

Scheda APENET Monitoraggio e ricerca in apicoltura

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

Studio effettuato dal Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria “Filippo Silvestri”, Facoltà di Agraria, via Università, 100 – 80055 Portici (NA)

Competenze dell’Unità Operativa in relazione al progetto

L’unità operante presso l’Università degli Studi di Napoli “Federico II” (UNINA) può contare su strutture e competenze di tre Dipartimenti, così come di seguito riassunto:

1) Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria “Filippo Silvestri”

Esperienza scientifica nel campo delle patologie di origine parassitaria del sistema immunitario degli insetti e delle patologie e parassitosi dell’ape. Sono disponibili strutture di laboratorio per studi biologici e molecolari, con annesso strutture per allevamenti di insetti.

2) Dipartimento di Scienza del Suolo, della Pianta, dell’Ambiente e delle Produzioni Animali

Piattaforma (DNA microarray, real-time PCR) per analisi del trascrittoma.

3) Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica

Piattaforma (MALDI-TOF, LC-ES/MSMS) per analisi del proteoma.

Collaborazioni esterne

Sono previste delle convenzioni esterne per consulenze, di seguito descritte.

1) Istituto di Genetica e Biofisica “A. Buzzati-Traverso”, CNR, via P. Castellino 111, 80131 Napoli

Attività prevista: valutazione dell’impatto dei neonicotinoidi sul sistema immunitario dell’ape, secondo protocolli e piani sperimentali definito di concerto con UNINA e UNIUD.

2) Università degli Studi della Basilicata, Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali, via dell’Ateneo Lucano 10, 85100 Potenza

Attività prevista: valutazione dell’impatto del regime alimentare sul sistema immunitario dell’ape, secondo protocolli e piani sperimentali definito di concerto con UNINA e UNIUD.

3) Università degli Studi di Firenze, Centro Interdipartimentale di Spettrometria di Massa

Attività prevista: studio delle Odorant Binding Proteins e Chemo Sensory Proteins e dei loro livelli di espressione correlati a modifiche comportamentali, in individui sottoposti a trattamenti con neonicotinoidi o ad infezione da patogeni/parassiti, condividendo con UNINA le analisi trascrittomiche e proteomiche.

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. Viene fornito, di seguito, un inquadramento generale dello stato dell'arte e degli obiettivi specifici di questa linea di ricerca.

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.

Recenti studi sembrano indicare nelle infezioni da Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV) un importante marcatore del Colony Collapse Disorder (CCD) in Nord America (Cox-Foster *et al.*, 2007). Le virosi delle api rappresentano patologie gravi e molto diffuse, la cui conoscenza non risulta ancora sufficientemente approfondita, soprattutto per quanto riguarda le modalità di trasmissione, il ruolo di eventuali vettori e il rapporto fra virus e vettore, nonché i meccanismi molecolari che consentono la transizione da una condizione di infezione latente ad una fase di malattia conclamata (Chen e Siede, 2007). Questi quesiti fondamentali sono ancora senza una precisa risposta, ma una loro corretta definizione e soluzione potrà essere illuminante per la comprensione del ruolo che può potenzialmente avere una compromissione del sistema immunitario di un organismo sociale come l'ape nella modulazione delle epidemie di patogeni stabilmente associati con infezioni sub-letali e asintomatiche molto diffuse.

Indagini miranti a definire l'impatto di stress ambientali, biotici e abiotici, sulla risposta immunitaria dell'ape e sui meccanismi di immunomodulazione delle infezioni virali sono di estrema importanza e potranno consentire di capire quali geni-chiave dell'ape siano coinvolti nel controllo della replicazione e diffusione dei virus e se e come il loro profilo di espressione possa essere condizionato da fattori esterni. Più 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).

L'approccio sperimentale proposto è reso possibile dalle crescenti informazioni di genomica funzionale delle interazioni ospite-patogeno negli insetti (Cherry e Silverman, 2006) e dalla risposta immunitaria dell'ape (Evans *et al.*, 2006), nonché dallo sviluppo di tecnologie avanzate che consentono un'analisi del genoma e del trascrittoma ad un livello di dettaglio molto elevato, che apre una nuova era nello studio della regolazione genica e della genomica funzionale (Graveley, 2008).

In definitiva, si ritiene che lo sviluppo di tali conoscenze sui meccanismi di difesa dell'ape e sulle basi molecolari delle interazioni ospite-patogeno potrebbe contribuire in modo significativo alla comprensione del fenomeno dello spopolamento, attraverso la definizione di un possibile ruolo centrale del sistema immunitario e delle sue risposte ai più svariati agenti di stress ambientale, di origine biotica e abiotica, inclusi i pesticidi.

Bibliografia

Chen Y. P., Siede R., 2007 – Honey bee viruses. *Adv. Virus Res.* 70: 33-80.

Cherry S, Silverman N., 2006 – Host pathogen interactions in *Drosophila*: new tricks from an old friend. *Nature Immunol.*, 7: 911-917.

Cox-Foster D. L. *et al.*, 2007 – A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318: 283-287.

Evans J. D. *et al.*, 2006 – Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.*, 15(5): 645-656.

Graveley B. R., 2008 – Power sequencing. *Nature*, 453: 1197-1198.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 7470-7475.

Obiettivi specifici

L'attività si pone i seguenti obiettivi (sottolineati quelli di competenza di UNINA):

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

Vengono di seguito descritte le attività di ricerca previste nell'ambito degli obiettivi in cui UNINA è coinvolta.

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.

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.

Le attività nell'ambito di questo obiettivo verranno svolte in collaborazione con UNIUD, che si affiancherà nella preparazione e caratterizzazione del materiale biologico da analizzare e renderà disponibili i dati di sequenza dell'indagine metagenomica.

4. 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 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.

Le attività nell'ambito di questo obiettivo verranno svolte in collaborazione con UNIUD, che si affiancherà nella preparazione e caratterizzazione del materiale biologico da analizzare.

Articolazione temporale delle attività

Nel corso del *primo anno*, le attività saranno concentrate sull'obiettivo 3, al fine di caratterizzare la risposta immunitaria dell'ape e le interazioni molecolari ospite-patogeno.

Nel corso del *secondo anno*, i risultati conseguiti serviranno da base per lo sviluppo delle attività previste nell'ambito dell'obiettivo 4, allo scopo di caratterizzare l'impatto dell'ambiente sulle difese immunitarie.

Ostacoli prevedibili ed azioni correttive

Il tipo di approccio sperimentale proposto per le analisi molecolari non presenta, in linea di principio, particolari ostacoli prevedibili. La parte più critica è la perfetta standardizzazione del materiale biologico, che deve essere verificata con particolare attenzione. Un'indesiderabile variabilità dei risultati dovrà essere analizzata cercando di capire in che misura essa sia da attribuire a tale aspetto della procedura sperimentale, al fine di modificare in modo opportuno i protocolli definiti.

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.

Per quanto concerne l'*obiettivo 4*, i risultati attesi dovrebbero fare luce su eventuali influenze dell'ambiente sui meccanismi di difesa dell'ape, valutando l'eventuale convergenza di fattori di diversi fattori di stress, biotici e abiotici, sugli stessi bersagli molecolari.

Ricadute e benefici

Lo studio proposto, oltre a fare luce su alcuni aspetti di base della risposta immunitaria dell'ape e delle interazioni molecolari fra essa e alcuni patogeni, in particolare il virus DWV, potrà consentire di sviluppare conoscenze sui meccanismi di controllo del ciclo di replicazione virale. Tali informazioni potrebbero contribuire alla comprensione del complesso fenomeno della CCD ed essere utilizzate per lo sviluppo di nuove strategie di controllo delle malattie virali dell'ape.