



CONSIGLIO PER LA RICERCA E SPERIMENTAZIONE IN AGRICOLTURA

MORIA delle API

SCHEDE di PROGETTO

Proposta: versione 1.1 del 28.11.08

1. Istituzione: CRA – Unità di Ricerca di Apicoltura e Bachicoltura

Titolo della ricerca: Biosistema e benessere delle colonie: valutazione degli effetti delle componenti micro e macro ambientali sul benessere delle colonie e loro influenza sullo sviluppo di patogeni

Descrizione della ricerca:

Obiettivi specifici

Per valutare il ruolo di diversi fattori, biotici ed abiotici, implicati nel benessere della colonia, si propongono i seguenti obiettivi:

- 1) Analisi delle ripercussioni e delle interazioni fra le più significative variazioni dell'ecosistema e il benessere delle colonie sulla mortalità delle colonie;
- 2) Stima degli 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 possono comportare alterazioni fisiologiche importanti tali da alterare le strategie di sviluppo della famiglia, soprattutto se prolungati nel tempo;
- 3) Verifica delle possibili interazioni genotipo-ambiente: studio dei parametri di sviluppo di colonie in funzione dell'origine geografica e valutazione dell'importanza della biodiversità genetica nella capacità d'adattamento agli stress ambientali;
- 4) Valutazione del ruolo dell'esposizione ai campi elettromagnetici nello sviluppo di comportamenti anomali o di altre sindromi nelle popolazioni di api.

Piano di 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.
- 2) Eventuali alterazioni fisiologiche causate da trattamenti acaricidi ripetuti all'interno dell'alveare saranno valutati tramite elettroforesi bidimensionale (analisi proteomica su campioni di gelatina reale prodotta da api nutrici esposte ai farmaci oggetto di indagine).
- 3) Verranno studiate le interazioni genotipo-ambiente, confrontando i parametri di sviluppo e vitalità di colonie con origine comune (appartenenti ad una stessa popolazione locale) in diversi ambienti, congiuntamente alle condizioni sanitarie (livelli d'infestazione e infezione), e correlati ai fattori ambientali. Si studieranno le capacità di reazione della colonia ad andamenti climatici diversi od estremi tramite l'osservazione e analisi della sottospecie autoctona siciliana, *A. m. siciliana*.
- 4) L'eventuale impatto dei campi elettromagnetici sugli spopolamenti degli alveari sarà effettuata posizionando degli alveari in un'area interessata dalla presenza di numerose sorgenti di campi elettromagnetici (elettrodotti, stazioni di diffusione radiotelevisiva, stazioni radio base per la telefonia cellulare) e controllandone i parametri di sviluppo e vitalità e le condizioni sanitarie. 8.4 Articolazione temporale delle attività

Risultati attesi

- 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.
- 2) Verifica dell'impatto sull'alveare di ripetuti trattamenti per il controllo dell'acaro Varroa destructor.
- 3) Indicazioni sull'importanza della biodiversità genetica nella capacità di adattamento agli stress ambientali.
- 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.

Partecipanti

Dipartimento di Biologia e Protezione delle Piante, Università di Udine; Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna; Dipartimento di Protezione delle Piante, Università degli studi di Sassari; Dipartimento di Anatomia, Biochimica e Fisiologia Veterinaria, Università di Pisa; Istituto di Fisica Applicata "Nello Carrara" del Consiglio Nazionale delle Ricerche; 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; ARPA-Emilia-Romagna; CRA-CMA; Istituzioni locali competenti (Servizi fitosanitari regionali, Enti di ricerca, ecc.) delle regioni interessate alle sperimentazioni; Apicoltori delle Associazioni apistiche coinvolte nella ricerca.

2. Istituzione: CRA – Unità di Ricerca di Apicoltura e Bachicoltura

Titolo della ricerca: Valutazione dell'effetto sinergico di più fattori sulla salute delle api

Descrizione della ricerca:

Obiettivi specifici

Con la ricerca in questione si vuole fare luce su alcuni aspetti relativi ai recenti gravi danni subiti dalle api. In particolare, si intende studiare i possibili effetti negativi di agrofarmaci somministrati alle api sia durante lo stadio larvale che adulto in relazione ad altri fattori ambientali. La somministrazione avverrà a livelli subletali e si cercherà di individuare gli effetti che tali sostanze provocano alle api in sinergia con un secondo fattore di stress (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). In questo modo si vuole capire perché in alcune situazioni ambientali si riscontrano importanti danni in apicoltura attribuibili a un intervento agricolo, mentre in altre circostanze, un simile intervento non dà origine ad alcun danno. Inoltre, al fine di ottenere informazioni il più possibile omogenee dal territorio, relativamente al fenomeno dello spopolamento degli alveari e della mortalità delle api, per poi utilizzarle nell'interpretazione delle sperimentazioni di laboratorio (e viceversa), è prevista l'istituzione di una squadra di esperti che si rechi, nel più breve tempo possibile, sul luogo in cui è stata segnalata una grave moria di api, per l'accertamento dello stato sanitario degli alveari colpiti, di quelli senza danno e per il rilevamento dei dati ambientali correlati al fenomeno.

Piano di attività

a) Studio degli effetti letali e subletali di agrofarmaci sulle api adulte e sulle larve sviluppate in laboratorio a diverse condizioni termiche. Le larve allevate in vitro saranno sottoposte a due regimi termici: ottimale e subottimale. Successivamente, gli adulti sviluppati verranno sottoposti ai test di tossicità acuta, di longevità, di orientamento con il metodo del labirinto in laboratorio e di apprendimento con il metodo del PER. 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 sottoposte a diversi regimi alimentari. Le api sfarfallare in laboratorio verranno sottoposte a diversi regimi alimentari (pollini di diverso valore nutritivo). Dopo un periodo di allevamento verrà valutata la loro risposta alla somministrazione di un agrofarmaco.

d) Studio degli effetti degli agrofarmaci sullo sviluppo della colonia di api in relazione alle sue condizioni di forza e al suo stato sanitario. Le api provenienti da colonie sperimentali caratterizzate da diverso stato sanitario (con particolare attenzione alle patologie infettive della covata) 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 verrà somministrato un agrofarmaco a livello subletale. Successivamente verrà valutata la risposta delle larve stesse all'inoculazione di patogeni della covata. Questa risposta sarà valutata attraverso il rilevamento di mortalità preimmaginale e attraverso i metodi di biologia molecolare (PCR real time). 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 (tipo di zona, uso del territorio, principali coltivazioni dell'area e dati meteorologici) e relativi agli alveari (forza della famiglia, scorte, età della regina, presenza di fuchi, mortalità, attività di volo, presenza di api con pallottole di polline, presenza di varroa, sintomi di patologie, comportamenti anomali, interventi sanitari ecc.). Inoltre si effettueranno foto e filmati degli apiari colpiti, dell'area di studio, con prelievi di polline, di api morte e vive per le analisi. Si realizzeranno almeno una decina di rilievi per anno in zone dove sono occorsi degli apicidi o degli spopolamenti, e altrettanti in aree simili, dal punto di vista dell'uso del territorio, ma dove non siano stati registrati danni alle api.

Tutte le indagini saranno effettuate nel rispetto di una metodologia preventivamente condivisa e codificata. Le informazioni disponibili saranno messe in relazione con i dati di uso del suolo (banca dati SIAN e AGRIT), in modo da verificare l'impatto delle diverse tipologie di agricoltura praticate sul territorio nazionale (e del diverso livello di intensività dell'uso dei mezzi di produzione) sullo stato di salute delle api.

Risultati attesi

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. 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.

Partecipanti

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Ambientali, Università di Bologna; Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia, sezione di Modena.

3. Istituzione: Dipartimento di Biologia e Protezione delle Piante – Università di Udine

Titolo della ricerca: Api e patologie

Descrizione della ricerca:

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 diagnostica e 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

- 1) Per individuare i fattori coinvolti nella sindrome del collasso della colonia 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.
- 2) In questo ambito si eseguiranno attività finalizzate allo svolgimento degli altri punti del progetto, in particolare verranno revisionate le tecniche diagnostiche per la determinazione della presenza di virus ed altri patogeni in campioni di api e saranno messi a punto metodi affidabili per l'infezione di api in condizioni controllate con protozoi, batteri e virus.
- 3) Si prevede di utilizzare il DWV come sistema sperimentale modello per 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.
- 4) Per valutare se e come agenti di stress biotico (*V. destructor*) e abiotico (alimentazione non idonea e dosi sub-letali di neonicotinoidi e altri agrofarmaci) influenzano le interazioni fra ape e patogeno, modulando geni-chiave coinvolti nei meccanismi di risposta immunitaria, si alleviranno api in ambiente controllato, sottoposte a diversi agenti di stress biotico e abiotico, e si sottoporranno ad analisi trascrittomiche e proteomiche. Relativamente a *V. destructor*, si tenterà anche di identificare i fattori che inducono una risposta di immunosoppressione e/o di eventuale immunomodulazione.
- 5) 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, 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.).

Risultati attesi

Gli studi proposti al punto 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 modo da 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.

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.

Partecipanti

Università degli Studi di Napoli "Federico II", Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria "Filippo Silvestri"; CRA-API; Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie; Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini"; Istituto di Genetica Applicata.

4. Istituzione: CRA-Ing, Unità di Ricerca per l'Ingegneria Agraria

Titolo della ricerca: Interventi finalizzati alla riduzione della dispersione in ambiente, nel corso della semina del mais conciato, di polveri contenenti insetticidi: valutazione della predisposizione del seme a produrre polveri da abrasione; valutazione della dispersione di polveri causata dalle seminatrici; studio di modifiche sulle seminatrici per ridurre la dispersione in ambiente delle polveri da abrasione.

Descrizione della ricerca:

Obiettivi specifici

Obiettivo della ricerca è lo studio del fenomeno della dispersione nell'ambiente di polveri contenenti concianti nel corso della semina del mais conciato e nell'individuazione di possibili rimedi per ridurre la dispersione e quindi l'impatto sulle api, sull'uomo e sull'ambiente. Queste sostanze, anche in piccole dosi, possano risultare dannose per le api. Pertanto, si vuole studiare: l'influenza del processo di concia sulla predisposizione del seme a formare polveri da abrasione, la quantità di principio attivo complessiva espulsa dalla macchina seminatrice con le polveri da abrasione e la quantità dispersa nelle zone circostanti il campo di semina, l'individuazione di modifiche da apportare alle seminatrici allo scopo di abbattere la quantità di polveri da abrasione dispersa nell'ambiente. In seguito al raggiungimento dei suddetti obiettivi, si potrà valutare l'opportunità di istituire un sistema di certificazione delle seminatrici dal punto di vista della qualità delle emissioni e, analogamente, per il seme, un sistema di classificazione della sua predisposizione a produrre polvere da abrasione. Inoltre, potrebbero essere individuati i migliori momenti di semina al fine di limitare o evitare effetti collaterali sulle api e sull'ambiente.

Piano di attività

Determinazione della predisposizione del seme a produrre polveri da abrasione - Esecuzione di prove atte a definire e 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.

Determinazione della quantità di p.a. immesso in ambiente nel corso della semina da una generica seminatrice di precisione. Esecuzione di prove per definire la quantità di prodotto complessivamente dispersa da una macchina seminatrice, riferita all'unità di superficie, in relazione ai valori ritenuti dannosi per le api. Sarà messa a 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 alle diverse condizioni pedoclimatiche, al tipo di seme utilizzato e valutato secondo i criteri di rischio per le api.

Determinazione della deriva cui sono soggette le polveri espulse dalle seminatrici nel corso della semina. Si effettueranno prove di campo che descrivano il fenomeno di deriva delle polveri nella zona circostante l'area di semina. Dalle analisi del suolo, delle acque e della flora spontanea circostante il campo seminato, si valuterà la quantità di polveri disperse e di principio attivo con cui le api possono entrare in contatto nel corso della semina e il possibile accumulo di sostanze attive all'interno dell'alveare, in particolare nel polline (accumulo conseguente ad una possibile contaminazione sub-letale delle api).

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. Applicazione, e successive valutazioni, alle macchine seminatrici di modifiche sviluppate dalla U.O. e in collaborazione con i costruttori di macchine.

Risultati attesi

I risultati attesi fanno riferimento al raggiungimento degli obiettivi sopra indicati. In particolare, da questa ricerca si vuole: definire una scala di valutazione del seme conciato in relazione alla sua predisposizione a produrre polveri da abrasione; 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; valutazione della quantità di sostanza dispersa nell'ambiente; individuazione delle modifiche alle seminatrici più efficaci a ridurre la quantità di polvere da abrasione dispersa in ambiente e sviluppo di un sistema di certificazione delle seminatrici. 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.

Partecipanti

CRA-PAV; Unione Nazionale dei Costruttori di Macchine Agricole.

5. Istituzione: Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Centro di referenza nazionale per l'apicoltura

Titolo della ricerca: Messa a punto di una rete di monitoraggio nazionale per la valutazione dello stato di salute delle api

Descrizione della ricerca:

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. L'istituzione di una rete di controllo degli spopolamenti degli alveari e delle mortalità delle api, in Italia non ancora sufficientemente articolata, è strategica per poter intraprendere delle misure di mitigazione. Fino ad oggi, in assenza di questa rete di monitoraggio, la valutazione dell'entità del fenomeno è avvenuta tramite il sistema delle segnalazioni volontarie che dovrà comunque continuare a funzionare (da indirizzare e sostenere), parallelamente alla rete di monitoraggio. Tutte le informazioni relative alle segnalazioni di anomalie comportamentali delle api, in particolare degli eventi di mortalità presso i servizi veterinari delle ASL, dovranno essere resi disponibili in modo da integrarsi e consentire un confronto con i dati raccolti attraverso la rete di monitoraggio.

Obiettivi specifici

Ottenere specifiche informazioni sull'estensione degli spopolamenti degli alveari e della mortalità delle api, sui periodi e sulle zone più a rischio. Fornire notizie e materiali utili per le altre schede di ricerca del progetto ed eventuali indicazioni sulle diverse cause del fenomeno.

Piano di attività

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, 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 e allo stato della famiglia. 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 da sottoporre alle analisi di laboratorio. 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 questo modo, anche in presenza di eventi verificatisi nei periodi compresi fra i quattro controlli previsti, l'apicoltore sarà tenuto a segnalare l'evento seguendo una metodologia preventivamente concordata. Al fine di poter confrontare i dati provenienti dai vari moduli e ovviare alla soggettività delle rilevazioni, i responsabili delle diverse zone dovranno seguire un corso preliminare di addestramento per il corretto rilievo dei dati, la compilazione dei moduli, l'utilizzo della piattaforma informatica, il prelievo dei campioni e la loro gestione.

Risultati attesi

I dati rilevati mediante la rete di monitoraggio, integrati con quelli delle segnalazioni, 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.

Partecipanti

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Ambientali, Università di Bologna; CRA-API; CRA-CMA; Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; Assessorati regionali, Istituti Zooprofilattici Sperimentali, Enti di ricerca e Associazioni degli apicoltori; Istituto Superiore di Sanità.

6. Istituzione: DiSTA (Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali), Università degli Studi di Bologna

Titolo della ricerca: Api e agrofarmaci

Descrizione della ricerca:

Obiettivi specifici

Obiettivo della ricerca è la valutazione degli effetti sub-letali nei confronti delle api degli agrofarmaci di impiego più diffuso, mediante l'utilizzo di test etologici di laboratorio, semicampo e campo. La scelta di questa tipologia di prove rispetto ad altre, è dettata dall'esigenza di individuare eventuali comportamenti anomali verso le api adulte o danni alla covata indotti dagli agrofarmaci. Infatti, le sperimentazioni di tipo classico, impiegate essenzialmente per stabilire la DL₅₀ e il rischio di un principio attivo nei confronti delle api, sono normalmente adottate nei Centri di saggio nelle indagini di routine per l'omologazione dei prodotti fitosanitari.

Piano di attività

Prove di laboratorio

- *Proboscis Extension Reflex* (PER): il PER è un esame utilizzato per valutare la capacità associativa dell'ape adulta. Questo test viene utilizzato per valutare gli effetti sub-letali delle sostanze farmacologiche sulle capacità cognitive e sulla memoria delle api.

- Test del labirinto (*maze test*): la prova consiste nell'addestrare le api a volare attraverso un labirinto con percorsi diversi dei quali solo uno conduce ad una soluzione zuccherina. Le api vengono addestrate a seguire il percorso fino all'alimentatore, quindi dopo la somministrazione dell'agrofarmaco da studiare, gli viene sottoposto nuovamente il test. Questa prova serve a valutare eventuali effetti dei prodotti sulle capacità di orientamento e sulla memoria delle api.

Prove di semicampo

Si prevedono saggi all'interno di tunnel con la coltura trattata e non con l'agrofarmaco in studio. Nel periodo di fioritura nei tunnel saranno collocati nuclei di api che verranno lasciati bottinare sulla coltura. Oltre alla mortalità giornaliera e all'attività di bottinamento, saranno anche rilevati parametri relativi al comportamento delle bottinatrici, come la manifestazione di spasmi, problemi di mobilità, paralisi degli arti o altri comportamenti anomali da definire sulla base dell'agrofarmaco in studio.

Prove di campo

Prove di disorientamento delle api. La prova consiste nell'addestrare le api bottinatrici a visitare un alimentatore posto a distanza elevata dall'alveare, marcarle singolarmente con targhette numerate e quindi somministrargli il principio attivo per via orale o topica. Successivamente viene valutata la presenza di ogni singola ape sia all'alveare che all'alimentatore, per verificarne la capacità di orientamento.

Elaborazione di mappe di rischio per la presenza di fitofagi ipogei (mais). Le trappole per i rilievi di campo verranno installate e controllate in funzione delle caratteristiche biologiche e della fenologia dell'insetto target. La rete di campionamento sarà dimensionata rispetto a diversi fattori (estensione coltivazione mais, caratteristiche e conduzione agronomica, ecc.). Le postazioni andranno controllate una o due volte al mese da aprile a settembre.

Valutazione dell'utilità produttiva ed agronomica dei preparati per la concia delle sementi di mais. Semina di campi sperimentali parcellari ed allestimento di Prove Agronomiche in grado di mettere a confronto per ciascun ibrido commerciale, sementi conciate e non conciate. Si prevedono rilievi delle rese produttive, caratteristiche agronomiche e rilievi fitopatologici.

Valutazione della persistenza del principio attivo conciante a vari stadi di sviluppo della pianta di mais. Analisi del residuo dei principi attivi della concia, in vari tessuti a diversi stadi di sviluppo di piante germinate da seme trattato con prodotti concianti.

Risultati attesi

Le sperimentazioni descritte permetteranno di ottenere informazioni sugli effetti subletali degli agrofarmaci verso le api e la loro possibile ripercussione sullo stato di salute della colonia. 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. Le mappe di rischio per la presenza di fitofagi ipogei del mais e le valutazioni dell'utilità produttiva ed agronomica della concia delle sementi di questa coltura, servirà a capire la reale necessità del massiccio ricorso alla concia delle sementi di mais che si è praticato in questi anni.

Partecipanti

CRA-API; CRA-MAC; Dip. di Agronomia Ambientale e produzioni vegetali-Entomologia, Università di Padova; Centro Agricoltura e Ambiente "Giorgio Nicoli", Crevalcore, Bologna.

7. Istituzione: Università degli Studi di Napoli “Federico II”

Titolo della ricerca: Studio della risposta immunitaria di *Apis mellifera* e sua modulazione da parte di agenti di stress biotico e abiotico

Descrizione della ricerca:

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 diagnostica e la manipolazione di patogeni
3. Studio della risposta immunitaria di *A. mellifera* ad infezioni virali e di altri patogeni.
4. Analisi dell'effetto di agenti di stress biotici e abiotici sulla risposta dell'ape agli agenti patogeni considerati
5. Studio degli effetti dei patogeni su fisiologia e comportamento delle api.

Piano di attività

1. 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. L'approccio sperimentale prevede l'uso di tecniche per l'analisi trascrittomica, quali mRNA-Seq (presso l'IGA associato a UNIUD) o DNA microarrays, e proteomica (MALDI-TOF, LC-ES/MS/MS), 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 da UNIUD nell'ambito dell'obiettivo 1. Inoltre, i dati ottenuti nell'ambito dell'obiettivo 1 verranno utilizzati per effettuare analisi comparative del trascrittoma dei diversi campioni considerati dall'indagine metagenomica. Ciò consentirà di ottenere importanti informazioni circa le variazioni dei livelli di espressione di specifici geni in campioni di api provenienti da apiari interessati da fenomeni di collasso rispetto ad apiari di controllo. Attraverso poi opportune interpolazioni, si cercherà di identificare l'esistenza di pattern condivisi dai diversi apiari affetti e quindi di individuare network genici potenzialmente coinvolti nei fenomeni di collasso. L'andamento delle variazioni a carico di questi specifici network genici potrà infine essere seguito nel tempo attraverso l'analisi dei dati ottenuti durante il monitoraggio effettuato sulle api provenienti dallo stesso apiario.

2. Analisi dell'effetto di agenti di stress biotici e abiotici sulla risposta dell'ape agli agenti patogeni considerati

Scopo di questo obiettivo è quello di valutare se e come agenti di stress biotico (*Varroa destructor*) e abiotico (alimentazione non idonea e dosi sub-letali di agro farmaci, in particolari neonicotinoidi) influenzano le interazioni fra ape e patogeno, andando a modulare geni-chiave coinvolti nei meccanismi di risposta immunitaria e il livello di controllo dei patogeni considerati. L'approccio sperimentale che si intende adottare è quello di valutare l'impatto dei fattori di stress in esame sui livelli di moltiplicazione dei patogeni. Tali osservazioni verranno completate da analisi trascrittomiche e proteomiche, come sopra descritto. Tuttavia, l'individuazione di geni-chiave nell'ambito dell'obiettivo 3 potrà consentire indagini specifiche più mirate, con un approccio real-time PCR. Per quanto concerne le infezioni latenti da DWV, si procederà a mettere a punto un protocollo di laboratorio che consenta di indurre con infestazioni controllate di *V. destructor* l'insorgenza della malattia conclamata, al fine di valutarne l'impatto sui meccanismi di regolazione genica della risposta immunitaria durante questa complessa fase di transizione.

Risultati attesi

Per quanto concerne l'obiettivo 3, i risultati attesi consentiranno di fare chiarezza sui network di geni coinvolti nelle interazioni ospite-patogeno, evidenziando i meccanismi molecolari che consentono all'ape di tenere sotto controllo le comunissime infezioni latenti di DWV e di definire cosa cambia in questo meccanismo di regolazione allorquando la malattia si manifesta.

Partecipanti

Istituto di Genetica e Biofisica “A. Buzzati-Traverso”, CNR, Napoli; Università degli Studi della Basilicata, Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali, Potenza; Bee Research Laboratory, USDA-ARS, BARC-EAST Beltsville, USA.