anche compromettere il corretto sviluppo delle api invernali.

Uno degli elementi più significativi delle segnalazioni inviate dagli apicoltori è la corrispondenza tra gli effetti osservati e il periodo di semina del mais.

Sulla base di tali segnalazioni, nella primavera del 2001 e del 2002, il CRA – Unità di Ricerca di Apicoltura e Bachicoltura (CRA-API) in collaborazione con il Dipartimento di Biologia applicata alla Difesa delle Piante dell'Università di Udine, ha effettuato alcune sperimentazioni i cui risultati hanno dimostrato l'esistenza di una contaminazione ambientale conseguente alla semina del mais conciato con Gaucho (p.a. imidacloprid); ciò può spiegare i danni alle api segnalati durante il periodo di semina del mais. In particolare, l'accumulo della sostanza attiva sulla flora spontanea circostante i campi di mais può essere la causa dell'avvelenamento delle api, che raccolgono nettare, polline o rugiada dalle piante sulle quali si è accumulata la polvere di imidacloprid. Il contatto con quantità anche ridotte di sostanza attiva può causare alle api disturbi di comportamento e impedire il ritrovamento della via di ritorno all'alveare. Questa ipotesi spiegherebbe il verificarsi dei fenomeni segnalati dagli apicoltori soprattutto negli anni di maggiore siccità primaverile.

Nello stesso periodo sono state svolte dal CRA – API, in collaborazione con il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA) dell'Università di Bologna, alcune sperimentazioni in laboratorio e in campo, per studiare gli effetti di dosi sub-letali di imidacloprid sull'etologia delle api. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il principio attivo imidacloprid può effettivamente provocare gli effetti segnalati dagli apicoltori e cioè disorientamento, movimenti lenti e poco coordinati, difficoltà di volo.

Successivamente nella primavera del 2005 e 2006, il CRA – API, il DiSTA dell'Università di Bologna e l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie hanno svolto un'indagine sperimentale sulla mortalità e spopolamento degli alveari (nel periodo inizio marzo – fine maggio), con il contributo finanziario della Bayer Crop Science, in diverse aree, con presenza o meno di mais, delle regioni Emilia-Romagna e Veneto. L'elaborazione statistica dei dati ha evidenziato che la mortalità delle api era correlata positivamente con la presenza di mais, barbabietola e soia, mentre era correlata negativamente con gli appezzamenti di vite, la corretta gestione degli alveari e la presenza di polline con alto valore proteico.

Negli ultimi anni, fino al 2007, sono giunti al CRA-API un centinaio di questionari compilati da singoli apicoltori o dai Servizi Veterinari delle ASL. La maggior parte delle morie denunciate erano avvenute nel periodo corrispondente alle semine primaverili e i residui maggiormente riscontrati nei campioni di api morte pervenuti e analizzati presso il CRA-API appartenevano alla classe dei neonicotinoidi.

Nella primavera del 2008, a seguito delle segnalazioni di mortalità di api in concomitanza con la semina di mais, in diverse aree dell'Italia settentrionale, sono stati raccolti campioni ufficiali di api, prelevati dalle ASL. Si segnala in particolare l'iniziativa della Direzione Generale Sanità della Regione Lombardia che ha invitato gli apicoltori a segnalare casi di spopolamento e/o morie, il Dipartimento di prevenzione Veterinario dell'ASL a effettuare un sopralluogo e un campionamento di api, compilando apposito verbale/questionario e inviando i campioni all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Brescia per l'accertamento di patogeni e al CRA-Unità di ricerca di Apicoltura e Bachicoltura per l'analisi di residui di neonicotinoidi. Anche l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie ha provveduto a effettuare analoghi campionamenti nel territorio di sua competenza. Sono stati effettuati complessivamente 105 campionamenti di api (65 in Lombardia e 40 nelle Venezie, questi ultimi effettuati in due tempi successivi) e 4 di polline in Lombardia. I campioni sono stati poi sottoposti ad analisi virologica presso l'IZSLER di Brescia e ad analisi per la ricerca di residui dei principi attivi imidacloprid, thiamethoxam, clothianidin e fipronil presso il CRA-API. L'indagine condotta e i risultati ottenuti hanno consentito alcune importanti valutazioni: la concomitanza tra semina di mais ed evento segnalato, il numero di campioni di api esaminati, la loro distribuzione nel territorio, la

presenza di residui in numerosi campioni, hanno indicato che la dispersione nell'ambiente circostante dei pp.aa. presenti nelle sementi di mais conciate, durante le operazioni di semina, ha causato la morte delle api venute a contatto con tali sostanze.

Successivamente, il Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali ha emesso un decreto di sospensione cautelativa dei principi attivi usati nella concia delle sementi (clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid e fipronil) da soli o in miscela con altre sostanze attive (Decreto del Ministero del lavoro, della salute e delle politiche sociali del 17 settembre 2008).

Obiettivi generali e specifici (intermedi e finali) (max. 3 pagine)

L'**obiettivo generale** del progetto è quello di valutare l'efficacia delle disposizioni assunte dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali mediante il citato Decreto sulla attività apistica produttiva italiana nei prossimi anni, a partire dalla stagione attiva 2009, facendo affidamento sulle competenze presenti entro il C.R.A., sia nel settore specifico che in settori che fanno capo ad altri Dipartimenti, riunendo così competenze diverse e complementari. A queste sono state affiancate strutture di Ricerca universitarie e del Ministero della Salute, per comporre un quadro completo di competenze.

Si è quindi creato un gruppo di ricercatori in grado di organizzare un progetto che prende in considerazione i diversi aspetti strategici suscettibili di influire in una misura o nell'altra sull'attività apistica per fornire strumenti scientifici e operativi oggettivi che possano concorrere alla salvaguardia e alla tutela dell'apicoltura e delle produzioni derivate.

Gli **obiettivi specifici** sono molteplici, riferiti ai diversi campi di attività che verranno indagati.

In maggior dettaglio sono i seguenti.

Monitoraggio sul territorio: è evidente la necessità di mettere in atto delle misure in grado di fornire risposte alle problematiche evidenziate. Fondamentale e urgente è la creazione di una rete di monitoraggio nazionale, la cui struttura dovrà corrispondere a requisiti ben chiari e specifici, con l'obiettivo di attivare un meccanismo che, partendo dal territorio attraverso una serie di azioni predefinite porti a chiarire la causa di eventuali danni alle api.

Interventi sulle seminatrici e sulla concia delle sementi: verranno sperimentati diversi sistemi di interventi tecnici sia sulle modalità di concia delle sementi che sulle macchine seminatrici con il preciso obiettivo di tendere alla eliminazione della dispersione di polveri che avviene durante le operazioni di semina a salvaguardia delle api e di tutta l'entomofauna utile presente nel territorio, degli operatori e dell'ambiente in generale.

Verranno applicati dei protocolli idonei alla valutazione degli **effetti verso le api degli agrofarmaci** di maggior diffusione a diverse dosi e in diverse condizioni. L'obiettivo è quello di classificare i prodotti in base alla pericolosità verso le api e di valutare le modalità secondo cui i diversi principi attivi possono esplicare un'azione tossica studiando gli effetti letali e subletali degli agrofarmaci di nuova generazione (neonicotinoidi, IGR, microincapsulati) sulle api adulte e sulle larve in relazione alla combinazione sinergica con diversi fattori: età dell'ape, temperatura di allevamento della covata, intossicazione subletale delle larve, stato nutrizionale dell'adulto, temperatura di esposizione all'agrofarmaco, stato sanitario dell'alveare.

Importanti obiettivi si pone l'attività che vede l'approfondimento delle problematiche collegate alle **patologie delle api**, in particolare l'individuazione dei fattori coinvolti nella sindrome del collasso della colonia, ovvero dei parassiti e patogeni presenti negli apiari interessati da morie, la messa a punto di adeguati metodi per la diagnostica e la manipolazione di patogeni, lo studio della risposta immunitaria di *A. mellifera* ad infezioni virali e di altri patogeni e la verifica dell'effetto di agenti di stress biotico e abiotico sulla risposta dell'ape agli agenti patogeni considerati del ruolo di *V. destructor* nella trasmissione dei patogeni.

Piano di attività

Descrizione delle attività previste suddivise per linee di ricerca o attività

Linea di ricerca: Monitoraggio

Per la creazione della rete di monitoraggio, in ogni regione del territorio nazionale o in aree omogenee dal punto di vista ambientale e dell'uso del territorio, e nelle aree naturali protette, in collaborazione con le Associazioni degli Apicoltori e gli Enti locali e di Ricerca interessati, verranno scelte altrettante zone dove collocare un modulo di rilevamento. Ogni modulo sarà costituito di base da cinque apiari, composti da 10 alveari ciascuno, collocati a una distanza di circa 50 km l'uno dall'altro e da un centro di coordinamento. Tale disposizione potrà essere variata in base alle esigenze specifiche e alle peculiarità territoriali.

Periodicamente (4 volte all'anno: dopo l'inverno; in primavera; durante l'estate; prima dell'inverno) gli alveari di ogni postazione dovranno essere accuratamente controllati dal responsabile del modulo. In particolare saranno rilevati tutti i dati relativi allo stato sanitario, allo stato nutrizionale (abbondanza di polline e miele) e allo stato della famiglia (numero di api e di covata, età della regina, ecc.). Gli operatori, per la raccolta dei dati, disporranno di appositi moduli.

Successivamente, i rilievi effettuati vengono inseriti in un sito web, appositamente predisposto, al fine di conoscere in tempo reale lo stato degli alveari sotto osservazione. Inoltre, durante i controlli, saranno prelevati campioni di varie matrici apistiche (api morte, api vive, covata, miele, cera, polline) da sottoporre alle analisi di laboratorio (chimiche, patologiche, palinologiche).

Gli alveari che costituiscono le varie postazioni dovranno essere gestiti, dal punto di vista del sostentamento nutrizionale e della difesa dalle malattie, come abitualmente vengono condotti gli altri alveari della zona. L'unica limitazione che si chiederà all'apicoltore incaricato di gestire il modulo di rilevamento, è che i dieci alveari scelti nell'apiario siano stanziali.

Oltre alle quattro ispezioni annuali convenute, gli alveari dovranno essere normalmente controllati dall'apicoltore al fine di evidenziare eventuali anomalie nel comportamento, nello sviluppo della popolazione apistica, nei livelli di mortalità, o per l'insorgenza di malattie. In questi casi, anche se l'evento si verifica nei periodi compresi fra i quattro controlli previsti, dovrà essere immediatamente segnalato tramite le vie che verranno concordate.

Linea di ricerca: Api e agrofarmaci

La linea di ricerca prevede le seguenti attività:

1. Valutazione dell'utilità produttiva ed agronomica dei preparati per la concia delle sementi di mais. Semina di un campo sperimentale parcellare (30 ibridi commerciali tra i più diffusi), presso l'Azienda sperimentale CRA-MAC, ed allestimento di Prove Agronomiche nell'ambito della Rete Varietale e di Prove "strip-test-Sperimentazione ON FARM"- nell'ambiente italiano (Lombardia, Veneto, Piemonte, Emilia Romagna, Friuli), mettendo a confronto per ciascun ibrido commerciale, sementi conciate e non conciate. Si prevedono rilievi delle rese produttive, caratteristiche agronomiche e rilievi e fitopatologici.

2. Valutazione della persistenza del principio attivo conciante a vari stadi di sviluppo della pianta di mais. Si prevede l'analisi del residuo dei principi attivi della concia, in diversi tessuti (radici, fusto, foglie, infiorescenze maschile e femminile) a diversi stadi di sviluppo di piante germinate da cariossidi trattate con diverse dosi di insetticida in allevamenti parcellari o in ambiente controllato.

3. Valutazione degli effetti sub-letali nei confronti delle api degli agrofarmaci di impiego più diffuso, in particolare tra le categorie degli IGR, dei neonicotinoidi e dei microincapsulati, mediante l'utilizzo di test etologici di laboratorio, semicampo e campo. Le prove di laboratorio prevedono il PER test (Proboscis Extension Reflex) per valutare la capacità associativa dell'ape adulta in seguito alla somministrazione di un principio attivo, e il test del labirinto (*maze test*) per valutare eventuali effetti dei prodotti sulle capacità di orientamento e sulla memoria delle api. Le prove di semicampo, specifiche per lo studio degli effetti di prodotti usati nella concia dei semi o trattamenti nel suolo, verranno effettuate all'interno di tunnel della dimensione di circa 140 m², e saranno valutati mortalità giornaliera, attività di bottinamento e comportamento delle bottinatrici. Le prove di campo saranno finalizzate ad individuare anomalie comportamentali, quali disorientamento e incapacità di ritorno all'alveare delle api.

4. Elaborazione di mappe di rischio per la presenza di fitofagi ipogei (mais). I rilievi di campo, con specifiche trappole e altri eventuali metodi di campionamento integrativi per i fitofagi, nelle regioni maidicole (Friuli, Veneto, Lombardia, Piemonte, Trentino, Emilia-Romagna e Toscana) e la successiva elaborazione dei dati, avranno una durata di almeno due anni. La rete di campionamento sarà dimensionata rispetto a diversi fattori (estensione coltivazione mais, caratteristiche e conduzione agronomica, ecc.) e comporterà un numero minimo di 80 punti per regione ed un massimo di 150. Le postazioni andranno controllate una o due volte al mese da aprile a settembre. Tale strumento servirà ad utilizzare il seme conciato solo nei casi in cui vi siano fattori di rischio o dove si riscontrino elevate infestazioni.

5. Valutazione della contaminazione dovuta alle guttazioni. Parcelle sperimentali di mais saranno seminate sia mediante seminatrici pneumatiche e impiegando seme conciato, sia mediante seminatrici tradizionali e utilizzando i più comuni geodisinfestanti. Le gocce d'acqua raccolte in campo saranno sottoposte ad analisi chimica per quantificare la presenza di insetticidi e inoltre offerte alle api bottinatrici in semplici test di laboratorio, per verificarne la tossicità. Saranno inoltre studiate le condizioni per cui le api bottinatrici tendono a suggerire le gocce d'acqua presenti sulla vegetazione, mediante l'introduzione di apiari sperimentali nelle parcelle sperimentali e la quantificazione delle visite delle api sui seminativi e in particolare il loro interesse verso l'acqua libera sulla vegetazione. Verranno infine analizzate le condizioni ambientali e meteorologiche che possono influenzare le visite delle api ai seminativi, tenendo conto anche degli anticipi delle semine verificatesi negli ultimi anni, con la conseguente assenza di fioriture in corrispondenza delle semine stesse.

Linea di ricerca: Api e dispersione delle polveri di seme di mais conciato

Sono previste le seguenti attività:

1. Determinazione della predisposizione del seme a produrre polveri da abrasione - Sarà elaborata una metodologia di prova e saranno definiti idonei attrezzature e strumenti di prova in base ai quali sarà possibile saggiare la qualità del seme dal punto di vista della produzione di polveri da abrasione, indicando di conseguenza anche il livello di qualità del processo di concia.
2. Determinazione della quantità di p.a. immesso in ambiente nel corso della semina da una generica seminatrice di precisione. La quantità di prodotto complessivamente dispersa da una macchina, riferita all'unità di superficie, potrà essere messa in relazione all'entità degli eventuali danni osservati a carico di alveari., anche in conseguenza della contaminazione delle zone circostanti, sia per quel che riguarda le piante spontanee e le eventuali coltivazioni, come anche suoli ed acqua. Sarà messa punto una metodologia di prova che, attraverso idonei strumenti e attrezzature, consenta di effettuare prove obiettive delle macchine seminatrici stabilendo la quantità di polveri da abrasione e di p.a. disperse in ambiente in relazione al tipo di seme utilizzato e valutato secondo i criteri di cui al punto precedente.
3. Determinazione della deriva cui sono soggette le polveri espulse dalle seminatrici nel corso della semina. Sarà elaborata una metodologia di prova che, attraverso idonei strumenti e attrezzature, consenta di effettuare prove obiettive che descrivano il fenomeno di deriva delle polveri nella zona circostante al campo di semina e di correlare i risultati con i danni eventualmente osservati a carico di alveari, anche in conseguenza della contaminazione delle zone circostanti, sia per quel che riguarda le piante spontanee e le eventuali coltivazioni, come anche suoli ed acqua.
4. Individuazione e valutazione (secondo i criteri stabiliti per i punti precedenti) di modifiche da apportare alle seminatrici allo scopo di abbattere la quantità di polveri da abrasione dispersa in ambiente e/o la frazione di esse soggetta a deriva. E' auspicabile che tali modifiche consentano di diminuire la quantità totale di polvere (e p.a.) espulsa, piuttosto che favorirne la localizzazione nella zona di semina, dove, data la persistenza nel terreno, potrebbero aversi fenomeni di assorbimento e accumulo da parte del mais stesso o di eventuale altra coltura concia, o posta in successione.

Linea di ricerca: Api e patologie

La linea di ricerca si pone i seguenti obiettivi:

1. Individuazione dei parassiti e patogeni presenti negli apiari interessati da morie. Allo scopo si adotterà un approccio metagenomico finalizzato al sequenziamento di tutto l'RNA estraibile da campioni di api; la sottrazione delle sequenze riconducibili all'ape permetterà di individuare tutti i possibili patogeni presenti nei campioni analizzati. In seguito l'identità dei patogeni sarà confermata mediante tecniche standard (PCR). Per stimare l'importanza dei patogeni che verranno individuati si adotterà una duplice strategia: da un lato si analizzeranno campioni di api provenienti da un congruo numero apiari interessati da fenomeni di collasso delle colonie per individuare i parassiti e i patogeni presenti negli stessi; di converso, si eseguiranno analisi ripetute nel tempo, fino all'insorgenza di fenomeni di collasso, di campioni di api provenienti dal medesimo apiario onde verificare eventuali variazioni temporali della prevalenza di uno o più patogeni che possano essere correlate con il collasso della famiglia.
2. Messa a punto di adeguati metodi per la diagnostica e la manipolazione di patogeni, mediante la revisione delle tecniche diagnostiche per la determinazione della presenza di virus ed altri patogeni in campioni di api. Verranno altresì messi a punto metodi affidabili per l'infezione di api in condizioni controllate con protozoi, batteri e virus.
3. Studio della risposta immunitaria di *A. mellifera* ad infezioni virali e di altri patogeni, attraverso l'individuazione dei geni dell'ape coinvolti nella risposta immunitaria e modulati durante la transizione dallo stato di infezione virale latente a quello di malattia conclamata. Tali conoscenze consentiranno di fare chiarezza sui meccanismi molecolari che consentono all'ape di tenere sotto controllo le comunissime infezioni latenti e di individuare i cambiamenti che questo meccanismo di regolazione subisce allorquando la malattia si manifesta. L'approccio sperimentale prevede l'uso di tecniche per l'analisi trascrittomiche, quali mRNA-Seq o DNA microarrays, e proteomica (LCMSMS), accoppiato ad analisi di specifici geni immunitari attraverso un approccio di real-time PCR. A tali osservazioni molecolari, si affiancheranno osservazioni fisiologiche, miranti a caratterizzare i principali parametri della risposta immunitaria umorale e quella cellulo-mediata. Si prevede di utilizzare il DWV come sistema sperimentale modello, per quanto concerne le infezioni virali. Relativamente alle infezioni da altri agenti patogeni, indagini analoghe potranno essere svolte sul patogeno più frequentemente presente nei campioni analizzati nell'ambito dell'attività 1.
4. Verifica dell'effetto di agenti di stress biotici e abiotici sulla risposta immunitaria dell'ape. Scopo di questa attività è quello di valutare se e come agenti di stress biotico (*V. destructor*) e abiotico (alimentazione non idonea e dosi sub-letali di neonicotinoidi) influenzano le interazioni fra ape e patogeno, modulando geni-chiave coinvolti nei meccanismi di risposta immunitaria. L'attività prevede di preparare campioni di api, allevate in ambiente controllato, sottoposte a diversi agenti di stress biotico e abiotico. Relativamente a *V. destructor*, si tenterà anche di identificare i fattori che

inducono una risposta di immunosoppressione e/o di eventuale immunomodulazione. Allo scopo verranno effettuati saggi per indagare l'effetto dei seguenti fattori sulla risposta immunitaria dell'ape: saliva di *V. destructor*, lesioni, microrganismi associati a *V. destructor* o presenti all'interno dell'alveare. A seconda del risultato ottenuto si effettueranno ulteriori studi per una caratterizzazione accurata del fattore in oggetto.

5. Studio degli effetti dei patogeni su fisiologia e comportamento delle api. Per meglio comprendere le conseguenze determinate dai patogeni sulle colonie d'api, si indagheranno gli effetti dei patogeni sulla fisiologia ed il comportamento delle stesse. Allo scopo verranno prese in considerazione api sane e api infettate con i metodi di cui all'obiettivo 2 e si eseguiranno analisi finalizzate all'ottenimento di dati inerenti i principali parametri fisiologici. Sulle stesse api verranno anche eseguiti idonei saggi biologici per studiare eventuali ripercussioni sul comportamento con particolare riferimento alle attività essenziali per la vita della colonia e a quelle eventualmente coinvolte nella trasmissione orizzontale dei patogeni (accudimento della covata, trofallassi, ecc.).

Linea di ricerca: Api e fattori ambientali

La linea di ricerca prevede le seguenti attività:

1. Studio di parametri indicatori del benessere delle api in condizioni ottimali e di stress: i fattori implicati saranno le variazioni micro-climatiche, i fattori nutrizionali, le interazioni fra alcuni patogeni quali varroa-virus e nosema-virus, responsabili di effetti sinergici. In vivo, verrà valutato l'impatto di diversi metodi di gestione delle colonie sulle variazioni interne dei parametri microclimatici, e l'influenza di tali variazioni sullo sviluppo dei patogeni nelle colonie. Per le prove in vitro saranno utilizzate tecniche d'infezione artificiale su api ottenute da apiari con livelli estremi d'infestazione, appositamente predisposti, seguite da misurazioni di parametri quali longevità, livelli d'infezione, titolo di ormoni, di proteine ed emociti nell'emolinfa. Si utilizzeranno anche i dati storici in relazione a precedenti rilevamenti effettuati in collaborazione con alcune associazioni di produttori apistici ed i dati ricavabili dalla rete di monitoraggio.

2. Effetti dei trattamenti acaricidi sui parametri fisiologici e biochimici delle api autunnali: le sostanze acaricide (naturali e/o di sintesi) introdotte negli alveari per la lotta contro la varroa, comportano cambiamenti nelle strategie di sviluppo della famiglia, soprattutto se prolungati nel tempo e possono influire sul corretto sviluppo e sul "benessere" delle api operaie.

3. Valutazione delle interazioni genotipo-ambiente: ci si avvarrà di una rete di monitoraggio, eventualmente costituita con degli apiari ad hoc in cui distribuire regine con genotipo noto, provenienti da diverse zone climatiche d'Italia. Verranno quindi confrontati i parametri di sviluppo e vitalità delle colonie nei diversi ambienti, congiuntamente alle condizioni sanitarie (livelli d'infestazione e infezione) e correlati ai fattori ambientali. I risultati forniranno indicazioni sull'importanza della biodiversità genetica nella capacità di adattamento agli stress ambientali, ed i genotipi potranno essere analizzati e confrontati anche mediante strumenti d'indagine molecolare. Si studieranno le strategie delle colonie nell'adattamento ai cambiamenti climatici in atto, ovvero sulle capacità di reazione della colonia ad andamenti climatici diversi od estremi (prolungati periodi di siccità, inverni caldi in cui non c'è interruzione di covata ecc) dall'osservazione e analisi della sottospecie autoctona siciliana, *A. m. sicula*, e tramite confronti in loco con la sottospecie commercialmente utilizzata *A. m. ligustica*, anche in termini di capacità di reazione ai principali patogeni.

4. Studio dell'eventuale impatto dell'esposizione ai campi elettromagnetici sul manifestarsi di comportamenti anomali o altre sindromi nelle popolazioni di api. A tale scopo si individuerà un'area interessata dalla presenza di numerose sorgenti di campi elettromagnetici (elettrodotti, stazioni di diffusione radiotelevisiva, stazioni radio base per la telefonia cellulare) censite nei catasti elettromagnetici regionali e si acquisiranno i dati relativi agli alveari presenti nell'area interessata. Si definiranno quindi degli indici che permettano di esprimere sinteticamente il livello di esposizione allo scopo di studiare l'eventuale correlazione con gli indicatori dello stato di salute degli alveari.

Linea di ricerca: Interazione di più fattori

Con questa linea di ricerca si intendono studiare i possibili effetti negativi di più fattori che agiscono in modo sinergico sulla colonia d'api. Si prevedono le seguenti attività:

a) Studio degli effetti letali e subletali di agrofarmaci sulle api adulte e sulle larve sviluppate in laboratorio a diverse condizioni termiche. Si utilizzerà il metodo di allevamento in vitro della covata messo a punto da Aupinel *et al.* (2005) sottoponendo le larve a due regimi termici: ottimale e subottimale. Successivamente, gli adulti sviluppatasi verranno sottoposti ai test di tossicità acuta (prova a1), di longevità (prova a2), di orientamento con il metodo del labirinto in laboratorio (prova a3) e di apprendimento con il metodo del PER (prova a4). Le api risultanti da tutte le prove verranno anche analizzate dal punto di vista morfologico allo scopo di verificare l'influenza delle condizioni di sviluppo sull'eventuale comparsa di malformazioni e sulle variazioni di alcuni parametri fisiologici.

- b) Studio degli effetti tossici di agrofarmaci sulle api adulte di età diverse esposte a differenti condizioni termiche. Verrà studiata la risposta, in termini di mortalità, delle api adulte di diversa età (neofarfallate, di casa e bottinatrici) alla somministrazione di alcuni pesticidi, in relazione della temperatura di svolgimento del saggio.
- c) Studi degli effetti letali e subletali di agrofarmaci sulle api adulte sottoposte a diversi regimi alimentari. Le api verranno fatte sfarfallare in laboratorio, dove verranno subito sottoposte a diversi regimi alimentari (polline monoculturale con basso valore nutritivo e mix di pollini con alti valori nutritivi). Dopo un periodo di allevamento verrà valutata la loro risposta alla somministrazione di un agrofarmaco. Si intende valutare tale risposta sia in termini degli effetti letali che quelli subletali come descritto nel punto a).
- d) Studio degli effetti degli agrofarmaci sullo sviluppo della colonia di api in relazione al sue condizioni di forza e al suo stato sanitario. Si porrà particolare attenzione alle patologie infettive della covata che verranno valutate sia a livello clinico che subclinico. Le api provenienti dalle colonie sperimentali caratterizzate da diverso stato sanitario saranno sottoposte ai test degli effetti tossici di alcuni pesticidi.
- e) Studio dell'interazione tra effetto tossicologico di agrofarmaci e infezioni della covata; rapidità e intensità di sviluppo dell'infezione in dipendenza dell'agrofarmaco; effetto dell'agrofarmaco in dipendenza del livello infettivo. Alle larve, allevate in laboratorio secondo il protocollo di Aupinel *et al.* (2005), verrà somministrato un agrofarmaco a livello subletale. Successivamente verrà valutata la risposta delle larve stesse all'inoculazione di patogeni della covata, in particolare i batteri agenti eziologici della peste americana e della peste europea. Questa risposta sarà valutata attraverso il rilevamento di mortalità preimmaginabile e attraverso i metodi di biologia molecolare (PCR real time) con l'obiettivo di valutare i diversi livelli di evoluzione delle infezioni da sub-clinico a clinico. Parallelamente, applicando le medesime metodiche, verranno condotte prove per valutare l'effetto tossico dell'agrofarmaco (tempi e livelli di mortalità delle larve) somministrato a larve caratterizzate da diversi livelli di infezione.
- f) Studio in campo delle interazioni ambientali attraverso una squadra di rilevamento. A seguito di segnalazioni di gravi morie di api, una squadra di esperti si recherà sul luogo dell'apicidio per rilevare tutti i dati ambientali e relativi allo stato sanitario degli alveari. In particolare, oltre ad effettuare foto e filmati degli apiari colpiti e dell'area di studio, dovranno essere eseguiti controlli sull'alveare (numero di api adulte, estensione della covata, scorte, età della regina, presenza di fuchi, attività di volo, presenza di varroa, sintomi di peste americana ed europea, sintomi evidenti di altre patologie, comportamenti anomali, ecc.) e rilievi ambientali (tipo di zona, destinazione d'uso del territorio, principali coltivazioni dell'area e dati meteorologici).

Tavolo di incontro e di confronto per l'individuazione dei problemi e la progettazione di strategie di intervento

In considerazione della peculiarità del settore e della gravità del momento che sta attraversando l'apicoltura, aspetti questi che, per certi versi, sono alla base del progetto stesso di ricerca, si ravvisa l'esigenza di creare, nell'ambito del coordinamento del progetto, un tavolo di incontro e di confronto, per così dire trasversale alle diverse schede e attività di progetto. Tale tavolo sarà costituito dai responsabili partecipanti al progetto, da rappresentanti del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e da rappresentanti delle Associazioni Apicoltori individuate in accordo con il MiPAAF, in particolare FAI e UNAAPI. A queste ultime si chiederà di rappresentare la situazione e le esigenze di volta in volta provenienti dal campo per mettere a fuoco alcune priorità e modalità di intervento, mentre i responsabili di ricerca si avvarranno del tavolo per informare con periodicità circa gli sviluppi dell'attività svolta. Si prevede anche di organizzare uno o più incontri con referenti europei, sia per quanto attiene il piano operativo che di ricerca, per confrontare la situazione dei diversi Paesi vicini e le diverse strategie messe in atto. In campo sanitario questo confronto sarà utile anche per valutare l'opportunità di sperimentare nei nostri territori prodotti utilizzati con successo negli altri Paesi.

In particolare, coerentemente con gli obiettivi del progetto, le Associazioni Apicoltori dovranno individuare e segnalare quelle che, dal loro punto di osservazione, costituiscono le emergenze del settore per quanto riguarda la salute delle api. Questi dati serviranno innanzitutto per individuare idonei strumenti di analisi per esplorare metodicamente su scale locale e nazionale tali problemi salienti. Per questa fase di indagine ci si avvarrà oltre che della collaborazione delle Associazioni, anche della rete di monitoraggio che costituisce parte integrante di questo progetto. Non si esclude inoltre la possibilità di eseguire prove di campo atte a meglio delineare alcuni aspetti.

In particolare, si può già prevedere che verosimilmente costituiranno oggetto di indagine i seguenti punti.

- 1) Efficacia dei prodotti correntemente usati per la lotta contro la Varroa anche in rapporto a eventuali fenomeni di resistenza.*
- 2) Interesse e fattibilità di ulteriori metodi di lotta che possano servire da complemento ai metodi di cui sopra.*
- 3) Efficacia delle tecniche per il controllo di ulteriori avversità anche tenuto conto di eventuali effetti sinergici.*
- 4) Importanza della disponibilità di adeguate risorse di nettare e polline o, in alternativa, di fonti alimentari supplementari, per una buona salute delle api.*

5) *Importanza dei fattori genetici ovvero delle particolari caratteristiche di determinati ceppi d'ape (dinamiche di popolazione, capacità di rimozione della covata non sana, ecc.) che possano essere proficuamente impiegate per mitigare gli effetti negativi di mutamenti climatici, avversità biotiche, ecc.;*

I dati così raccolti, insieme ai risultati delle ricerche svolte nell'ambito del progetto, verranno impiegati per progettare adeguate strategie di lotta e più in generale per l'organizzazione razionale delle pratiche apistiche annuali. Tali risultanze, messe a disposizione delle Associazioni Apicoltori, potranno essere così divulgate tra i soci onde ottenere la massima diffusione ed efficacia.

Sia per la fase di indagine che per la progettazione di adeguate strategie si farà riferimento alla figura di alcuni tecnici apistici di indubbia capacità ed esperienza, che rappresentino una sorta di interfaccia tra progetto e apicoltura pratica e viceversa.

Articolazione temporale delle attività del progetto con esplicitazione dei risultati intermedi previsti

PRIMO ANNO

Linea di ricerca: Monitoraggio

Installazione delle stazioni di monitoraggio, contatti con le istituzioni locali, creazione della rete, avvio della piattaforma informatica per il rilevamento dei risultati.

Linea di ricerca: Api e agrofarmaci

- Scelta delle sostanze attive da sottoporre a studio in collaborazione con i Servizi Fitosanitari.
- Messa a punto dei saggi etologici attraverso prove preliminari ed attuazione degli stessi (PER test, Maze test).
- Allestimento delle sperimentazioni di campo e semicampo.
- Creazione della rete di campionamento degli insetti ipogei nelle aree maidicole, dimensionata, rispetto a diversi fattori, con un numero minimo di 80 punti per regione ed un massimo di 150, e prelievo dei campioni.
- Allestimento di campi sperimentali in diverse località nel Nord Italia. Saranno svolte in pieno campo osservazioni agronomiche (ad es. germinabilità, danni al seme, investimento, raccolte) e fitopatologiche (ad es. insetti, virosi) su piante di mais derivanti da semi concianti con vari principi attivi insetticidi e non.
- Campionamento di materiali concianti con diverse dosi dei vari principi attivi insetticidi in ambiente controllato (fitotroni, serra) ed analisi del residuo della concia, in diversi tessuti (radici, fusto, foglie, infiorescenze maschili e femminile) a diversi stadi di sviluppo.

Linea di ricerca: Api e dispersione delle polveri di seme di mais conciato

- Esecuzione di prove e individuazione delle procedure più idonee, tenendo conto di normative nazionali e internazionali, finalizzate a valutare la tendenza del seme conciato a formare polveri da abrasione. Messa a punto di una metodologia di prova e realizzazione del relativo banco prova e della relativa procedura analitica sui campioni di polvere raccolti.
- Esecuzione di prove con diversi modelli di seminatrici e con seme sottoposto a diversi tipi di concia, per la determinazione della quantità totale di materiale espulso dalle macchine. Sviluppo di una metodologia di prova e del relativo banco prova e della procedura analitica, allo scopo di effettuare la valutazione comparativa delle macchine.
- Esecuzione di prove in campo per lo studio della deriva delle polveri emesse dalle seminatrici. Individuazione dei metodi di campionamento (captazione delle polveri) più idonei a descrivere la distribuzione del p.a. nella zona circostante al campo di semina. Determinazione delle relative procedure analitiche.
- Applicazione alle seminatrici di modifiche sviluppate dalla U.O. e in collaborazione con i costruttori di macchine; valutazione delle modifiche proposte dalle diverse figure interessate al problema.
- Indagine nei suoli sulla persistenza delle sostanze attive oggetto di studio in conseguenza della immissione direttamente nei suoli delle polveri durante la semina con macchine modificate. Inoltre, in relazione ai punti precedenti, verrà studiata la possibile contaminazione dei differenti comparti, suolo, aria, acqua, vegetali spontanei e coltivati, con particolare riferimento anche al polline ed al nettare, nelle prossime adiacenze della zona di semina. Verranno effettuate anche osservazioni sulla frequenza delle visite da parte delle api sulla vegetazione attigua alla prova.

Linea di ricerca: Api e patologie

1. Analisi metagenomica di campioni prelevati in tempi diversi
2. Revisione metodi diagnostici

3. Studio della risposta immunitaria di *A. mellifera* ad infezioni virali e di altri patogeni
4. Confronto di campioni sani e infetti
5. Studio degli effetti dei patogeni su fisiologia e comportamento delle api

Linea di ricerca: Api e fattori ambientali

1. Gli apiari sperimentali verranno allestiti a partire dalla primavera del primo anno in zone consone al tipo di infestazione richiesto. I parametri micro e macro climatici saranno rilevati per l'intera durata del progetto, in tutte le stagioni. I parametri di sviluppo saranno misurati durante le stagioni produttive, mentre i livelli d'infestazione dei parassiti saranno rilevati in specifici momenti idonei a valutare le dinamiche di sviluppo ospite-parassita. Durante la stagione estiva ed autunnale verranno prelevate le api necessarie alle prove in vitro.
2. Nel primo anno si procederà alla messa a punto della preparazione del campione, dell'elettroforesi bidimensionale e della colorazione delle proteine separate al fine di realizzare dei gel riproducibili. Si procederà poi alla quantificazione delle proteine dei campioni provenienti dalle altre Unità di ricerca mediante metodo Bradford. Esecuzione dell'elettroforesi bidimensionale, per un totale di 4 gel per settimana.
3. Nella primavera del primo anno, di concerto con il coordinamento per il monitoraggio del territorio nazionale, si individueranno degli apiari in zone con caratteristiche climatiche differenti. Nel corso dell'estate verranno inseriti in tali apiari le regine di origine nota. Durante la primavera del primo anno si allestiranno inoltre degli apiari test per l'osservazione in loco delle caratteristiche comportamentali della sottospecie autoctona siciliana, che saranno rilevate a partire dall'estate autunno e per tutto l'anno successivo, quando saranno previste le indagini molecolari.
4. Nel primo anno verranno definite le specifiche per le strutture dati e per le applicazioni software necessarie allo studio. Contemporaneamente verranno raccolti i dati sugli alveari e stabiliti gli indici di esposizione ai campi elettromagnetici.

Linea di ricerca: interazione di più fattori

- I trimestre: Acquisto materiale sperimentale, preparazione degli alveari sperimentali, ricerca bibliografica;
- II e III trimestre: Svolgimento delle prove: a1), a2), b), d), prove preliminari a4), acquisto e collaudo del materiale necessario per lo svolgimento della prova a3) (labirinto) e calibrazione dei parametri di utilizzo;
- IV trimestre: elaborazione dei risultati e perfezionamento dei protocolli sperimentali in seguito ai risultati delle prove preliminari svolte

SECONDO ANNO

Linea di ricerca: Monitoraggio

Ulteriore messa a punto della rete di monitoraggio ed elaborazione finale dei risultati.

Linea di ricerca: Api e agrofarmaci

- Scelta delle sostanze attive da valutare nel secondo anno in collaborazione con i Servizi Fitosanitari.
- Proseguimento dei saggi etologici PER test e Maze test.
- Proseguimento delle sperimentazioni di campo e semicampo.
- Campionamento degli insetti ipogei nei punti individuati nelle aree maidicole.
- Allestimento di campi sperimentali (anche in base alle indicazioni ottenute dalle prove condotte nel 1° anno di attività) in diverse località nel Nord Italia con osservazioni agronomiche in pieno campo (ad es. germinabilità, danni al seme, investimento, raccolte) e fitopatologiche (ad es. insetti, virosi) su piante di mais derivanti da semi concitati con vari principi attivi insetticidi e non.
- Campionamento di parti vegetative della pianta di mais a diversi stadi fenologici per l'analisi del residuo dei principi attivi.
- Approfondimento riguardo al rapporto dose/residuo principio attivo utilizzato per la concia. Replica della semina di materiali sperimentali risultati di interesse.

Linea di ricerca: Api e dispersione delle polveri di seme di mais conciato

- Messa a punto della una metodologia per lo studio obiettivo della deriva delle polveri emesse dalle seminatrici (in condizioni ripetibili e confrontabili) e realizzazione del relativo banco prova (a completamento di quanto iniziato nel primo anno);
- Prosecuzione dell'attività sulla deriva: sviluppo di un sistema per lo studio della deriva delle polveri emesse dalle seminatrici in condizioni controllabili e ripetibili (prove a punto fisso). Messa a punto della metodologia di prova e del relativo banco prova e della procedura di captazione e analisi delle polveri campionate.
- Applicazione alle seminatrici di modifiche sviluppate dalla U.O. e valutazione delle modifiche proposte dalle diverse figure interessate al problema.
- Elaborazione di un protocollo di prova per la certificazione delle seminatrici riguardo alla qualità delle emissioni in ambiente.
- Prosecuzione delle indagini effettuate il primo anno relative alla persistenza nei vari comparti anche in relazione ad eventuali condizioni climatiche differenti. Verrà inoltre studiato il possibile accumulo di sostanze attive all'interno dell'alveare, in particolare nel polline, accumulo conseguente ad una possibile contaminazione sub-letale delle api.
- Effettuazione di studi etologici e produttivi su apiari dei quali si possiede una serie storica, esposti artificialmente ai trattamenti individuati come ottimali

Linea di ricerca: Api e patologie

1. Analisi metagenomica di campioni prelevati in diversi apiari
2. Messa a punto di metodi di infezione
3. Studio della risposta immunitaria di *A. mellifera* ad infezioni virali e di altri patogeni
4. Confronto di campioni sani e infetti e studio fattori che inducono immunosoppressione
5. Studio degli effetti dei patogeni su fisiologia e comportamento delle api

Linea di ricerca: Api e fattori ambientali

1. Rilevamento dei parametri micro e macro climatici, dei parametri di sviluppo e dei livelli d'infestazione dei parassiti. Prelievi di api per le prove in vitro.
2. Identificazione mediante spettrometria di massa e degradazione di Edman delle proteine ritenute interessanti relativamente alla provenienza o al tipo di trattamento subito della gelatina reale e dalle api verrà svolta al secondo anno.
3. Valutazioni delle colonie e analisi risultanti.
4. Sviluppo e applicazione delle metodiche per la determinazione degli indici di esposizione nelle posizioni occupate dagli alveari coinvolti nello studio. Raffronto tra gli indicatori dello stato di salute e gli indici di esposizione ai campi elettromagnetici per gli alveari coinvolti.

Linea di ricerca: interazione di più fattori

- I e II trimestre: Svolgimento delle prove: a4), prova preliminare a3), prova preliminare c), prova preliminare e)
- III trimestre: Svolgimento delle prove: a3), c), e)
- IV trimestre: elaborazione dei risultati di tutte le linee di ricerca, preparazione delle pubblicazioni e del resoconto finale
- durante tutto il periodo di svolgimento della ricerca: attività di cui al punto f)

Elenco delle Unità Operative (UO) partecipanti e di eventuali collaborazioni esterne

Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura - Unità di Ricerca di Apicoltura e Bachicoltura (**CRA-API**)

Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura – Unità di Ricerca per l'Ingegneria Agraria (**CRA-ING**)

Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura – Unità di Ricerca per la Maiscoltura (**CRA-MAC**)

Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura – Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale (**CRA-PAV**)

Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura - Unità di ricerca per la climatologia e la meteorologia applicate all'agricoltura (**CRA-CMA**)

Dipartimento di Biologia e Protezione delle Piante, Università di Udine (**UNIUD**)

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA) – Università di Bologna (**UNIBO**)

Dipartimento di Protezione delle Piante, Università degli studi di Sassari (**UNISS**)

Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali, Università degli Studi della Basilicata (**UNIBAS**)

Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria, Università degli Studi di Napoli “Federico II” (**UNINA**)

Dipartimento di Agronomia Ambientale e produzioni vegetali-Entomologia, Università di Padova (**UNIPD**)

Dipartimento di Anatomia, Biochimica e Fisiologia Veterinaria – Università di Pisa (**UNIFI**)

Centro Interdipartimentale di Spettrometria di Massa Università degli Studi di Firenze (**UNIFE**)

Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali, Sezione di Entomologia e Zoologia applicate all’Ambiente “Carlo Vidano”, Università di Torino (**UNITO**)

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Centro di referenza nazionale per l’apicoltura (**IZS-VE**)

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini" (**IZSLER**)

Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell’Emilia, sezione di Modena

Istituto di Fisica Applicata “Nello Carrara” del Consiglio Nazionale delle Ricerche (**IFAC**)

Istituto Superiore di Sanità (**ISS**)

Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale dell’Emilia Romagna (**ARPA-ER**)

Istituto di Genetica Applicata, Parco Scientifico e Tecnologico Luigi Danieli (**IGA UD**)

Istituto di Genetica e Biofisica “A. Buzzati-Traverso” del Consiglio Nazionale delle Ricerche (**IGB-CNR**)

Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (**ISPRA**)

Unione Nazionale dei Costruttori di Macchine Agricole (**UNACOMA**)

Centro Agricoltura e Ambiente “Giorgio Nicoli” (**CAA**)

Länderinstitut für Bienenkunde Hohen Neuendorf e.V.

Karl-Franzens-University Graz, Department for Zoology

Aarhus Universitet, Faculty of Agricultural Sciences, Dept. of Integrated Pest Management

Bee Research Laboratory, USDA-ARS, BARC-EAST Beltsville, USA

Ditta “Carlo VOLPI di Monterotondo”

Istituzioni locali competenti (Servizi Fitosanitari Regionali, Istituti Zooprofilattici Sperimentali, Assessorati regionali, Enti di ricerca, Associazioni degli apicoltori, ecc.)

Descrizione delle modalità di monitoraggio interno del progetto e verifica dei risultati

Si sottolinea come il progetto rappresenti una ricerca caratterizzata da forte interazione tra le UO, che sarà in grado di potenziare le conoscenze in ordine ad alcuni aspetti specifici dell'apicoltura. In questo progetto, in particolare per quanto attiene il monitoraggio, è inoltre forte il rapporto tra istituzioni pubbliche di ricerca e istituzioni e strutture che operano sul territorio.

Per ottimizzare le interazioni all'interno del progetto, verrà creato un comitato scientifico di progetto, costituito dal coordinatore e dai responsabili delle Unità Operative, che avranno il ruolo di coordinare e facilitare lo scambio di informazioni. Si prevede inoltre un costante aggiornamento del lavoro svolto dalle singole unità attraverso e-mail e discussioni collegiali che permettano di superare eventuali problematiche relative al progetto. Si prevedono anche incontri con le organizzazioni degli apicoltori e con gli enti locali che partecipano al monitoraggio con l'intento di mantenere saldo il legame tra gli obiettivi del progetto e le effettive necessità del settore.

Per ciascuna linea di ricerca occorrerà riferire con cadenza periodica al coordinatore sullo stato di avanzamento dell'attività. Verranno anche raccolti indicatori di tipo finanziario relativi all'impiego del contributo ricevuto.

La verifica del raggiungimento degli obiettivi avverrà attraverso presentazioni in riunioni di progetto, ed eventualmente anche aperte alle parti interessate, verifica dei lavori scientifici scritti e accettati per la pubblicazione a fine progetto.

I risultati saranno riportati in una relazione finale e pubblicati su riviste scientifiche e riviste divulgative. Per quanto riguarda i risultati del monitoraggio, i risultati una volta valutati e condivisi, verranno divulgati secondo modalità idonee.

Ostacoli prevedibili ed azioni correttive

I principali ostacoli che si possono presentare nel corso dell'attività sono rappresentati dall'elevato numero di studi, di prove sperimentali di campo ed analisi da eseguire e dalla necessità di un efficace collegamento tra le U.O. Sarà importante una corretta programmazione preliminare delle sperimentazioni e successivamente mantenere costantemente monitorata l'attività svolta da parte del coordinatore, attraverso incontri periodici e con lo scambio costante di informazione.

Il principale ostacolo alla creazione di una rete nazionale potrebbe essere rappresentato dalla mancanza di coordinamento e sinergia tra le singole realtà regionali o locali, a cui si porrebbe rimedio potenziando il ruolo del coordinamento, favorendo il maggiore coinvolgimento delle istituzioni locali, organizzando incontri e corsi specifici per gli operatori.

Si potranno inoltre verificare perdite improvvise di alveari sperimentali o di regine dovute alla mortalità invernale o all'insorgenza di patologie rimediabili con l'acquisto di nuove famiglie ed eventualmente altre arnie. E' noto inoltre che tutte le sperimentazioni di campo sono soggette a un margine di rischio dovuto a fattori a volte non prevedibili, di cui, per quanto possibile, occorre tenere preventivamente conto.

Risultati attesi suddivisi per ogni linea di ricerca

Linea di ricerca: Monitoraggio

I dati rilevati mediante la rete di monitoraggio consentiranno di ottenere in modo continuo lo stato di salute degli alveari dislocati nelle varie aree del nostro Paese. Tali dati integrati con il contesto ambientale in cui sono collocati gli apiari (latitudine, coltivazioni, clima, tecniche agricole, ecc.) e la conduzione apistica adottata, consentiranno di valutare i diversi fattori che possono influenzare lo sviluppo o meno della famiglia di api, indagare sulle cause degli spopolamenti di alveari e stimare con dati oggettivi la situazione del nostro Paese.

I risultati ottenuti dalla rete di monitoraggio APENET saranno oggetto di una relazione annuale che sarà inviata agli organi competenti e divulgata nelle sedi opportune.

Linea di ricerca: Api e agrofarmaci

Risultato delle sperimentazioni descritte sarà la valutazione degli effetti subletali indotti dagli agrofarmaci sulle api e la loro possibile ripercussione sullo stato di salute della colonia. Gli effetti di molti principi attivi sul comportamento delle api, per quanto già osservati in campo anche dagli stessi apicoltori, in pochi casi sono stati studiati in modo approfondito. Attraverso l'esecuzione di prove di laboratorio e di campo si intendono analizzare gli effetti sia singolarmente nelle api adulte, che sullo sviluppo e sullo stato generale della colonia. Ciò permetterà di valutare il reale impatto degli agrofarmaci sulle api, al di là della loro intrinseca tossicità.

Risultato delle sperimentazioni descritte sarà la valutazione degli effetti subletali indotti dagli agrofarmaci sulle api e la loro possibile ripercussione sullo stato di salute della colonia. Gli effetti di molti principi attivi sul comportamento delle

api, per quanto già osservati in campo anche dagli stessi apicoltori, in pochi casi sono stati studiati in modo approfondito. Attraverso l'esecuzione di prove di laboratorio e di campo si intendono analizzare gli effetti sia singolarmente nelle api adulte, che sullo sviluppo e sullo stato generale della colonia. Ciò permetterà di valutare il reale impatto degli agrofarmaci sulle api, al di là della loro intrinseca tossicità che, comunque, dovrà essere considerata analizzando la bibliografia esistente e, soprattutto, la banca dati sui fitofarmaci del CRA-PAV.

Le mappe di rischio per la presenza di fitofagi ipogei (mais), servirà ad utilizzare il seme conciato solo nei casi in cui vi siano fattori di rischio o dove si riscontrino elevate infestazioni.

Dalle valutazioni dell'utilità produttiva ed agronomica della concia delle sementi di mais, si attendono risultati che consentiranno di stabilire l'utilità agronomica dei preparati per la concia delle sementi di mais. Individuazione di un'eventuale variabilità (susceptibilità o viceversa resistenza ad attacchi di insetti) tra gli ibridi saggiati in condizione di semente concia e non. Dagli esperimenti programmati, si prevede di individuare il periodo di persistenza del principio attivo conciante nei vari tessuti ed a vari stadi di sviluppo della pianta di mais, anche eventualmente in relazione alla dose di conciante.

Le ricerche sulle guttazioni serviranno a valutare se l'acqua prodotta dalle plantule del mais e la rugiada presente sul mais e sulla vegetazione spontanea circostante, in corrispondenza delle semine di mais conciato con neonicotinoidi, possano costituire una fonte di avvelenamento per le api bottinatrici. Si verificherà così l'ipotesi che tale contaminazione sia una delle cause delle morie di api verificatesi negli ultimi anni in vicinanza dei campi di mais conciato, anche mediante il confronto con mais trattato con i più comuni geodisinfestanti.

Linea di ricerca: Api e dispersione delle polveri di seme di mais conciato

I risultati attesi sono i seguenti:

1. Determinazione di una scala di valutazione del seme conciato in relazione alla sua predisposizione a produrre polveri da abrasione.
2. Determinazione della quantità di p.a. dispersa nel corso della semina da una generica seminatrice di precisione in relazione al valore soglia dannoso per le api.
3. Determinazione di un metodo obiettivo di valutazione della deriva delle polveri espulse dalle seminatrici nel corso della semina. Possibilità di effettuare prove ripetibili e confrontabili su seminatrici diverse.
4. Individuazione delle modifiche alle seminatrici più efficaci a ridurre la quantità di polvere da abrasione dispersa in ambiente e/o la frazione di esse soggetta a deriva.
5. Sviluppo di un sistema di certificazione delle seminatrici
6. Individuazione della migliore tecnica agronomica che permetta di rendere minima la persistenza nel suolo delle sostanze attive distribuite con la semina, oltre ai possibili metaboliti, e la contaminazione dei vegetali presenti nelle zone attigue, dell'acqua, delle api e dei prodotti dell'alveare.

Linea di ricerca: Api e patologie

Gli studi di cui all'obiettivo 1 permetteranno di integrare le conoscenze relative a patogeni, parassiti e commensali dell'ape e di determinare la diffusione sul territorio dei principali patogeni, in questo modo sarà possibile individuare i fattori più verosimilmente coinvolti nei fenomeni di collasso della colonia.

Gli studi di cui all'obiettivo 2 permetteranno di sistematizzare le tecniche di diagnosi. Paralleli studi di laboratorio permetteranno di mettere a punto tecniche per lo studio, in condizioni controllate, dei patogeni dell'ape.

Gli studi di cui all'obiettivo 3 e all'obiettivo 4 permetteranno innanzitutto di descrivere dettagliatamente il fenomeno della risposta immunitaria in *A. mellifera* anche in presenza di agenti di stress biotico e abiotico. Tali studi consentiranno anche di individuare gli aspetti chiave di questo fenomeno permettendo sperabilmente di far luce sul momento di passaggio da infezioni latenti ed innocue a infezioni conclamate, potenzialmente letali per le colonie d'api.

Gli studi di cui all'obiettivo 5 potranno chiarire in che modo le infezioni di patogeni interferiscano con la vita della colonia fino a produrre effetti letali.

Linea di ricerca: Api e fattori ambientali

1. Verifica dell'impatto delle condizioni micro-macro climatiche e nutrizionali sull'equilibrio della colonia in termini di benessere, tali anche da assicurare una maggiore tolleranza ai parassiti. Si cercherà di chiarire il ruolo e l'importanza della corretta preparazione delle api invernali, e i possibili rischi di debilitazione e collasso delle colonie nel periodo autunno-invernale della covata. Maggiore comprensione dei fenomeni che sottendono alla trasmissione e alla moltiplicazione degli agenti patogeni anche in relazione alle possibili relative interazioni.

2. L'applicazione dell'elettroforesi bidimensionale a campioni di gelatina reale destinata a larve di età diverse consente di poter descrivere l'evoluzione del pattern proteico che, associata all'identificazione delle singole proteine per mezzo

della spettrometria di massa, può far luce su alcuni dei meccanismi molecolari responsabili dei meccanismi di detossificazione e quindi tolleranza come su quelli, invece, inducenti stati di stress

3. Valutazione della fitness delle colonie autoctone rispetto a quelle selezionate ed allevate in ambienti diversi, come rilevato da dati empirici in molte zone, soprattutto in termini di maggiore resistenza agli stress ambientali da parte delle popolazioni locali.

4. Informazioni sui livelli di esposizione e relative statistiche (media, massimo, percentili etc.) degli alveari coinvolti nello studio. Indicazioni in merito all'esistenza di una possibile associazione tra la prossimità a sorgenti di campi elettromagnetici (e/o il conseguente livello di esposizione) e la comparsa, nelle popolazioni di api, di comportamenti anomali o di altre sindromi.

Linea di ricerca: interazione di più fattori

Valutazione degli effetti letali e subletali degli agrofarmaci sulle api in sinergia con i diversi fattori ambientali presi in considerazione. Dai risultati ottenuti sarà possibile identificare i fattori ambientali che provocano uno stress alle api rendendole più suscettibili agli agrofarmaci e che quindi possono portare ai casi di elevata mortalità e di spopolamento di intere famiglie. Infatti, in base alle segnalazioni e alle operazioni di monitoraggio svolte finora si è osservato che non sempre quando le api entrano in contatto con gli agrofarmaci muoiono o si hanno casi di spopolamenti di alveari. A causa di questa incoerenza, è stato finora difficile definire univocamente le cause dei danni in apicoltura. La presente ricerca dovrebbe quindi fare luce sulle condizioni in cui l'esposizione delle api a bassissimi livelli di agrofarmaci, possa avere effetti devastanti e quando, per contrasto c'è da aspettarsi l'assenza di sintomatologia o la presenza di danni lievi.

Ricadute e benefici

Benefici scientifici

La partecipazione al progetto di importanti competenze a livello scientifico e gli argomenti che verranno affrontati porteranno ad un approfondimento e ad un collegamento con un vantaggio reciproco dei soggetti interessati e ancor più la possibilità di applicare al settore apistico competenze e tecniche di elevato valore scientifico.

Benefici economici

Sono prevedibili benefici economici diretti al settore apistico, in termini produttivi, in quanto ci si propone di porre rimedio alle gravi perdite di alveari subite negli ultimi anni dagli apicoltori: Tali benefici potranno avere poi un ulteriore riscontro nel tempo come conseguenza dei risultati raggiunti nel settore del controllo delle malattie e dei trattamenti antiparassitari. Come conseguenza il mondo agricolo, che beneficia del servizio di impollinazione delle api, e quello agroalimentare otterranno rilevanti vantaggi da un'apicoltura in buona salute.

Impatto sociale

In considerazione dell'importante ruolo che l'apicoltura svolge sia in modo diretto che indiretto in svariati ambiti, si può ritenere che la possibilità di salvaguardare l'attività apistica induca benefici anche a livello sociale, non ultima un'attività da reddito per giovani imprenditori agricoli.

Impatto ambientale

L'ambiente è probabilmente il settore che in senso lato può maggiormente beneficiare della presenza di api nel territorio. A questo proposito si ricorda il ruolo, meno conosciuto, che le api svolgono come insetti pronubi di molte specie vegetali spontanee, contribuendo al mantenimento e alla ricchezza della biodiversità in tutti gli ecosistemi.

Piano di sfruttamento dei risultati

Pubblicazioni scientifiche, tecniche e divulgative

Ai risultati del progetto verrà data visibilità attraverso gli strumenti tradizionali, quali pubblicazioni su riviste nazionali e internazionali, scientifiche e divulgative e siti web istituzionali.

Convegni

È prevista la partecipazione a convegni nazionali e internazionali scientifici e a incontri di carattere più divulgativo rivolti agli operatori del settore. Un convegno finale sarà poi l'occasione per presentare a un pubblico più vasto i risultati ottenuti dal progetto.

Materiali didattici e Corsi di formazione

Sono previsti in particolare corsi di formazione per le persone impegnate nel monitoraggio e verrà predisposto materiale divulgativo soprattutto per quanto riguarda il controllo delle malattie delle api.

Brevetti

Allo stato attuale non sono previste innovazioni brevettabili, una verifica verrà comunque effettuata in corso d'opera.