

Scheda APENET Monitoraggio e ricerca in apicoltura

Titolo: “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”.

Studio effettuato da: CRA – Unità di Ricerca di Apicoltura e Bachicoltura

Competenze dell’Unità Operativa in relazione al progetto:

Fra i compiti istituzionali dell’Unità di ricerca di apicoltura e bachicoltura vi sono quelli inerenti la sanità e lo sviluppo degli allevamenti apistici con riferimento ai metodi di profilassi delle malattie e analisi parassitologiche delle api. Lo studio dei migliori metodi d’allevamento e del potenziamento delle difese proprie delle colonie d’api sono da tempo oggetto d’indagine dell’U.O. attraverso studi, anche di portata internazionale, sulla biodiversità, la conservazione e la selezione delle popolazioni autoctone. Alcuni settori specifici di indagine riguardano l’applicazione di tecniche di biologia molecolare che, consentendo analisi a livello di DNA, si affiancano ai tradizionali strumenti di genetica quantitativa; altro settore specifico riguarda la sperimentazione e l’applicazione di programmi di biomonitoraggio ambientale mediante l’impiego di api. Nel corso di questi anni, in particolar modo nell’ultimo decennio, l’attività, nei vari settori operativi e sul piano nazionale, si è andata sempre più ampliando anche in funzione dello sviluppo dell’apicoltura che è diventata, per alcune componenti, da settore prevalentemente marginale dell’agricoltura, a settore professionistico, organizzato in forma associativa.

Collaborazioni esterne

UNIUD: analisi biochimiche sull’emolinfa; prove in vitro di interazione fra patogeni;

UNISS: valutazioni dell’impatto dei parametri micro e macroclimatici e del livello nutrizionale sul benessere delle colonie;

UNIFI: dr Antonio Felicioli, Dipartimento di Anatomia, Biochimica e Fisiologia Veterinaria – Università di Pisa

Istituto di Fisica Applicata “Nello Carrara” del Consiglio Nazionale delle Ricerche: valutazione impatto dei campi elettromagnetici sul benessere delle colonie;

Länderinstitut für Bienenkunde Hohen Neuendorf e.V.: elaborazione ed analisi dati interazioni genotipo-ambiente;

Karl-Franzens-University Graz, Department for Zoology: analisi biochimiche per valutazione stato benessere di singole api;

Aarhus Universitet, Faculty of Agricultural Sciences, Dept. of Integrated Pest Management: screening DNA per caratterizzazione ecotipi;

ARPA-Emilia-Romagna: rilevamento ed elaborazione dati climatici;

CRA-CMA: elaborazione dati ambientali; per questa attività al saranno destinati all’unità di ricerca 5.000 Euro.

Istituzioni locali competenti (Servizi fitosanitari regionali, Enti di ricerca, ecc.) delle regioni interessate alle sperimentazioni; apicoltori delle Associazioni apistiche coinvolte nella ricerca.

Descrizione della ricerca:

Stato dell’arte

Negli ultimi 2-3 anni, in diversi Paesi fra cui il nostro, sono stati segnalati gravi episodi di mortalità di colonie d’api (Higes *et al.*, 2006; Gonzales, 2007; Stockstad, 2007). A livello internazionale si è concordi nell’affermare che difficilmente esiste un’unica causa valida per ogni episodio segnalato, ma che diversi fattori agiscano simultaneamente o singolarmente, variando negli anni a seconda delle situazioni contingenti che si possono creare. I fattori ritenuti responsabili dell’aumento di mortalità delle colonie sono: i patogeni dell’alveare, i trattamenti fitosanitari, il cambiamento climatico, la riduzione della variabilità genetica delle popolazioni di api, la diminuzione e l’uniformità delle fonti alimentari e ancora altri possibili fattori, tra cui sono indicati i campi elettromagnetici. Tali fattori influiscono anche sulla gestione delle colonie da parte degli apicoltori; ad esempio, l’elevata infestazione da varroa nell’estate 2007, unitamente alla notevole siccità nei mesi di Luglio e Agosto, con conseguente carenza di sostanze alimentari per le colonie (soprattutto polline per l’allevamento della covata), ha fatto sì che molti apicoltori interrompessero precocemente la produzione per iniziare i trattamenti. Questi ultimi, a causa del fenomeno della reinfestazione, sono

stati protratti anche oltre il consueto periodo, con frequenza ravvicinata e con svariate sostanze, andando a disturbare l'allevamento delle "api invernali". Gli interventi climatici e quelli umani potrebbero quindi da un lato aver favorito la riproduzione delle forme virali responsabili del collasso delle colonie, e dall'altro stressato chimicamente le colonie in un momento così delicato come la preparazione all'inverno. Questi fattori potrebbero essere valutati tramite l'analisi quali-quantitativa delle componenti proteiche (analisi proteomica), una branca dell'indagine biologica che è applicata, con crescenti successi, allo studio di molti processi biologici quali la modulazione di fattori proteici che presiedono al controllo della trascrizione nella biologia dello sviluppo, delle risposte alle variate condizioni ambientali e dell'effetto dei farmaci.

Inoltre, è probabile che esistano interazioni sinergiche tra fattori biotici e/o abiotici, su cui ancora molto rimane da scoprire, poiché le infestazioni multiple di altri patogeni con *Varroa* sono inevitabili, data l'ubiquità del parassita. Anche altri parassiti, quali il microsporide di recente introduzione *Nosema ceranae*, ritenuto da alcuni autori come il più probabile responsabile del fenomeno di spopolamento (Higes *et al.*, 2008), è stato segnalato come presente nella maggior parte degli alveari negli Stati Uniti (Cox-Foster *et al.*, 2007) e in Europa sembra addirittura aver rimpiazzato il microsporide tradizionalmente parassita di *A. mellifera*, *Nosema apis*. E' quindi verosimile che possano essersi instaurati dei meccanismi d'interazione tra questo parassita emergente ed altri fattori.

I fattori sopra menzionati influiscono su una popolazione di api la cui diversità genetica, a livello europeo, è ridotta, a causa delle pratiche di miglioramento genetico che hanno utilizzato alcune linee per la riproduzione di migliaia d'individui. Inoltre, le caratteristiche selezionate dagli allevatori per ottenere api facilmente maneggiabili ed altamente produttive, potrebbero essere andate a discapito di quelle caratteristiche invece necessarie alla colonia per superare le avversità. Le variabilità genetica delle popolazioni di api selvatiche in Europa sono fortemente ridotte a causa della presenza dell'acaro *Varroa*; le api allevate, per la peculiare caratteristica di accoppiamento delle api, in cui la regina si accoppia con molti fuchi a distanza di alcuni Km dall'alveare, scambiano il loro patrimonio genetico con le popolazioni selvatiche. Ciò significa che la maggior parte delle popolazioni attuali di api potrebbe aver perso alcune caratteristiche importanti per la difesa della colonia dai fattori di stress. Inoltre, è comunemente in uso la pratica di utilizzare regine di diversa origine geografica, senza tener conto del fatto che popolazioni locali potrebbero essere maggiormente in grado di tollerare situazioni avverse. Per questo motivo, è importante valutare l'esistenza di interazioni tra genotipo delle api allevate e ambiente, ed individuare le caratteristiche di tolleranza agli stress ambientali delle popolazioni autoctone. Inoltre, alla luce dei cambiamenti climatici in atto, sarà utile ottenere informazioni sulle possibili modalità di reazione delle colonie a situazioni climatiche caratterizzate da temperature invernali più elevate e da prolungati periodi di siccità, osservabili in sottospecie che si sono evolute in condizioni naturali di questo tipo, quali la razza siciliana *A. m. siciliana*.

Riferimenti bibliografici:

González, R. (2007). Crisis Apícola Argentina: se estima más de 1.450.000 colmenas muertas. [WWW document]. URL <http://www.noticiasapicolas.com.ar>.

Higes, M., Martín, R., and Meana, A. (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J Invertebr Pathol* 92: 93–95.

Stokstad, E. (2007). The case of empty hives. *Science Magazine*. [WWW document]. URL <http://www.sciencemag.org/cgi/reprint/316/5827/970.pdf>. DOI: 10.1126/science.316. 5827.970.

Higes M., Martín-Hernández R., Botías C., Garrido Bailón E., González-Porto A. V., Barrios L., del Nozal M. J., Bernal J. L., Jiménez J. J., García Palencia P., Meana A. (2008). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology* 10, 2659–2669.

Cox-Foster D.L., Conlan S., Holmes E., Palacios G., Evans J.D., Moran N.A. *et al.* (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318: 283–287.

Obiettivi specifici

Per valutare il ruolo dei vari fattori 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 famiglie, 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) 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. 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 caratteristiche degli emociti ed il titolo di ectosteroidi e di vitellogenina 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) L'esecuzione dell'elettroforesi bidimensionale verrà eseguita su campioni di gelatina reale prodotta da api nutrici esposte ai farmaci oggetto di indagine. Le corse elettroforetiche saranno ripetute tre volte per ciascun campione con il risultato della produzione di gel definiti "sintetici" che facciano da riferimento per valutazioni comparative. Seguirà la digitalizzazione, catalogazione, archiviazione dei gel ed infine al confronto che verterà sull'analisi quali-quantitativa degli spot risolti; si procederà poi all'identificazione degli spot ritenuti di interesse o per intensità di espressione o per presenza/assenza relativamente ai diversi tipi di campioni reperiti. Gli spot saranno, tramite scissione e digestione, analizzati per spettrometria di massa MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight) come prima scelta e nel caso la sequenza nucleotidica o aminoacidica della proteina in esame non sia presente nelle banche dati si ricorrerà a tecniche di "De novo sequencing" o ne sarà determinata la sequenza ammino-terminale mediante il sequenziatore di Edman. L'identificazione degli spot sarà effettuata mediante collaborazioni esterne o mediante servizio esterno a pagamento.

3) Per la valutazione delle interazioni genotipo-ambiente, ci si avvalerà della 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. siciliana*, e tramite confronti in loco con la sottospecie commercialmente utilizzata *A. m. ligustica*, anche in termini di capacità di reazione ai principali patogeni.

4) L'eventuale impatto dei campi elettromagnetici sugli spopolamenti degli alveari, verrà effettuata individuando un'area che sia sede di una attività di apicoltura ampia e ben documentata e interessata dalla presenza di numerose sorgenti di campi elettromagnetici (elettrodotti, stazioni di diffusione radiotelevisiva, stazioni radio base per la telefonia cellulare). Si definiranno degli indici di esposizione che permettano di esprimere sinteticamente il livello di esposizione di una particolare località per valutare l'esposizione degli alveari, sviluppando ed utilizzando opportuni modelli per la stima dei livelli di campo prodotti dalle sorgenti e la deduzione degli indici di esposizione. Si trarranno le possibili conclusioni in merito ai livelli di esposizione media ai campi elettromagnetici tra gli alveari selezionati e all'eventuale correlazione con gli indicatori dello stato di salute degli stessi.

Articolazione temporale delle attività

1) 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. Gli apiari sperimentali verranno allestiti a partire dalla primavera del primo anno in zone consone al tipo di infestazione richiesto. Durante la stagione estiva ed autunnale verranno prelevate le api necessarie alle prove in vitro. Si prevedono repliche l'anno successivo con eventuali opportune modifiche.

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. L'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) 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. Le previste valutazioni delle colonie e le analisi risultanti verranno eseguite nel secondo anno. Durante la primavera del primo anno si allestiranno 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. Nel secondo anno verranno sviluppate ed applicate le metodiche per la determinazione degli indici di esposizione nelle posizioni occupate dagli alveari coinvolti nello studio. Alla fine dei due anni verrà fatto un raffronto tra gli indicatori dello stato di salute e gli indici di esposizione ai campi elettromagnetici per gli alveari coinvolti.

Ostacoli prevedibili ed azioni correttive

Per quanto riguarda la valutazione dei parametri microclimatici nelle colonie, non si prevedono particolari ostacoli.

Per le linee di ricerca 1 e 3, un'eventuale difficoltà potrebbe consistere nella variabilità dei risultati in dipendenza delle condizioni climatiche delle stagioni in cui le prove saranno eseguite. In particolare, per la linea di ricerca 1, bisognerà porre particolare attenzione alla messa a punto dei metodi d'infezione sperimentale, in quanto lievi differenze nelle somministrazioni o nel reperimento degli individui da trattare, potrebbero portare ad una variabilità dei risultati attesi. Anche in questo caso potrebbe rendersi necessario, al fine di ottenere risultati affidabili, replicare le sperimentazioni per più anni consecutivi.

Per la linea di ricerca 4, la possibilità di svolgimento è subordinata alla disponibilità dei dati relativi alla posizione georiferita ed allo stato di salute degli alveari presenti nelle aree selezionate per lo studio. Per questo aspetto, è indispensabile la collaborazione delle associazioni e delle organizzazioni degli apicoltori.

Risultati attesi

I risultati attesi sono i seguenti:

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.

Ricadute e benefici

Alla luce dei recenti avvenimenti sugli estesi fenomeni di mortalità delle api, la definizione delle ottimali condizioni di allevamento per l'ottenimento di un maggior stato di benessere delle colonie, può fornire indicazioni sulle migliori modalità di gestione delle colonie, in termini di tipi genetici da allevare, stati nutrizionali, modalità dei trattamenti e tecniche di accudimento degli alveari. Inoltre la definizione delle dinamiche ospite-parassita può facilitare l'individuazione delle strategie e delle tempistiche dei trattamenti. La migliore comprensione del ruolo della vitalità e della diversità genetica nella tolleranza ai patogeni può essere d'aiuto nel recupero e nel mantenimento di caratteristiche genetiche maggiormente adattate all'ambiente, con conseguente riduzione delle perdite di colonie.