

## Scheda APENET Monitoraggio e ricerca in apicoltura

**Titolo: “Api e patologie”**

**Studio effettuato da: Dipartimento di Biologia e Protezione delle Piante – Università di Udine**

### **Competenze dell’Unità Operativa in relazione al progetto**

L’unità operativa è attiva nel campo della ricerca sulle api e le rispettive avversità da più di vent’anni. L’esperienza pluriennale nella gestione di apiari sperimentali e i metodi messi a punto per l’allevamento in condizioni controllate delle api e dell’acaro *Varroa destructor* hanno permesso di svolgere dettagliate analisi sulle interazioni ospite-patogeno-parassita di cui le ricerche per cui si richiede il finanziamento costituiscono il naturale complemento. Nel corso del tempo l’unità si è dotata di tutte le attrezzature e le competenze necessarie ad affrontare con profitto studi di questo tipo, in particolare: competenze tecniche nella gestione di apiari sperimentali, competenze culturali e pratiche relative all’ape e i suoi patogeni, competenze metodologiche nel settore delle analisi chimiche e di parametri fisiologici.

### **Collaborazioni esterne**

L’unità operativa collaborerà con le seguenti strutture:

- 1) Università degli Studi di Napoli “Federico II”, Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria “Filippo Silvestri” (indicato come UNINA);
- 2) Consiglio per la Ricerca in Agricoltura – Unità di Ricerca di Apicoltura e Bachicoltura (indicato come CRA API);
- 3) Istituto di Genetica Applicata (indicato come IGA)

Le attività svolte in collaborazione con altre strutture sono elencate di seguito, suddivise per obiettivo di progetto.

#### Obiettivo 1: Individuazione dei fattori coinvolti nella sindrome del collasso della colonia

L’analisi metagenomica verrà svolta dall’IGA.

#### Obiettivo 2: Messa a punto di adeguati metodi per la diagnostica e la manipolazione di patogeni

L’attività di manipolazione dei patogeni verrà svolta in collaborazione con CRA API.

#### Obiettivo 3: Studio della risposta immunitaria di *A. mellifera* ad infezioni virali e di altri patogeni.

La preparazione dei campioni d’ape infettati con patogeni verrà svolta in collaborazione con CRA API. L’analisi trascrittomica e proteomica verrà eseguita dall’u.o. UNINA.

#### Obiettivo 4: Verifica dell’effetto di agenti di stress biotici e abiotici sulla risposta dell’ape

Per la preparazione dei campioni ci si avvarrà della collaborazione di CRA API.

Le analisi trascrittomiche e proteomiche sui campioni preparati verranno eseguite dall’u.o. UNINA.

#### Obiettivo 5: Studio degli effetti dei patogeni su fisiologia e comportamento delle api.

Lo studio verrà svolto in collaborazione con CRA API.

### **Descrizione della ricerca:**

#### ***Premessa***

L’attività di cui si riferisce in questa scheda fa parte di una linea di ricerca riguardante l’ape e i patogeni. Di seguito, viene fornito un inquadramento generale dello stato dell’arte e degli obiettivi specifici di questa linea di ricerca. Nella descrizione delle attività verranno invece evidenziate quelle che saranno svolte in particolare da questa unità operativa.

#### ***Stato dell’arte***

E’ opinione comune tra i ricercatori del settore e risulta evidente dalla più recente letteratura scientifica sull’argomento che il fenomeno noto come sindrome del collasso della colonia (CCD degli autori anglosassoni) sia determinato da un insieme di fattori che comprende avvelenamenti da agrofarmaci, modificazioni climatiche ed ambientali, pratiche apistiche, impoverimento della variabilità genetica delle api allevate e patologie delle api.

Nel tempo si sono succedute notizie relative all’individuazione del presunto fattore scatenante che di volta in volta è stato identificato come un patogeno esotico o un prodotto insetticida di nuova generazione. Tuttavia in nessun caso è stato possibile ricondurre con sicurezza il fenomeno inteso nel suo complesso ad una singola causa. In particolare, nel caso delle morie registrate in Italia nel periodo autunnale o invernale, le indagini finora svolte non hanno ancora permesso di chiarire con sicurezza le cause del collasso. In questo senso risulta promettente un approccio metagenomico

allo studio dei patogeni e parassiti presenti all'interno dell'alveare che è già stato applicato in un studio svolto di recente negli Stati Uniti (Cox-Foster et al., 2007).

Negli ultimi anni il sistema immunitario degli insetti è stato oggetto di numerose ricerche che hanno permesso di accumulare una cospicua documentazione sull'argomento; tali conoscenze dipendono soprattutto da approfonditi studi svolti su sistemi modello come *Drosophila melanogaster* e sono stati molto facilitati dal sequenziamento del genoma di tali organismi (Hoffman, 2003). In generale si può affermare che gli agenti patogeni, quali che siano, possono produrre effetti negativi sulle colonie d'api ed eventualmente condurle al collasso solo quando riescono a prevaricare le difese immunitarie dell'insetto; questa circostanza può verificarsi più facilmente nel caso in cui il sistema di difesa sia temporaneamente depresso a causa di vari fattori. Da questo punto di vista è già stato dimostrato come l'acaro *Varroa destructor* eserciti sulle api un'azione immunosoppressiva che può aggravare l'effetto di agenti patogeni come il virus delle ali deformi (Yang e Cox-Foster, 2005).

Perciò si ritiene che lo studio della risposta immunitaria dell'ape nei confronti dei vari patogeni coinvolti nel fenomeno dello spopolamento degli alveari potrebbe fornire informazioni essenziali per comprendere i meccanismi che determinano la transizione fra infezioni latenti, comuni e sostanzialmente innocue, a infezioni conclamate, potenzialmente letali per la colonia. Queste informazioni potrebbero rivelarsi fondamentali allo scopo di individuare possibili strategie di intervento per prevenire il fenomeno di moria delle api.

In quest'ottica si ritiene che potrebbe risultare particolarmente efficace un approccio che preveda l'utilizzo di tecniche adeguate ad affrontare lo studio a tutti i livelli potenzialmente interessanti: dal gene fino alla colonia passando per i trascritti genici, le proteine, le cellule ed il singolo organismo.

Data anche la complessità del fenomeno, che interessa contemporaneamente la colonia d'api, i patogeni e i fattori di stress, si ritiene che gli sforzi dovranno essere concentrati soprattutto su un sistema modello che comprenda l'ape, il virus delle ali deformi (DWV) e *V. destructor*. Tale sistema appare particolarmente interessante sia per il fatto di essere noto con sufficiente livello di dettaglio sia perché è stato dimostrato che il DWV, veicolato da *V. destructor*, può effettivamente provocare il collasso di colonie d'api (Martin et al., 1998).

### **Bibliografia essenziale**

Cox-Foster D.L., Conlan S., Holmes E.C., Palacios G., Evans J.D., Moran N.A., Quan P., Briese T., Hornig M., Geiser D.M., Martinson V., vanEngelsdorp D., Kalstein A.L., Drysdale A., Hui J., Zhai J., Cui L., Hutchison S.K., Simons J.F., Egholm M., Pettis J.S., Ian Lipkin W. (2007) - A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Science* 318:283-287.

Dostert C., Galiana-Arnoux D., Imler J.L. (2008) – Innate immunity of insects to infestation. In “Virology and the honey bee”, Aubert M. et al. Eds., European Commission, Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 311-346.

Hoffmann J.A. (2003) - The immune response of *Drosophila*. *Nature*, 426: 33-38.

Martin S.J., Hogarth A., van Breda J., Perrett J. (1998) – A scientific note on *Varroa jacobsoni* Oudemans and the collapse of *Apis mellifera* L. colonies in the United Kingdom. *Apidologie* 29:369-370.

Yang X., Cox-Foster D.L. (2005) - Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *PNAS*, 102: 7470-7475.

### **Obiettivi specifici**

L'attività si pone i seguenti obiettivi:

1. Individuazione dei fattori coinvolti nella sindrome del collasso della colonia, ovvero dei parassiti e patogeni presenti negli apiari interessati da morie.
2. Messa a punto di adeguati metodi per la manipolazione di patogeni
3. Studio della risposta immunitaria di *A. mellifera* ad infezioni virali e di altri patogeni.
4. Verifica dell'effetto di agenti di stress biotico e abiotico sulla risposta immunitaria dell'ape agli agenti patogeni considerati
5. Studio degli effetti dei patogeni su fisiologia e comportamento delle api.

### **Piano di attività**

#### Obiettivo 1: Individuazione dei fattori coinvolti nella sindrome del collasso della colonia

Allo scopo si adatterà anche 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. Successivamente l'identità dei patogeni sarà confermata mediante tecniche standard (PCR).

Per stimare l'importanza dei patogeni che verranno individuati si adoterà una duplice strategia.

1.1. Da un lato si analizzeranno campioni di api provenienti da un congruo numero di apiari interessati da fenomeni di collasso delle colonie per individuare i parassiti e i patogeni presenti negli stessi.

Per la raccolta dei campioni ci si avvarrà della rete di monitoraggio approntata nell'ambito di questo stesso progetto. Appropriate tecniche statistiche permetteranno di verificare la significatività della coincidenza fra la presenza di un determinato patogeno e fenomeni di collasso.

1.2. 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. Tali analisi saranno accompagnate da un accurato monitoraggio delle colonie dell'apiario di studio per determinare la dinamica di popolazione delle api e del parassita *V. destructor*.

L'attività verrà svolta dall'u.o. UNIUD. L'analisi metagenomica verrà commissionata all'IGA.

#### Obiettivo 2: Messa a punto di adeguati metodi per la manipolazione di patogeni

In questo ambito si eseguiranno attività finalizzate allo svolgimento degli altri punti del progetto.

In particolare verranno messi a punto metodi affidabili per l'infezione di api in condizioni controllate con protozoi, batteri e virus.

L'attività verrà svolta dall'u.o. UNIUD con la collaborazione di CRA API.

#### Obiettivo 3: Studio della risposta immunitaria di *A. mellifera* ad infezioni virali e di altri patogeni.

Scopo di questa attività è quello di individuare i 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 definire i cambiamenti che si verificano in questo meccanismo di regolazione allorquando la malattia si manifesta.

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 delle attività di cui all'Obiettivo 1.

L'u.o. UNIUD, in collaborazione con CRA API, preparerà campioni d'ape infettati con patogeni. I campioni ottenuti saranno poi inviati all'u.o. UNINA per l'analisi trascrittomiche e proteomica.

#### Obiettivo 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.

4.1 L'attività prevede di preparare campioni di api, allevate in ambiente controllato, sottoposte a diversi agenti di stress biotico e abiotico.

I campioni d'api sottoposti a vari stress saranno preparati dall'u.o. UNIUD in collaborazione con CRA API. Le analisi trascrittomiche e proteomiche sui campioni preparati verranno eseguite dall'u.o. UNINA.

4.2. 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.

L'effetto di tali fattori verrà valutato usando marcatori individuati nel corso delle attività di cui al sotto-obiettivo 4.1.

L'attività verrà svolta dall'u.o. UNIUD.

#### Obiettivo 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.).

L'attività verrà svolta dall'u.o. UNIUD in collaborazione con CRA API.

#### **Articolazione temporale delle attività**

L'attività si svolgerà secondo la tempistica dettagliata in tabella.

Obiettivo	Sotto-obiettivo	Anno I	Anno II
Obiettivo 1:	1.1. Analisi metagenomica di campioni prelevati in diversi apiari	X	X
	1.2. Analisi di campioni prelevati in tempi diversi	X	X
Obiettivo 2:		X	
Obiettivo 3:		X	X
Obiettivo 4:	4.1. Confronto di campioni sani e infetti	X	X
	4.2. Studio fattori che inducono immunosoppressione		X
Obiettivo 5		X	X

### ***Ostacoli prevedibili ed azioni correttive***

Il principale fattore che potrebbe ostacolare il raggiungimento degli obiettivi di progetto è costituito dal fatto che la maggior parte dei patogeni delle api non sono in effetti ottenibili se non direttamente da api infette. Tuttavia l'unità operativa ha acquisito negli anni una notevole esperienza nella gestione di apiari sperimentali e nel mantenimento in condizioni controllate di api e parassiti.

### ***Risultati attesi***

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.

### ***Ricadute e benefici***

In generale si ritiene che lo studio della risposta immunitaria dell'ape nei confronti dei patogeni in presenza di eventuali parassitosi permetterà di reperire informazioni essenziali per comprendere i meccanismi che determinano la transizione fra infezioni latenti e infezioni conclamate, potenzialmente letali per la colonia. Queste informazioni potrebbero rivelarsi fondamentali allo scopo di individuare possibili strategie di intervento per prevenire il fenomeno delle morie di api.