



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE

---

Dottorato di Ricerca in Scienze e Biotecnologie Agrarie  
Ciclo XXIV  
Coordinatore: prof. Mauro Spanghero

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**Interazioni nel sistema**  
***Apis mellifera-Varroa destructor-Deformed Wing Virus***  
**e collasso delle colonie d'api**

DOTTORANDO  
dott. Desiderato Annoscia

SUPERVISORE  
dott. Francesco Nazzi

---

ANNO ACCADEMICO 2010/2011

# INDICE

<b>RIASSUNTO</b> .....	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>4</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>7</b>
1.1. <i>L'ape e la sua importanza per l'ambiente e l'economia</i> .....	7
1.2. <i>Le morie di api</i> .....	9
1.2.1. <i>Il Colony Collapse Disorder negli Stati Uniti</i> .....	10
1.2.2. <i>Le morie in Europa</i> .....	11
1.3. <i>Le possibili cause</i> .....	13
1.4. <i>Le cause più probabili</i> .....	21
1.4.1. <i>Varroa destructor</i> .....	22
1.4.2. <i>Deformed Wing Virus (DWV)</i> .....	24
1.4.3. <i>Interazioni V. destructor-DWV</i> .....	26
1.5. <i>Considerazioni generali sugli approcci adottati finora negli studi sul fenomeno</i> .....	28
1.6. <i>I meccanismi di difesa negli insetti</i> .....	30
1.6.1. <i>Il tegumento</i> .....	30
1.6.2. <i>Il sistema immunitario degli insetti</i> .....	32
1.7. <i>I meccanismi di difesa in A. mellifera</i> .....	40
1.7.1. <i>La difesa a livello di colonia</i> .....	40
1.7.2. <i>La difesa a livello di individuo: il sistema immunitario dell'ape</i> .....	40
1.8. <i>Obiettivi della ricerca</i> .....	43
<b>2. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>45</b>
2.1. <i>Premessa</i> .....	45
2.2. <i>Il piano sperimentale</i> .....	47
2.3. <i>Eziologia e sintomatologia del collasso della colonia (cause prossime del collasso)</i> .....	50
2.3.1. <i>Prova di campo</i> .....	50
2.3.2. <i>Analisi metagenomica</i> .....	53
2.3.3. <i>Analisi PCR dei virus delle api</i> .....	54
2.4. <i>Cause remote del collasso</i> .....	56
2.4.1. <i>Api e acari usati nelle prove di laboratorio</i> .....	56
2.4.2. <i>Effetto dell'infestazione sulla replicazione virale</i> .....	56
2.4.3. <i>Allevamento delle api in laboratorio</i> .....	57

2.4.4. Effetto dell'infezione virale sulla sopravvivenza delle api .....	58
2.4.5. RNA-seq.....	60
2.4.6. Effetto dell'infestazione sull'espressione di <i>dorsal-1A</i> .....	61
2.4.7. RNAi .....	61
2.5. <i>Ulteriori cause di mortalità delle api</i> .....	63
2.5.1. Effetto dell'infestazione sulla sopravvivenza delle api.....	63
2.5.2. Influenza del peso allo sfarfallamento sulla longevità delle api .....	63
2.5.3. Determinazione del contenuto idrico delle api.....	64
2.5.4. Dinamica della perdita di peso nell'ape: dallo stadio di pupa a quello di adulto .....	64
2.5.5. Estrazione dei lipidi totali .....	65
2.5.6. Estrazione degli idrocarburi cuticolari delle api e analisi GC-MS.....	65
2.5.7. Effetto dell'umidità sulla sopravvivenza delle api .....	66
2.6. <i>Analisi statistica</i> .....	67
<b>3. RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>69</b>
3.1. <i>Eziologia e sintomatologia del collasso (cause prossime del collasso)</i> .....	69
3.1.1. Dinamica di popolazione negli alveari.....	69
3.1.2. Mortalità delle api .....	71
3.1.3. Infestazione delle colonie.....	72
3.1.4. Analisi metagenomica .....	73
3.1.5. Prevalenza dei virus nelle colonie.....	74
3.1.6. Quantificazione di DWV negli alveari sperimentali .....	76
3.2. <i>Cause remote del collasso</i> .....	77
3.2.1. Effetto dell'infestazione sulla replicazione virale .....	77
3.2.2. Effetto dell'infezione virale sulla sopravvivenza delle api .....	78
3.2.3. Sistema immunitario dell'ape e collasso della colonia .....	79
3.2.4. Effetto dell'infestazione sull'espressione di <i>dorsal-1A</i> .....	81
3.2.5. RNAi .....	82
3.2.6. Interazioni <i>V. destructor</i> -DWV.....	83
3.3. <i>Ulteriori cause di mortalità delle api</i> .....	84
3.3.1. Effetto dell'infestazione sulla deformità delle ali .....	85
3.3.2. Influenza dell'infestazione e dell'infezione virale sulla sopravvivenza delle api.....	86
3.3.3. Influenza della sola infestazione sulla sopravvivenza delle api .....	87
3.3.4. Influenza dell'infestazione e dell'infezione virale sul peso delle api .....	88
3.3.5. Influenza del peso sulla sopravvivenza delle api .....	89
3.3.6. Contenuto idrico delle api .....	91
3.3.7. Dinamica della perdita di peso nell'ape: dallo stadio di pupa a quello di adulto .....	92

3.3.8. Estrazione degli idrocarburi cuticolari delle api e analisi GC-MS.....	93
3.3.9. Effetto dell'umidità sulla sopravvivenza delle api.....	95
<b>4. CONCLUSIONI.....</b>	<b>97</b>
<b>Ringraziamenti.....</b>	<b>99</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>100</b>
<b>APPENDICE.....</b>	<b>109</b>

## RIASSUNTO

Negli ultimi anni, in tutto il mondo, sono state registrate gravi perdite di alveari. Negli Stati Uniti d'America, le morie di api sono state attribuite a una sindrome sconosciuta, chiamata Colony Collapse Disorder (CCD). Recenti studi suggeriscono che il CCD sia causato dall'interazione fra patogeni e altri fattori di stress, fra i quali l'acaro parassita *Varroa destructor* Anderson & Trueman sembra svolgere il ruolo più importante. Altre ricerche scientifiche condotte in Europa sulle morie invernali delle colonie di api indicano il coinvolgimento della varroa e dei virus delle api.

Sebbene il possibile ruolo della varroa nel collasso delle colonie sia supportato da molti dati e la capacità del parassita di trasmettere virus sia già stata dimostrata, le basi meccanicistiche e le proprietà dinamiche di questa pericolosa associazione parassita-patogeno restano ancora da chiarire.

Il presente lavoro si propone di far luce sulle interazioni fra l'acaro parassita *V. destructor* e gli altri patogeni, con particolare riferimento al virus delle ali deformi (Deformed Wing Virus – DWV), allo scopo di ricavare informazioni dettagliate sul fenomeno del collasso delle colonie d'api.

In prima istanza sono state indagate le cause prossime del collasso della colonia.

Per far ciò, sono stati allestiti due apiari sperimentali; uno ha ricevuto i trattamenti acaricidi convenzionali contro la varroa (colonie poco infestate – CPI), mentre l'altro non è stato trattato contro il parassita (colonie molto infestate – CMI). Nello studio è stato adottato un approccio “longitudinale” che prevedeva visite e campionamenti periodici di covata e api adulte, al fine di monitorare nel tempo gli effetti di un eventuale incremento della popolazione di varroa e altri patogeni sulla mortalità delle api.

Durante l'estate, è stato osservato un declino della popolazione di api in tutte le colonie sperimentali. Tale fenomeno, però, è stato più marcato nelle CMI, dove la mortalità delle api è cresciuta in maniera repentina a fine stagione.

L'andamento temporale, gradualmente crescente, dell'infestazione da *V. destructor* non è risultato del tutto sovrapponibile al trend osservato per la mortalità

delle api, suggerendo il coinvolgimento di altri fattori di mortalità. Tuttavia, né l'analisi metagenomica né le indagini riguardanti la presenza dei virus delle api negli alveari in prova hanno rivelato alcuna differenza qualitativa fra le CMI, perlopiù collassate a fine stagione e le CPI, che invece sono sopravvissute.

Da un punto di vista quantitativo, invece, nelle colonie sottoposte alla maggiore pressione dell'acaro è stato registrato un numero di copie di DWV 1000 volte più alto rispetto alle colonie poco infestate.

In seguito, sono state prese in esame le cause remote del collasso della colonia.

In particolare, esperimenti di laboratorio hanno evidenziato come l'attività trofica della varroa promuova la replicazione del virus nelle api, le quali manifestano un tasso di mortalità direttamente proporzionale alla carica virale.

Inoltre, l'analisi trascrittomico di api adulte campionate dagli alveari sperimentali a fine stagione, quando l'infestazione e la carica virale sono più elevate, ha evidenziato una grave alterazione nell'espressione dei geni del sistema immunitario dell'ape. In particolare, la sotto-espressione di *dorsal-1A*, un membro appartenente alla famiglia di geni NF- $\kappa$ B, indica come l'interazione fra il patogeno e il parassita interferisca con l'attivazione delle risposte immunitarie messe in atto dall'ape.

L'attività trofica della varroa in assenza di infezione da DWV non pare influenzare il livello di espressione di *dorsal-1A* nelle api, suggerendo che l'effetto immunosoppressivo sia determinato principalmente dal virus.

Il significativo incremento del numero di copie di DWV, osservato in seguito all'inibizione della trascrizione di *dorsal-1A*, ha dimostrato che tale gene svolge un ruolo cruciale nella risposta immunitaria antivirale dell'ape.

Infine, sono state indagate in laboratorio le ulteriori cause di mortalità delle api, ponendo l'attenzione ai danni provocati dalla varroa nel caso in cui la replicazione virale non raggiunga i livelli che determinano gli effetti appena descritti.

Per studiare l'effetto della parassitizzazione sulla mortalità delle api, sono state infestate artificialmente con nessuna, 1 o 3 varroe larve di api allevate in cellette di gelatina. Allo sfarfallamento, le api infestate sono risultate significativamente più leggere rispetto a quelle controllo ed è stata riscontrata una correlazione diretta fra il peso e la longevità delle api parassitate dall'acaro.

Il minor peso delle api infestate è dovuto al ridotto contenuto idrico. L'analisi al gas-cromatografo degli estratti in esano delle api infestate ha evidenziato effetti a carico degli idrocarburi cuticolari; è verosimile che l'alterazione del rivestimento lipidico presente sul tegumento degli insetti impedisca alle api infestate di svolgere una corretta igroregolazione, determinandone la morte prematura, specie in condizioni di bassa umidità relativa.

Nel complesso, i risultati ottenuti hanno permesso di ricavare una descrizione dettagliata del collasso delle colonie d'api indotto da *V. destructor*, premessa essenziale di ogni possibile intervento volto a prevenire tale evenienza.

## SUMMARY

In the last few years, large-scale losses of honeybees (*Apis mellifera* L.) have been recorded all over the world.

In the United States of America, colony losses were attributed to a poorly understood syndrome, called Colony Collapse Disorder (CCD). Recent studies suggest that CCD involves an interaction between pathogens and other stress factors, among which the parasitic mite *Varroa destructor* Anderson & Trueman seems to play an important role. Researches carried out in Europe on winter losses of honeybee colonies indicate that both the *Varroa* mite and bee viruses are involved.

Even though the possible role of the *Varroa* mite in colony losses is supported by a wealth of data and its active vectoring of bee viruses is demonstrated, the mechanistic basis and dynamical properties of this dangerous association still remain poorly defined.

The present work aimed at studying the interactions between the parasitic mite *V. destructor* and the associated viruses, particularly the Deformed Wing Virus (DWV), in order to that gain a satisfactory description of the collapse of honeybee colonies.

At first, the proximate causes of the colony collapse were investigated.

To do so, we set up two experimental apiaries, one of which received conventional acaricide treatments to control the mite infestation, while the other was left untreated. A “longitudinal” approach was adopted in this study involving periodical visits and samplings of brood and adult bees, in order to monitor the effects of the increasing *Varroa* mite population on the associated viruses and bee mortality.

During the summer, a steady decline of honeybee population was observed in all experimental colonies but the effect was much more pronounced in the highly infested colonies, where the mortality of bees suddenly increased at the end of the season. On the other hand, the time course of mite infestation did not mirror the trend observed in bee mortality suggesting that other mortality factors were involved. However, neither the metagenomic analysis nor the molecular survey of bee viruses revealed any qualitative difference between the high and low infested colonies.



Instead, a significant quantitative difference was found between the two groups of hives in the severity of DWV infection, with the bees from highly infested colonies bearing a number of DWV genome copies 1000 times higher compared to the bees exposed to a lower mite pressure.

Later, the remote causes of colony collapse were investigated.

In particular, laboratory experiments showed that the mite feeding triggers viral replication in bees, which show a mortality rate that is positively associated with the viral load.

Moreover, a transcriptomic analysis of adult bees sampled from the experimental colonies at the end of the season revealed a severe alteration of the transcriptional profile of the immune genes in the highly infested colonies. In particular, the marked transcriptional down-regulation of *dorsal-1A*, a member belonging to the NF- $\kappa$ B gene family, indicates that the pathogen-parasite interaction can interfere with the activation of the immune response in the honeybee.

The *Varroa* mite feeding activity in absence of DWV infection did not seem to influence the expression level of *dorsal-1A* in honeybees, suggesting that the immunosuppressive effect is largely driven by the virus.

The significant increase of DWV genome copies in response to *dorsal-1A* knockout by RNAi showed that this gene plays a crucial role in the antiviral immune response of the honeybees.

Finally, other possible causes of bee mortality were studied. In particular, the damage caused by the *Varroa* mite, when viral replication is below the levels accounting for the effects that were described above, was studied under lab conditions.

To do so, honeybee larvae were artificially infested with none, 1 and 3 *Varroa* mites; at the eclosion, the infested bees were significantly lighter than controls and a direct correlation between weight and longevity of the parasitized bees was noted. The lower weight of infested bees was caused by the reduced water content; the GC-MS analysis of cuticular extracts, revealed an effect at the expenses of cuticular hydrocarbons. This alteration of the lipid coating of the insects tegument may disrupt hygroregulation in parasitized bees causing, in turn, their premature death, especially under low relative humidity conditions.

Overall the results allow to draw a mechanistic description of honeybee colony collapse, an essential prerequisite of any possible action to prevent such undesirable event.

# 1. INTRODUZIONE

## *1.1. L'ape e la sua importanza per l'ambiente e l'economia*

Le api sono imenotteri appartenenti al genere *Apis*, incluso nella famiglia Apidi. In molte aree del mondo, la specie di ape più allevata è *Apis mellifera* L., un insetto sociale che vive in famiglie costituite da migliaia di individui. Le colonie d'api vivono su favi di cera costruiti entro cavità naturali (tronchi d'albero cavi, anfratti di roccia, ecc.) o contenitori di varia forma forniti dall'uomo (arnie). All'interno di un alveare si trovano insetti di sesso maschile e femminile, appartenenti a diverse caste.

L'ape regina è l'unica femmina feconda presente nell'alveare, in quanto dotata di ovari sviluppati e una struttura atta a preservare gli spermatozoi accumulati durante l'unico accoppiamento coi fuchi. La regina vive in media 3-4 anni. Oltre a mantenere la famiglia coesa mediante il rilascio di feromoni, il compito principale dell'ape regina è la deposizione delle uova.

Anche le api operaie sono di sesso femminile tuttavia, essendo i loro organi riproduttori atrofizzati, assolvono mansioni diverse in base all'età. Esse vivono mediamente 40 giorni: le prime tre settimane vengono spese nell'alveare, svolgendo nell'ordine compiti di pulizia delle cellette, nutrizione della covata, costruzione dei favi di cera, conservazione delle scorte e difesa della colonia; i giorni successivi, le api operaie si dedicano alla raccolta di nettare, polline, propoli e acqua, elementi necessari al sostentamento della famiglia intera.

I fuchi sono individui di sesso maschile; essi vivono in media 50 giorni, durante i quali, oltre ad accoppiarsi con l'ape regina, producono calore utile a scaldare la covata.

Nei climi temperati, in primavera e in estate, quando le risorse di nettare e polline sono abbondanti, una colonia di api è costituita da un'unica regina, 20000-60000 api operaie adulte, 10000-30000 api operaie immature, a diversi stadi di sviluppo (uovo, larva e pupa), in altrettante cellette di covata, qualche centinaio di fuchi immaturi in cellette di covata e altrettanti individui maschi adulti.

La covata viene allevata singolarmente in cellette di cera, che sono aperte durante la fase di uovo e larva (9 giorni per l'ape operaia), mentre vengono opercolate durante

la fase di pupa (12 giorni per l'ape operaia). La cella rimane chiusa fino alla completa formazione dell'adulto, che si compie complessivamente in 16 giorni per l'ape regina, 21 giorni per l'ape operaia e 24 giorni per il fuco. La produzione di covata rallenta in autunno per poi fermarsi durante l'inverno, quando l'ape regina e 8000-15000 api operaie adulte svernano nell'alveare, rallentando il proprio metabolismo e consumando le scorte di miele e polline fino alla primavera successiva (Winston, 1987).

Il rapporto dell'uomo con le api ha origini antichissime e l'apicoltura è praticata da secoli (Crane, 1990).

I prodotti delle api, utilizzati come alimento o come additivi nei preparati farmaceutici e nei medicinali, sono oggetto di un fiorente mercato. Ancora più apprezzabile, da un punto di vista strettamente economico, è il servizio di impollinazione che le api svolgono a favore di 39 delle 57 monoculture più importanti al mondo (Klein *et al.*, 2007).

*A. mellifera* è senza dubbio il più prezioso insetto impollinatore usato in agricoltura, in quanto è facilmente allevabile e trasportabile in prossimità delle colture. È stato stimato che circa il 35% del cibo che l'uomo consuma dipende direttamente (attraverso l'impollinazione di frutta e colture vegetali in generale) o indirettamente (tramite l'impollinazione di campi coltivati a foraggio per il bestiame) dall'attività svolta dalle api. Mentre il valore diretto del miele prodotto da questi insetti nell'Unione Europea è di circa 140 milioni di Euro, il valore aggiunto totale per il servizio di impollinazione delle colture è stato stimato nel 2005 in 14,2 miliardi di Euro. In tutto il mondo, invece, il valore economico totale dell'impollinazione svolta dalle api, sempre nel 2005, è stato pari a 153 miliardi di Euro (Moritz *et al.*, 2010).

Non va infine dimenticato il valore dell'impollinazione svolta gratuitamente dalle api per la conservazione della biodiversità vegetale naturale, che è semplicemente inestimabile.

Alla luce del costante declino osservato anche per gli impollinatori diversi da *A. mellifera* (Cameron *et al.*, 2011), l'importanza delle api allevate è oggi sempre maggiore.

## ***1.2. Le morie di api***

Nell'ultimo secolo è stata registrata una marcata diminuzione dell'attività apistica sia negli Stati Uniti sia in Europa, come dimostra il numero decrescente di colonie di api allevate (Ellis *et al.*, 2010; Potts *et al.*, 2010).

Secondo il National Agricultural Statistics Service, il numero di colonie d'api allevate negli Stati Uniti è diminuito costantemente dal 1940 a oggi; la situazione si è aggravata in seguito alla comparsa negli USA dell'acaro parassita *Varroa destructor* (Ellis *et al.*, 2010). È possibile che la flessione dell'apicoltura rifletta sia le perdite biologiche delle colonie sia l'abbandono dell'attività da parte di molti apicoltori, a causa delle spese extra e degli sforzi necessari per far fronte alle avversità varie che affliggono le api domestiche.

Un andamento analogo è stato documentato anche in Europa (Potts *et al.*, 2010) dove, al devastante impatto della varroa negli anni '70, si è aggiunto il cambiamento socio-culturale dell'Europa dell'Est negli anni '90. In seguito alla mancanza del sostegno statale, infatti, molti apicoltori dei paesi socialisti hanno abbandonato l'attività, determinando la riduzione del 50% del numero di colonie presenti nel vecchio continente (Moritz *et al.*, 2010).

Ad aggravare questo trend negativo, fra il 2006 e il 2007 sono state registrate negli Stati Uniti diffuse morie di alveari (vanEngelsdorp *et al.*, 2007), che sono proseguite anche nel 2008 (vanEngelsdorp *et al.*, 2008). Tali morie, però, non si sono verificate solo in USA, ma anche in altre parti del pianeta e in particolare in Europa (Neumann e Carreck, 2010).

Le perdite di api registrate di recente hanno ricevuto una notevole attenzione da parte dell'opinione pubblica e si sono moltiplicati i titoli plateali e gli articoli allarmistici aventi per oggetto l'imminente scomparsa delle api e degli insetti impollinatori in generale (Benjamin e McCallum, 2008; Coyaud, 2008).

Un attento esame dei precedenti storici dimostra tuttavia che le perdite estese di alveari non sono un fenomeno così recente o insolito, ma sono state registrate periodicamente laddove l'apicoltura è praticata da secoli in maniera più o meno razionale (950, 992 e 1443 “the great mortality of bees” in Irlanda; 1960-1970 “the disappearing disease” negli USA; 1980-1990 “bee parasitic mite syndrome” in Europa) (Moritz *et al.*, 2010). Il caso più famoso e documentato di estese morie di alveari risale

a un secolo fa (1906), quando gli apicoltori dell'Isola di Wight (Gran Bretagna) denunciarono la morte misteriosa di numerose colonie d'api (Oldroyd, 2007).

Nonostante nel passato siano già stati registrati degli spopolamenti di alveari, la magnitudine e la velocità del declino degli alveari che è stata osservata nell'ultimo quinquennio è probabilmente senza precedenti. Di conseguenza, si stanno compiendo grandi sforzi di ricerca su vasta scala per determinare la causa delle morie delle colonie d'api, nel tentativo di rallentarle o arrestarle.

### *1.2.1. Il Colony Collapse Disorder negli Stati Uniti*

Nell'inverno 2006-07, alcuni apicoltori statunitensi segnalavano la perdita del 30-90% delle colonie d'api da loro possedute. Poiché gli alveari morti presentavano sintomi specifici e nel complesso non associabili a quelli prodotti dai parassiti e dai patogeni noti delle api, per indicare questa sindrome misteriosa fu coniato il nome di Colony Collapse Disorder (CCD) (vanEngelsdorp *et al.*, 2008).

Nel tentativo di rimuovere i dubbi che circondavano il CCD, gli scienziati statunitensi hanno definito alcuni dei sintomi associati al fenomeno: 1. completa assenza delle api bottinatrici negli alveari; 2. presenza di covata opercolata; 3. presenza di scorte di miele e polline che non sono saccheggiate da altri alveari o attaccate dagli insetti che tipicamente colonizzano i favi non presidiati dalle api (es. *Galleria mellonella* L. e *Aethina tumida* Murray). Inoltre, i sintomi del CCD sono stati spesso associati all'indebolimento delle colonie, che si manifesta con: 1. insufficiente numero di api per allevare la covata presente nell'alveare; 2. rinvenimento esclusivo di giovani api di casa; 3. presenza dell'ape regina; 4. riluttanza da parte delle api rimaste a consumare l'alimentazione stimolante fornita loro dall'apicoltore (Ellis *et al.*, 2010).

La preoccupazione per la morte delle colonie d'api negli Stati Uniti ha attirato l'attenzione dei media mondiali, tanto che la maggior parte dei collassi degli alveari registrati nel resto del pianeta sono stati ingiustamente associati al CCD. Tuttavia, l'acronimo CCD è stato coniato per indicare il collasso associato a un insieme ben definito di sintomi (vanEngelsdorp *et al.*, 2009) e non le generiche morie delle colonie, che possono essere causate da diversi fattori (vanEngelsdorp *et al.*, 2010).

Gli effetti del CCD negli USA sono stati significativi, soprattutto se si considera la crescente domanda di impollinazione. L'AIA (Apiary Inspector of America) e

l'USDA (United States Department of Agriculture) hanno stimato che le perdite complessive di alveari nell'autunno-inverno 2006-07, 2007-08, 2008-09 sono state rispettivamente del 31, 36 e 28,6% (vanEngelsdorp *et al.*, 2007; 2008; 2010). Tuttavia, tali stime sono basate su indagini telefoniche condotte su apicoltori che gestivano tra il 10 e il 20% dei 2,4 milioni di colonie presenti negli Stati Uniti. È interessante inoltre notare come vanEngelsdorp *et al.* (2010) riportino che solo il 15% delle colonie perse durante l'inverno 2008-09 manifestavano i sintomi del CCD, mentre gli apicoltori intervistati indicavano come causa principale del collasso delle colonie la morte dell'ape regina e gli elevati livelli di infestazione da parte di *V. destructor*.

Questa situazione rivela la difficoltà di circoscrivere con precisione il fenomeno del CCD, in un ambiente dove la facilità delle comunicazioni favorisce la diffusione incontrollata di allarmi, che si alimentano progressivamente grazie all'influenza reciproca fra le parti in gioco (Summers, 2010).

### *1.2.2. Le morie in Europa*

Negli ultimi anni anche in molti Paesi europei si sono verificate gravi perdite di alveari. Tuttavia, il fenomeno è stato poco documentato e ha perciò ricevuto un'attenzione inferiore rispetto a quanto verificatosi negli Stati Uniti (Potts *et al.*, 2010).

Le morie di alveari in Europa sono state registrate in due distinti periodi: primaverile e autunno-invernale.

Le morie primaverili sono state riscontrate principalmente in Italia, Francia e Germania e sono state attribuite all'avvelenamento delle api a seguito dell'utilizzo in agricoltura dei pesticidi neonicotinoidi (§ 1.3.). Generalmente, le morie per avvelenamento sono circoscritte a una zona precisa e sono facilmente distinguibili in seguito al ritrovamento di fronte all'alveare di migliaia di api morte, sulle quali è normalmente possibile rinvenire i residui dei prodotti responsabili dell'intossicazione acuta. Per ovviare a tale problema si possono adottare azioni appropriate, come ad esempio la sospensione dell'utilizzo degli agrofarmaci incriminati o la limitazione del loro uso (Moritz *et al.*, 2010).

Diverso è il caso delle morie registrate nel periodo autunno-invernale, che nel 2007-08 hanno causato perdite di alveari pari al 37% in Italia e al 20% in Europa (da

1,8 a 53% tra i diversi Paesi) e le cui cause restano ancora difficili da individuare (Crailsheim *et al.*, 2009).

I sintomi che manifestano le colonie collassanti a fine stagione produttiva riguardano l'assenza dell'ape regina e la ridotta popolazione di individui all'interno dell'alveare (Le Conte *et al.*, 2010).

Alcuni studi condotti in Europa indicano nei patogeni la causa principale delle morie invernali delle colonie. Oltre ai funghi, ai batteri e ai virus delle api, l'incapacità di controllare il parassita *V. destructor* da parte degli apicoltori risulta devastante per la sopravvivenza degli alveari (Le Conte *et al.*, 2010).



### ***1.3. Le possibili cause***

Risulta a questo punto plausibile la domanda se il CCD americano e le morie di api in Europa siano fenomeni disgiunti o siano, piuttosto, una manifestazione alternativa dello stesso fenomeno.

Benché il CCD presenti tratti distintivi caratteristici, la sua descrizione appare ancora piuttosto vaga, tanto che sono state documentate ben 17 diverse definizioni del fenomeno (European Food Safety Authority, 2009); d'altra parte, anche le morie registrate in Europa sono caratterizzate da una certa variabilità.

Poiché la domanda appena formulata non ha ancora ricevuto una risposta soddisfacente, si ritiene opportuno presentare in questa sede tutte le possibili cause del fenomeno “morie delle api” nel suo complesso, al fine di fare chiarezza su quanto la scienza ha prodotto sin'ora e restringere il campo di azione entro cui muoversi.

Si possono considerare molte ipotesi realistiche sulle possibili cause di collasso delle colonie, tra cui: 1. parassiti e patogeni delle api; 2. sostanze chimiche usate nelle colonie per il controllo dei parassiti e dei patogeni delle api; 3. agrofarmaci presenti nell'ambiente; 4. colture geneticamente modificate; 5. stress causati dalla gestione apistica e stress nutrizionali; 6. interazioni tra due o più di questi fattori (Ellis *et al.*, 2010).

#### *Parassiti e patogeni*

Le api sono interessate da un grande numero di parassiti e agenti patogeni.

Le due principali malattie batteriche che colpiscono la covata sono: la peste europea, causata da *Mellisococcus pluton* (Bailey, 1983) e la peste americana, causata da *Paenibacillus larvae* (Ashiralieva e Genersch, 2006). Tuttavia, questi microrganismi non hanno effetto sulle api adulte, ma colpiscono con sintomi caratteristici le larve e le pupe.

Il *Nosema apis* è un fungo che infesta l'intestino delle api adulte, ma presenta una virulenza moderata; tuttavia, quando la carica è elevata, esso provoca dissenteria e determina la morte prematura delle api adulte. Risulta tuttavia improbabile che *N. apis* sia la causa diretta del collasso delle colonie, perché la dissenteria non è un caratteristico sintomo associato alle diffuse morie delle api. Inoltre, in primavera molte colonie d'api manifestano un'infezione cronica di *N. apis*, anche laddove non sono registrate morie di alveari (Oldroyd, 2007).

Sulle api asiatiche (*A. cerana* Fabr.) è stata identificata una nuova specie di *Nosema*: *N. ceranae* (Fries *et al.*, 1996); la sua presenza è stata recentemente riscontrata anche su *A. mellifera* in Europa, dove il fungo è stato collegato alle diffuse morie di alveari registrate in Spagna (Martín-Hernández *et al.*, 2007). Questo nuovo patogeno si è rapidamente propagato anche negli Stati Uniti, dove alcuni ricercatori hanno ipotizzato un suo coinvolgimento nel CCD (Cox-Foster *et al.*, 2007). Tuttavia, *N. ceranae* è stato segnalato su *A. mellifera* già alcuni anni prima che si verificassero le morie diffuse e gli studi molecolari dimostrano che esso è presente anche negli alveari più vigorosi. Nonostante *N. ceranae* sia un patogeno emergente in *A. mellifera*, con effetti potenzialmente seri a livello individuale e di colonia, tale microrganismo non pare essere direttamente associato al collasso degli alveari e sono necessarie ulteriori ricerche per determinare la sua reale virulenza (Paxton, 2010).

*V. destructor* è un parassita degli imenotteri del genere *Apis*. L'acaro, originariamente ospite di *A. cerana*, si è in seguito adattato ad *A. mellifera*, attraverso la quale si è rapidamente diffuso in gran parte dei paesi in cui si pratica l'attività apistica. I danni provocati dalla varroa nell'ultimo trentennio agli alveari dell'Europa e del Nord America sono noti. Il parassita, infatti, è in grado di provocare (senza il concorso di altri agenti di danno) la morte delle api, specialmente a livello di covata. Tuttavia, è stato osservato che, nelle colonie colpite dal CCD, la popolazione di acari era piuttosto bassa e risulta perciò difficile attribuire la causa di tale fenomeno alla sola varroa. È altresì vero che i danni maggiori arrecati dall'acaro all'alveare derivano dalla sua capacità di trasmettere e attivare i virus. In effetti, vanEngelsdorp *et al.* (2009) hanno dimostrato che, rispetto agli alveari di controllo, le api provenienti dagli alveari collassanti avevano una carica di patogeni più elevata, causata probabilmente dall'effetto della parassitizzazione ad opera di *V. destructor*. È possibile, infatti, che il livello di infestazione prima del campionamento fosse tale da provocare l'immunosoppressione delle api e il conseguente incremento delle popolazioni di microrganismi dannosi.

I patogeni che sembrano giocare un ruolo cruciale nelle morie delle colonie di api sono i virus. Molte api adulte, infatti, sopportano infezioni virali latenti, che non portano al manifestarsi di sintomi; tuttavia, in base a condizioni di stress causate da una cattiva nutrizione, da condizioni ambientali difficili o dal parassitismo di *V. destructor* o *N. apis*, le popolazioni di virus possono aumentare in numero e causare infezioni conclamate, in cui i sintomi sono evidenti sulle api (Oldroyd, 2007).

I virus che colpiscono le api adulte e la covata sono almeno 18 (Ribière *et al.*, 2008). Le colonie asintomatiche sono generalmente infettate in modo latente da diversi virus nel corso della stagione (Tentcheva *et al.*, 2004) e la varroa pare essere il filo conduttore di queste infezioni. Sono diversi i virus che sono stati associati a vari livelli con *V. destructor*: Acute Bee Paralysis Virus (ABPV), Black Queen Cell Virus (BQCV), Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV), Deformed Wing Virus (DWV), Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV), Kashmir Bee Virus (KBV) e Sacbrood Virus (SBV).

ABPV, KBV e IAPV fanno parte di un complesso di virus strettamente correlati alla famiglia dei Dicistroviridae. Questi virus hanno una prevalenza diffusa nelle colonie di *A. mellifera* e sono spesso implicati nelle morie degli alveari, soprattutto in presenza di una forte infestazione di *V. destructor*. In particolare, IAPV provoca tremore nelle api adulte, che si trascinano fuori dall'alveare e, incapaci di volare, muoiono, determinando il progressivo spopolamento delle colonie colpite (de Miranda *et al.*, 2010).

In seguito a uno studio metagenomico<sup>1</sup> in cui sono state comparate le api provenienti da alveari colpiti dal CCD con quelle prelevate da alveari asintomatici, Cox-Foster *et al.* (2007) hanno evidenziato una forte correlazione fra IAPV e le colonie collassanti. Tuttavia, secondo Anderson e East (2008) non ci sono prove che esista un nesso causale fra IAPV e il CCD, in quanto il virus era presente in molte colonie morte che manifestavano i sintomi di CCD, ma anche in diversi alveari asintomatici. Inoltre, fra i sintomi del CCD non sono mai stati riscontrati segni di tremori nelle api e ciò potrebbe essere sufficiente a escludere tale patologia dalla lista degli indagati. Infatti, vanEngelsdorp *et al.* (2009) hanno fatto chiarezza sulla questione, dimostrando come l'incidenza di IAPV nelle colonie collassanti fosse bassa e ascrivendo le cause del collasso delle colonie a un'interazione fra patogeni e altri fattori di stress, più che al singolo virus.

Recentemente, Highfield *et al.* (2009) hanno monitorato per un anno la prevalenza e la quantità di ABPV, BQCV e DWV in colonie infestate e non da *V. destructor*, dimostrando che solo per il virus delle ali deformi esiste una correlazione significativa tra la sua carica virale e le morie invernali degli alveari. Inoltre, gli autori hanno confermato l'elevata patogenicità di DWV sia quando è associato alla varroa sia

---

<sup>1</sup> La metagenomica è una tecnica basata sul sequenziamento del genoma di microrganismi presenti su un ospite, al fine di studiare le comunità microbiche direttamente nel loro ambiente naturale, evitando il problema del prelievo e della coltivazione in laboratorio.

quando è solo, potendo agire in maniera indipendente dal parassita nel determinare il collasso delle colonie a fine stagione.

Anche sulla base di questo risultato, appare necessario indagare ulteriormente sull'associazione fra *V. destructor* e i virus delle api, con particolare riguardo a DWV, al fine di far luce sul loro reale coinvolgimento nello spopolamento delle colonie di api.

#### *Prodotti chimici impiegati negli alveari*

Per controllare l'acaro parassita *V. destructor*, il piccolo coleottero degli alveari (*A. tumida*) e la tarma della cera (*G. mellonella*), gli apicoltori sono soliti trattare le famiglie di api con prodotti naturali o di sintesi.

In particolare, i prodotti di origine naturale impiegati per la lotta alla varroa sono gli acidi organici (es. acido ossalico; Rademacher e Harz, 2006) e gli oli essenziali (es. timolo; Imdorf *et al.*, 1999). Sebbene questi prodotti non siano rilevanti per l'uomo da un punto di vista tossicologico, la loro efficacia è più bassa rispetto a quelli di sintesi e non è escluso che possano avere un effetto nocivo diretto sulle api (Harz *et al.*, 2010).

Generalmente, però, il controllo di *V. destructor* avviene con trattamenti di sintesi principalmente a base di Fluvalinate o di Coumaphos (Sammataro *et al.*, 2000), che negli ultimi anni hanno ridotto la loro efficacia, in seguito all'instaurarsi di fenomeni di resistenza nell'acaro (Milani, 1999). Inoltre, a causa dei trattamenti ripetuti nel tempo, tali prodotti chimici possono accumularsi nella cera dei favi e migrare, per diffusione, nel miele (Wallner, 1999), esponendo le api a livelli di residui potenzialmente nocivi.

Tuttavia, vanEngelsdorp *et al.* (2009) hanno riscontrato più frequentemente e con livelli maggiori i residui di Fluvalinate e Coumaphos nella cera degli alveari asintomatici rispetto a quelli che presentavano i sintomi del CCD. In pratica, gli alveari che erano stati maggiormente trattati contro *V. destructor* erano anche quelli che non manifestavano i sintomi del CCD, confermando in maniera indiretta il ruolo centrale del parassita nel collasso delle colonie.

#### *Insetticidi usati in agricoltura*

L'agricoltura intensiva dipende strettamente dall'impiego di pesticidi. Per contrastare efficacemente i parassiti delle colture agrarie, sono in continua fase di sviluppo nuovi insetticidi e classi di composti. Prima del rilascio nell'ambiente, però, tutti i pesticidi devono passare attraverso un rigoroso processo di registrazione, che comprende la valutazione del rischio per gli organismi non bersaglio, tra cui le api.

Tuttavia, è impresa ardua prevedere le possibili conseguenze dell'utilizzo diffuso di un particolare composto, di modo che risulta difficile escludere a priori eventuali effetti nocivi impreveduti su *A. mellifera*.

Le api sono particolarmente sensibili a una vasta gamma di insetticidi di sintesi (Thompson, 2003), probabilmente a causa di un deficit di enzimi di detossificazione (Claudianos *et al.*, 2006) ed è possibile che, durante la loro attività, le api bottinatrici possano incontrare livelli di pesticidi letali oppure possano portare all'alveare nettare e polline contaminati.

Le perdite diffuse di colonie di api registrate in Francia negli ultimi anni sono state attribuite a insetticidi neonicotinoidi, in particolare all'Imidacloprid. Questa classe di composti agisce sul sistema nervoso degli insetti con un meccanismo di tipo acetilcolinomimetico. Tali sostanze, infatti, possiedono una struttura simile all'acetilcolina, pertanto sono in grado di legarsi ai recettori nicotinici, determinando la loro continua attivazione e causando la morte dell'insetto per ipereccitazione (Johnson *et al.*, 2010).

A causa della sua bassa tossicità nei mammiferi, dell'alta efficacia e dell'elevata mobilità nei tessuti vegetali e animali, l'Imidacloprid è spesso usato come insetticida sistemico per il controllo degli insetti che succhiano la linfa delle piante o che succhiano il sangue degli animali da compagnia. È possibile quindi che, applicato sulle colture, l'insetticida possa finire nel nettare o nel polline, danneggiando perciò le api bottinatrici (Chauzat *et al.*, 2006). Alcuni studi hanno tuttavia dimostrato che la sopravvivenza delle colonie alimentate con sciroppo e Imidacloprid in quantità comparabili a quelle presenti in campo era paragonabile alla sopravvivenza degli alveari controllo; inoltre, il contatto con il polline di piante di mais trattate con Imidacloprid non ha avuto effetto sulla longevità delle api (Oldroyd, 2007).

Alla luce di queste osservazioni, è possibile escludere i neonicotinoidi dall'elenco delle possibili cause dei diffusi collassi delle colonie d'api.

È altrettanto vero, però, che le api possono andare incontro a effetti sub-letali dei pesticidi, che sono molto più difficili da identificare, in quanto possono compromettere la capacità di apprendimento e memorizzazione (Ramirez-Romero *et al.*, 2005), impedendo agli insetti di far ritorno in alveare. Inoltre, si conosce ancora poco circa le interazioni fra gli agrofarmaci e i parassiti o i patogeni delle api, pertanto sono necessari ulteriori studi per fare chiarezza sulla questione.

### *Colture geneticamente modificate*

Dal 1996 gli agricoltori statunitensi hanno accesso a una varietà di colture di base il cui genoma è stato modificato per esprimere la tolleranza agli erbicidi (in soia e cotone) o la resistenza agli insetti (in mais, cotone, patata e pomodoro). Nel 2007 sono stati seminati in tutto il mondo 113 milioni di ettari di colture Geneticamente Modificate (GM) (Johnson *et al.*, 2010).

La resistenza agli insetti è stata conferita incorporando nella pianta i geni che codificano per la sintesi di proteine ad azione insetticida prodotte da *Bacillus thuringiensis* (Bt). Le Bt  $\delta$ -endotossine sintetizzate dalle piante ingegnerizzate vengono attivate nell'intestino degli insetti fitofagi, dove si legano all'epitelio per formare dei pori che danneggiano il mesentero del fitoparassita, causandone la morte. Gli apicoltori e alcuni ricercatori ritengono che le colture GM, in particolare quelle che esprimono per la sintesi di insetticidi, possano in qualche modo costituire una minaccia per le api bottinatrici.

Fino ad oggi sono stati condotti numerosi studi per determinare l'impatto degli organismi GM sulle api.

Secondo Bailey *et al.* (2005) il mais dolce Bt non influenza la mortalità delle api. Inoltre, è stato osservato che alimentando le api con uno sciroppo zuccherino contenente la proteina Cry1Ab, che è prodotta dalle piante di mais GM Bt e che ha un'azione insetticida nei confronti *Ostrinia nubilalis* Hüb., non vi sono effetti sulla mortalità o sulle capacità di apprendimento delle api (Ramirez-Romero *et al.*, 2005).

Anche una meta-analisi di 25 studi indipendenti condotta da Duan *et al.* (2008) ha concluso che le proteine Bt, usate nelle colture GM per il controllo dei lepidotteri e dei coleotteri infestanti, non hanno impatti negativi sulla sopravvivenza di larve e adulti delle api.

Infine, il coinvolgimento degli organismi transgenici nel CCD appare poco probabile se si osserva che negli stati come l'Illinois (USA), con vaste aree a colture GM, non sono state segnalate gravi perdite di alveari (Oldroyd, 2007).

Alla luce di queste evidenze scientifiche, appare chiaro che il passaggio alle colture Bt non ha danneggiato direttamente le colonie di api negli Stati Uniti. Al contrario, Johnson *et al.* (2010) sostengono che la coltivazione diffusa di piante transgeniche abbia portato dei benefici alle api, in quanto le piante GM non richiedono numerose applicazioni di insetticidi che risultano spesso tossici per gli insetti pronubi.

### *Stress causati dalla gestione apistica e stress nutrizionali*

Negli ultimi anni il miele si è fortemente deprezzato e la sua produzione si è progressivamente ridotta a causa dell'urbanizzazione e delle pratiche agricole intensive. Entrambi questi fattori hanno spinto molti apicoltori a cercare fonti alternative di reddito quali, ad esempio, il servizio di impollinazione offerto agli agricoltori. Questa attività comporta lo spostamento continuo delle colonie da una zona produttiva a un'altra e non sempre le colture da impollinare sono in grado di fornire una nutrizione adeguata alle api. Soprattutto a fine stagione, le api hanno bisogno di nutrirsi con polline di alta qualità, che permette loro di allevare individui più longevi, in grado di superare l'inverno (Oldroyd, 2007).

Generalmente, le api raccolgono il polline di diverse specie vegetali, per garantire una dieta equilibrata e diversificata. Le api utilizzate per l'impollinazione delle monoculture, invece, sono costrette a raccogliere il polline di una sola specie, che non sempre fornisce loro tutti i nutrienti essenziali. Le colonie che svolgono tale servizio, pertanto, subiscono uno stress nutrizionale, che dovrebbe essere compensato attraverso una nutrizione supplementare con polline diverso o altre fonti proteiche (Brodschneider e Crailsheim, 2010).

Anche l'introduzione delle colture GM che presentano una resistenza agli erbicidi ha eliminato molte piante spontanee che fioriscono ai margini dei campi coltivati (Johnson *et al.*, 2010). La riduzione della biodiversità vegetale ha causato un impoverimento della nutrizione delle api che, assieme ad altri fattori, può indurre a sua volta un'elevata mortalità delle colonie (Brodschneider e Crailsheim, 2010).

In uno studio condotto da vanEngelsdorp *et al.* (2010) è stato osservato che una delle cause più comuni delle perdite invernali delle colonie è la morte delle api per fame. Anche i parassiti delle api possono esercitare a loro volta uno stress nutrizionale e intensificare l'effetto della fame; ad esempio, è stato dimostrato che *V. destructor* riduce la capacità di immagazzinare la vitellogenina<sup>2</sup>, condizionando l'abilità di invernamento delle api (Amdam *et al.*, 2004).

In seguito alle recenti morie degli alveari, è stata rivalutata l'importanza di una nutrizione adeguata delle api. Nonostante vanEngelsdorp *et al.* (2009) abbiano dimostrato che le api provenienti dalle colonie colpite da CCD non presentavano un

---

<sup>2</sup> La vitellogenina è una proteina prodotta e depositata dalle api nel corpo grasso, che funge da riserva di nutrienti durante i periodi critici.

profilo proteico alterato, non è escluso che un'alimentazione povera possa essere la causa, anche indiretta, dei collassi delle colonie (Oldroyd, 2007).

Le ricerche future, quindi, dovranno tenere conto delle interazioni fra la nutrizione e gli altri fattori di stress, quali parassiti, patogeni e pesticidi, considerando in particolare il ruolo della dieta in rapporto alla risposta immunitaria dell'ape (Brodschneider e Crailsheim, 2010).



#### ***1.4. Le cause più probabili***

Nonostante gli sforzi compiuti dalla ricerca per individuare i responsabili del collasso delle colonie, al momento l'unica certezza emersa riguarda l'impossibilità di attribuire la causa definitiva del fenomeno a un singolo elemento. Pare invece più plausibile l'ipotesi che le interazioni tra fattori possano spiegare l'elevata mortalità delle api osservata negli alveari.

Sebbene finora siano stati considerati numerosi agenti biotici e abiotici, col tempo il campo delle indagini è stato ristretto ai parassiti e ai patogeni delle api (Ratnieks e Carreck, 2010).

È un dato di fatto che, su scala globale, la maggior parte delle colonie di *A. mellifera* gestite dagli apicoltori siano infestate da *V. destructor*; questo potrebbe facilitare quasi ovunque la potenziale interazione fra il parassita e molteplici fattori biotici e abiotici (Neumann e Carreck, 2010). Inoltre, le infezioni multiple causate da diversi agenti patogeni o le interazioni tra gli agenti patogeni e altri elementi sospettati di causare la morte delle api sono quasi inevitabili, almeno dove la varroa è stabilmente radicata (Pettis e Delaplane, 2010).

È noto, infatti, che la varroa è in grado di trasmettere e attivare i virus presenti in forma latente nelle api (Shen *et al.*, 2005); inoltre, l'incidenza e l'abbondanza di tali infezioni virali in *A. mellifera* sono sostanzialmente aumentate da quando *V. destructor* ha iniziato a parassitare questa specie d'ape. Ad esempio, l'incidenza delle infezioni di DWV nel Regno Unito è passata da 0% nel 1994-95 al 100% nel 1997-98, quando la varroa si era stabilmente insediata negli alveari (Ratnieks e Carreck, 2010).

Infine, DWV è il virus più diffuso negli alveari (de Miranda e Genersch, 2010), proprio a causa della sua stretta associazione con la varroa (Bowen-Walker *et al.*, 1999) ed è già stato dimostrato mediante un modello matematico come DWV, veicolato da *V. destructor*, possa effettivamente provocare il collasso delle colonie d'api (Sumpter e Martin, 2004).

### 1.4.1. *Varroa destructor*

L'acaro *V. destructor* Anderson & Trueman (Acarina, Mesostigmata) è un parassita obbligato degli imenotteri del genere *Apis*. Qualche anno fa, tale specie è stata distinta da *V. jacobsoni* Oud. sulla base di studi condotti a livello morfologico e del DNA mitocondriale (Anderson e Trueman, 2000). L'ospite originario di *V. destructor* è l'ape asiatica, *A. cerana*; tuttavia, l'introduzione di *A. mellifera* nell'Asia sud-orientale a fini produttivi ha determinato il passaggio del parassita sul nuovo ospite, attraverso il quale la varroa ha potuto facilmente diffondersi in quasi tutto il mondo, causando ingenti danni economici all'apicoltura.

Le femmine adulte di *V. destructor* hanno forma ovale, misurano in media 1,1 mm di lunghezza e 1,6 mm di larghezza e sono perciò facilmente visibili a occhio nudo. Il corpo è appiattito in senso dorso-ventrale, presenta un colore bruno più o meno scuro ed è ricoperto di peli (figura 1).

Il ciclo biologico di *V. destructor* comprende due fasi: una fase riproduttiva, che avviene nelle cellette di covata e una fase foretica, che la varroa trascorre sulle api adulte. Per riprodursi, la femmina adulta di *V. destructor* entra nelle cellette di covata di ape operaia 15-20 ore prima dell'opercolatura (40-50 ore prima per la covata di fuco) (Boot *et al.*, 1992) e ne raggiunge il fondo, dove rimane invischiata nell'alimento larvale (Ifantidis, 1983). Una volta opercolata la celletta, il parassita inizia a nutrirsi dell'emolinfa dell'ospite, praticando un foro nel tegumento della pupa, in prossimità del secondo segmento ventrale dell'addome, attraverso il quale si alimenta anche la progenie dell'acaro (Donzé e Guerin, 1994).

Dopo circa 60 ore dall'opercolatura della celletta, la varroa depone il primo uovo, generalmente maschile, seguito da altre 5 o 6 uova femminili (Ifantidis, 1983). Allo sfarfallamento dell'ape operaia, assieme alla varroa madre fuoriesce anche una figlia matura; dalle cellette di fuco, il cui periodo di opercolatura è più lungo (15 giorni anziché 12), possono fuoriuscire due varroe figlie (Schulz, 1984). In pratica, per ogni ciclo di covata la popolazione di *V. destructor* raddoppia.

Terminata la fase riproduttiva, le varroe mature trascorrono alcuni giorni sulle api adulte (fase foretica) prima di infestare una nuova celletta di covata. La maggior parte delle varroe compie non più di tre cicli riproduttivi (Fries e Rosenkranz, 1996).

Le api parassitate presentano spesso l'addome ridotto e le ali deformate o assenti. Gran parte delle api colpite nella tarda estate e nell'autunno non riescono a superare l'inverno e, in alcuni casi, sopravvivono soltanto pochi giorni (De Jong *et al.*, 1982; Kovac e Crailsheim, 1988).

Una presenza elevata dell'acaro nell'alveare determina una forte riduzione dell'attività di raccolta di nettare e polline, l'allevamento di poca covata (spesso distribuita in modo irregolare sui favi) e la progressiva diminuzione del numero di individui nella colonia, causata dalla morte prematura delle api parassitate. I danni diventano sempre più gravi all'aumentare della popolazione di *V. destructor*, soprattutto alla fine della stagione produttiva, quando la covata si riduce e il parassita tende a concentrarsi sulle poche larve rimaste, provocando il collasso della colonia di api.

I danni arrecati ad *A. mellifera* non sono solo dovuti alla sottrazione di emolinfa durante la fase riproduttiva all'interno della covata, ma anche alla trasmissione di infezioni virali e alla diffusione, attraverso la ferita provocata dall'acaro, di altri microrganismi patogeni, che possono aggravare la situazione complessiva dell'alveare.

Mentre in *A. cerana* esistono meccanismi che limitano l'accrescimento delle popolazioni del parassita, le famiglie di *A. mellifera* soccombono se non vengono attuati efficaci interventi acaricidi, volti a ridurre la presenza di *V. destructor* entro livelli tollerabili delle api e a interrompere il conseguente propagarsi dei virus. Tuttavia, la lotta alla varroa si è dimostrata difficile, anche a causa della rapida selezione di popolazioni resistenti ai pochi principi attivi di sintesi efficaci contro l'acaro e tollerati dall'ape; d'altra parte, gli acaricidi di origine naturale, così come la lotta "biomeccanica", hanno dato spesso risultati insoddisfacenti.

Inizialmente, l'acaro ha ricevuto poca attenzione negli studi sul fenomeno delle morie degli alveari, sebbene il suo coinvolgimento non sia affatto marginale (Nazzi, 2008). Neumann e Carreck (2010), infatti, hanno osservato che le importanti perdite di alveari registrate negli ultimi 5 anni in Europa, Stati Uniti, Medio Oriente e Giappone coincidono con la presenza diffusa e radicata della varroa in questi paesi; di contro, non sono state riscontrate morie estese degli alveari laddove il parassita non è presente (Australia) oppure nei paesi in cui si alleva l'ape africana (Africa) e l'ape africanizzata (Sud America), che notoriamente sono in grado di ben tollerare *V. destructor* (Martin e Medina, 2004).

La lotta alla varroa rappresenta tuttora uno dei problemi principali della moderna apicoltura. Pertanto, un approfondimento delle conoscenze sui rapporti fra l'ospite e il parassita, senza trascurare la presenza dei patogeni, è quantomeno auspicabile.

Figura 1 – Femmine adulte di *V. destructor*: individuo neosfarfallato (a sinistra) e adulto completamente pigmentato (a destra).



#### 1.4.2. Deformed Wing Virus (DWV)

Salvo quando specificato diversamente, le informazioni riportate in questo paragrafo sono state tratte da Ribière *et al.* (2008).

Il virus delle ali deformi (Deformed Wing Virus – DWV) produce particelle icosaedriche di 30 nm, che consistono in un genoma a RNA a singolo filamento positivo ((+)ssRNA) e tre proteine strutturali, caratteristica comune ai virus appartenenti all'ordine dei Picornavirales. L'organizzazione del genoma di DWV è tipica del genere Iflavirus e prevede un singolo filamento di RNA codificante, compreso fra una lunga regione 5' non tradotta e una corta regione 3' non tradotta e altamente conservata, che termina con una coda costituita da numerose basi di adenina. Entrambe le regioni non tradotte regolano la replicazione e la traduzione del genoma, di conseguenza interagiscono con numerosi fattori dell'ospite necessari in questi processi (de Miranda e Genersch, 2010).

DWV è stato inizialmente isolato in Giappone su api adulte (*A. mellifera*) infestate dall'acaro parassita *V. destructor*; il suo nome deriva dal caratteristico sintomo che conferisce alle api neo-sfarfallate delle colonie infestate e che si manifesta con ali deformi o scarsamente sviluppate (figura 2), al punto di rendere le api incapaci di volare. Inizialmente, la deformità delle ali e la ridotta dimensione delle api era stata associata all'attività trofica della varroa, anche perché i sintomi erano maggiormente evidenti in presenza di una forte infestazione da parte del parassita. In seguito, è stata dimostrata l'associazione diretta fra le ali deformi e l'infezione del virus; infettando con DWV le pupe di api in laboratorio, infatti, è possibile indurre la deformità delle ali (Möckel *et al.*, 2011).

DWV si localizza principalmente nell'addome, in misura minore nel torace e in piccola parte nel capo delle api adulte (Chen *et al.*, 2006a; Iqbal e Mueller, 2007). La replicazione di DWV, invece, si verifica in alcune regioni critiche del cervello, quali i neuropili ottici, che sono responsabili della capacità visiva e i lobi antennali, che invece rispondono dell'abilità olfattiva dell'ape; ciò può compromettere le principali funzioni sensoriali dell'insetto e le sue capacità di apprendimento (Shah *et al.*, 2009).

Il principale mezzo di trasmissione di DWV nell'ape è rappresentato da *V. destructor* (Bowen-Walker *et al.*, 1999). Tuttavia, Chen *et al.* (2006a) hanno rilevato la presenza del virus in tutti gli stadi di sviluppo dell'ospite (dall'uovo all'adulto), dimostrando che è possibile anche la trasmissione verticale di DWV. In effetti, DWV è stato trovato sia in diversi organi dell'ape regina (intestino, spermateca e ovari) (Chen *et al.*, 2006a) sia nello sperma dei fuchi (Yue *et al.*, 2007). Inoltre, DWV è stato rilevato anche nell'alimento larvale, suggerendo una possibile via di trasmissione orizzontale dell'agente patogeno (Yue e Genersch, 2005). Anche il ritrovamento di DWV nell'intestino e nelle feci delle api ne incrementa le modalità di trasmissione fra gli individui adulti della colonia, che aumentano ulteriormente considerando la possibilità di trasferire il virus via trofallassi<sup>3</sup> o in seguito al cannibalismo delle pupe infette da parte delle api di casa (removal behavior, § 1.7.1.) (Chen *et al.*, 2006b; Möckel *et al.*, 2011).

In assenza di *V. destructor*, come accade per molti altri virus delle api, DWV persiste nell'alveare in forma latente, senza quindi che gli individui adulti manifestino

---

<sup>3</sup> La trofallassi consiste nello scambio di nutrimento per via orale fra i membri di una colonia di api; assieme al cibo, le api possono trasferire messaggi chimici che regolano la vita nell'alveare.

sintomi evidenti quali la deformità delle ali (Yue *et al.*, 2007). Tuttavia, col passare del tempo DWV, specie se veicolato dalla varroa, esplose in forma conclamata acuta, caratterizzata da sintomi visibili e ridotta sopravvivenza delle api infettate (Yang e Cox-Foster, 2007).

Recentemente, DWV è stato rilevato anche su individui adulti di bombi allevati per l'impollinazione in serra (*Bombus terrestris* L.) e selvatici (*B. pascuorum* Scop.) che, come le api, presentano le ali deformi; ciò dimostra come il virus in questione abbia un ampio range di ospiti e non è esclusa la possibilità che possa attaccare altre specie di Apidi (Genersch *et al.*, 2005).

Figura 2 – Ape sfarfallata con ali deformi in seguito a infezione conclamata di Deformed Wing Virus.



#### 1.4.3. Interazioni *V. destructor*-DWV

DWV è considerato uno fra i virus delle api più diffuso al mondo (Allen e Ball, 1996). Da quando è stato individuato nelle api con le ali deformi, sono state accumulate una serie di evidenze scientifiche che associavano DWV a *V. destructor* (Bowen-Walker *et al.*, 1999). Così come la varroa, infatti, DWV è diffuso in quasi tutto il mondo (de Miranda e Genersch, 2010) e la sua distribuzione e prevalenza negli alveari segue quella del parassita. La stretta associazione fra l'acaro e DWV è stata confermata osservando che le pupe provenienti da cellette infestate avevano una quantità di virus significativamente più elevata rispetto a quelle provenienti da cellette non infestate; inoltre, il numero di acari rilevato nelle cellette era strettamente correlato all'incidenza

della deformità delle ali (Bowen-Walker *et al.*, 1999) e al numero di copie virali rilevate nei campioni di api analizzati (Shen *et al.*, 2005).

Successivamente, DWV è stato individuato anche nelle femmine adulte di *V. destructor* le quali, in seguito all'attività trofica, sono in grado di trasmettere il virus dalla covata molto infetta a quella sana (Bowen-Walker *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2005); inoltre, sia gli adulti sia la progenie di *V. destructor*, acquisiscono il virus direttamente dall'ospite infetto e non dalla varroa madre.

La quantità di DWV presente nella varroa segue di pari passo la prevalenza dell'infezione del virus nelle colonie di api durante il corso della stagione. Tale situazione può risultare dall'accumulo di virus ingerito con l'emolinfa dall'acaro parassita in seguito a ripetuti pasti su ospiti infetti. Gisder *et al.* (2009), invece, sostengono che DWV possa replicarsi in *V. destructor* durante la sua fase riproduttiva.

L'attività trofica della varroa sull'ospite potrebbe a sua volta indurre o attivare la replicazione del virus anche nelle larve di api. Yang e Cox-Foster (2005), infatti, hanno osservato che la parassitizzazione ad opera di *V. destructor* ha un effetto immunosoppressivo sull'ape, riducendo la trascrizione dei geni che codificano per la sintesi di alcuni enzimi legati alla risposta immunitaria dell'ape (fenolossidasi, glucosio-deidrogenasi, glucosidasi e lisozima) e del peptide antimicrobico "abaecin"; tale situazione si aggrava se si giunge all'infezione conclamata da DWV, che determina la sotto-espressione dei geni che codificano per i peptidi antimicrobici "defensin" e "hymenoptaecin". La soppressione di alcuni geni del sistema immunitario dell'ape ad opera del parassita e del patogeno potrebbe quindi favorire la replicazione del virus; tuttavia, nessuno dei geni individuati finora sembra essere collegato alla risposta antivirale e appare pertanto incerto il modo in cui un'alterazione dell'espressione di questi geni potrebbe interferire con la replicazione del virus.

Secondo Sumpter e Martin (2004), DWV è uno fra i virus delle api meno virulenti e i danni che provoca a livello individuale e a livello di colonia sono gravi solo in presenza di una forte infestazione di varroa nell'alveare. Tale affermazione, però, si riferisce a un modello matematico elaborato dai due autori e, se da un lato appare evidente la connessione fra *V. destructor* e DWV, non è ancora stato chiarito perché un alveare molto infestato e molto infettato giunga infine al collasso.

### ***1.5. Considerazioni generali sugli approcci adottati finora negli studi sul fenomeno***

Le numerose ricerche scientifiche condotte finora per individuare le cause del collasso delle colonie hanno sempre adottato un approccio che può definirsi “spaziale”. Tale approccio prevede la comparazione di campioni di api prelevati in un dato istante da apiari collassanti e da apiari sani, al fine di rilevare eventuali differenze in grado di far luce sulle possibili cause delle morie degli alveari; il campionamento, pertanto, avviene nello stesso tempo in luoghi anche molto diversi. Tale approccio fornisce una “istantanea” della situazione in un preciso momento, che corrisponde all’epoca di campionamento, ma non permette di stabilire cosa sia successo prima dello spopolamento delle colonie d’api.

Ad esempio, per individuare quali patogeni presenti negli alveari fossero la causa del CCD, Cox-Foster *et al.* (2007) hanno analizzato campioni di api provenienti da alveari collassati in diversi apiari degli Stati Uniti e campioni di api provenienti da alveari asintomatici in Pennsylvania, Isole Hawaii e Australia. Le api sono state sottoposte a un’analisi metagenomica e i risultati, com’era facile attendersi, hanno evidenziato la presenza di numerosi patogeni, di cui però è stata solo registrata la prevalenza<sup>4</sup> (e non la quantità) al momento del campionamento. Il lavoro, così impostato, ha individuato in IAPV un possibile marcatore del CCD, a causa della correlazione fra presenza del patogeno e collasso della colonia.

Tale studio, che ha avuto una notevole eco, ma il cui risultato centrale è stato peraltro successivamente smentito dagli stessi autori (vanEngelsdorp *et al.*, 2009), rivela tutti i limiti dell’approccio “spaziale” adottato. In particolare, la natura correlativa dello studio comporta, come conseguenza, una notevole incertezza fra cause ed effetti; infatti, la presenza di IAPV negli alveari collassanti non prova che il virus sia la causa del CCD, poiché esso potrebbe essere, viceversa, la conseguenza di un’aumentata vulnerabilità delle api, determinata dalla sindrome sconosciuta oggetto di studio.

Inoltre, tale approccio assume che i fattori responsabili del collasso delle colonie siano presenti negli alveari al momento del campionamento, ma ciò potrebbe anche non

---

<sup>4</sup> La prevalenza è il rapporto fra il numero di individui affetti da una patologia e il numero di individui analizzati.



essere vero. Infatti, è possibile che le api infette dall'agente causale del CCD muoiano tutte lontano dalla colonia e quindi non possano essere campionate.

Di recente, vanEngelsdorp *et al.* (2009) hanno concluso che non esiste un unico agente causale del collasso delle colonie; più verosimilmente, il CCD è determinato da un'interazione fra patogeni e altri fattori di stress, tra i quali la varroa sembra svolgere un ruolo determinante. Gli stessi autori, ammettendo i limiti del proprio lavoro, hanno reclamato per il futuro l'adozione di studi "longitudinali", basati sul monitoraggio continuo della carica di parassiti, patogeni e pesticidi negli alveari. La medesima esigenza è stata ben evidenziata da Le Conte *et al.* (2010) in un lavoro riguardante il possibile ruolo di *V. destructor* nel collasso della colonia.

## ***1.6. I meccanismi di difesa negli insetti***

Si ritiene che uno studio completo sulle possibili cause del collasso della colonia non possa prescindere da un esame approfondito dei meccanismi utilizzati dagli insetti e in particolare dalle api per prevenire simili eventi, ovvero i meccanismi di difesa individuali e a livello di colonia.

Per combattere l'attacco degli agenti patogeni, gli insetti adottano una serie di mezzi di difesa che includono le barriere fisiche e la risposta immunitaria sistemica o locale.

### ***1.6.1. Il tegumento***

L'esoscheletro (o tegumento) degli insetti è il rivestimento più esterno che caratterizza gli artropodi. Come tutti gli apparati di rivestimento, l'esoscheletro presiede a funzioni di protezione, secrezione ed escrezione, oltre a offrire un supporto per l'attacco del sistema muscolare.

Il tegumento, si compone di vari strati, che dall'interno verso l'esterno si distinguono in: membrana basale, epidermide e cuticola.

La membrana basale è un tessuto formato da fibre di collagene; essa mette in relazione l'apparato tegumentale con la cavità interna del corpo.

L'epidermide è un tessuto epiteliale formato da un solo strato di cellule, che presiedono alla formazione della cuticola.

La cuticola è un tessuto inerte, tipicamente rigido e costituito da tre strati, che dall'interno verso l'esterno sono: l'endocuticola, l'esocuticola e l'epicuticola.

L'esocuticola è lo strato responsabile della durezza del tegumento, mentre l'endocuticola è lo strato più spesso entro cui scorrono i dotti ghiandolari, le fibre nervose e molti canalicoli (o pori canali) che, essendo destinati al trasporto di materiale di accrescimento del tegumento, si arrestano sotto l'epicuticola.

L'epicuticola è molto sottile (pochi micron) ed è formata da uno strato lipoproteico esterno, uno strato ceroso e uno cuticolinico, costituito da lipoproteine indurite e plasticizzate per tannizzazione. L'epicuticola è di fondamentale importanza per la sopravvivenza dell'insetto in quanto, grazie agli idrocarburi cuticolari presenti nello strato superficiale, assicura una buona resistenza al disseccamento, limitando la

traspirazione dell'acqua. Negli insetti, infatti, più dell'80% della perdita complessiva di acqua avviene attraverso la cuticola. La traspirazione dell'acqua è fortemente condizionata dalla temperatura esterna che, a sua volta, influenza la fase degli idrocarburi cuticolari. I lipidi in fase solida, infatti, forniscono una barriera molto efficace contro la traspirazione rispetto a quelli in fase fluida; una temperatura elevata, determina la fusione degli idrocarburi della cuticola, che diventa più permeabile, provocando la rapida perdita d'acqua da parte dell'insetto (Gibbs, 2002).

Gli idrocarburi saturi (alcani con 20-40 atomi di carbonio) presenti sulla cuticola degli insetti hanno un punto di fusione molto elevato, grazie alla loro capacità di unirsi e formare uno strato cristallino; per tale ragione, a 34 °C (la temperatura presente in alveare) essi si trovano allo stato solido sulla cuticola dell'insetto. I corrispondenti idrocarburi cuticolari monoinsaturi (alcheni) hanno temperature di fusione più basse rispetto agli alcani, di modo che si trovano allo stato fluido a 34 °C. Le miscele di alcani e alcheni hanno un comportamento più complesso e si conosce ancora poco sulle possibili interazioni fra i diversi composti presenti sulla cuticola e il loro effetto sulla permeabilità. Anche gli idrocarburi ramificati hanno un punto di fusione più basso rispetto agli alcani, pertanto la maggior parte di quelli presenti sulla cuticola degli insetti si presentano fluidi a temperatura di alveare (Gibbs e Rajpurohit, 2010).

Recenti studi hanno fatto luce sull'importanza di altri composti, diversi dai lipidi, presenti sulla cuticola degli insetti. Fra questi, risulta interessante il ruolo della melanina, una sostanza idrofobica che, come tale, può ridurre la permeabilità della cuticola; è già stato dimostrato in *Drosophila melanogaster* Meig. che la melanizzazione influenza in maniera significativa il bilancio idrico, riducendo la perdita di acqua (Gibbs e Rajpurohit, 2010).

Gli idrocarburi presenti sulla cuticola sono sintetizzati dagli enociti, ovvero cellule localizzate nell'epidermide e nel corpo grasso degli insetti. Una volta prodotti, gli idrocarburi cuticolari sono catturati dalle lipoforine e trasportati via emolinfa ai pori canali, che li trasferiscono infine all'epicuticola (Bagnères e Blomquist, 2010).

L'epicuticola, infine, costituisce la principale barriera difensiva dell'insetto, impedendo la penetrazione di agenti patogeni e sostanze chimiche tossiche.

### 1.6.2. Il sistema immunitario degli insetti

Salvo quando specificato diversamente, le informazioni riportate in questo paragrafo sono state tratte da Lemaitre e Hoffmann (2007).

Negli ultimi anni sono stati fatti notevoli progressi nella comprensione del sistema immunitario del regno animale. I meccanismi che regolano le risposte immunitarie all'attacco di patogeni e parassiti sono stati scoperti con l'aiuto della genetica molecolare. Grazie al sequenziamento completo del genoma di *D. melanogaster* e all'utilizzo di nuove tecniche di proteomica, microarray e RNAi, è stato possibile aumentare le conoscenze riguardo al sistema immunitario di questo insetto, che presenta una stretta omologia con quello dei mammiferi.

Nel regno animale esistono due tipi di immunità: innata e adattativa.

L'immunità innata funge da prima linea di difesa. Le sue funzioni principali riguardano il riconoscimento dei microrganismi estranei e il successivo avvio di meccanismi difensivi, quali la fagocitosi, l'attivazione di sequenze proteolitiche e la sintesi di peptidi antimicrobici in risposta all'infezione.

L'immunità adattativa è caratteristica dei vertebrati, in cui coesiste con l'immunità innata e da cui differisce per essere dotata di memoria. Essa dipende dalla produzione di linfociti e dalla loro espansione clonale (Hoffmann, 2003).

Essendo priva di reazioni caratteristiche dell'immunità adattativa, la risposta antimicrobica degli insetti, con particolare riferimento a *D. melanogaster*, è innata e comprende reazioni umorali e cellulari.

La difesa umorale inizia nel corpo grasso attraverso l'attivazione dei geni coinvolti nella sintesi di peptidi antimicrobici, che vengono quindi secreti nell'emolinfa.

La difesa cellulare, invece, si esprime attraverso una forte attività di fagocitosi attuata da cellule dell'emolinfa, dette emociti.

Anche l'epitelio degli insetti agisce come barriera fisica contro i patogeni. Esiste inoltre una reazione immunitaria epiteliale che prevede la sintesi *in loco* di peptidi antimicrobici e composti ossigenati reattivi in risposta all'infezione.

### 1.6.2.1. Risposta immunitaria sistemica

#### 1.6.2.1.1. Risposta umorale

La risposta umorale si riferisce alla sintesi e alla secrezione nell'emolinfa di potenti peptidi antimicrobici prodotti nel corpo grasso dell'insetto. Il corpo grasso è un tessuto che origina dal mesoderma durante l'embriogenesi e acquisisce la sua funzione immunitaria all'inizio del primo stadio larvale. Grazie alla sua dimensione e alla sua posizione all'interno del sistema circolatorio aperto dell'insetto, il corpo grasso libera i peptidi direttamente nell'emolinfa. In *Drosophila* sono stati individuati 20 diversi peptidi antimicrobici, raggruppati in 7 classi, che agiscono contro i funghi, i batteri Gram-positivi e i batteri Gram-negativi, contribuendo a bloccare la loro proliferazione nell'emolinfa.

I geni che sintetizzano i peptidi antimicrobici sono regolati da due vie metaboliche (o pathway): Toll e Imd.

Toll è generalmente attivato in risposta ai funghi e ai batteri Gram-positivi; esso stabilisce l'asse dorso ventrale negli embrioni di *Drosophila* e partecipa ad altri processi dello sviluppo.

Imd, viene attivato in risposta ai batteri Gram-negativi; ad esso non sono stati attribuiti ruoli nello sviluppo.

A seconda del sito κB presente nei loro promotori, i geni che sintetizzano per i peptidi antimicrobici sono regolati dalla sequenza Toll, dalla sequenza Imd o da entrambe. Studi con microarray hanno evidenziato che Toll e Imd sono responsabili della regolazione di almeno 80% dei geni attivati in seguito a setticemia da ferita e risultano perciò importanti nella sopravvivenza dell'insetto all'infezione microbica.

La tempistica di attivazione di Toll e Imd è diversa; i geni regolati da Imd in genere mostrano un profilo di fase acuta, mentre quelli regolati da Toll mostrano un modello di espressione più tardivo e duraturo.

Esiste inoltre un terzo pathway (JAK/STAT), che svolge un ruolo attivo nella segmentazione dell'embrione. Finora, è stato notato che una deficienza di JAK/STAT in *Drosophila* non compromette la resistenza dell'insetto a batteri e funghi, in quanto continua l'espressione del normale profilo di peptidi antimicrobici; pertanto, un eventuale ruolo di JAK/STAT nella difesa dell'ospite resta ancora da stabilire.

Il pathway JNK, infine, regola molti processi di sviluppo in *Drosophila* e contribuisce alla guarigione delle ferite dell'epidermide. Nonostante non vi siano

evidenze in vivo di un ruolo attivo di questo pathway nella risposta antimicrobica, la sua implicazione nella difesa immunitaria dell'insetto resta possibile.

Il riconoscimento microbico è un processo che richiede il contatto diretto fra una proteina dell'ospite, detta pattern recognition receptor (PRR) e una molecola microbica. Nei pathways Toll e Imd, tale azione è svolta dalle peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) e dalle Gram-negative binding proteins (GNBPs), che si fissano ai ligandi microbici e attivano la profenolossidasi, una cascata enzimatica che determina la produzione di melanina e la conseguente melanizzazione dei patogeni e dei tessuti dell'ospite.

Il riconoscimento dei batteri avviene grazie alle PGRPs, che sono in grado di distinguere gli specifici peptidoglicani (PGN) presenti sulla parete cellulare dei batteri Gram-positivi (Lys-type PGN<sup>5</sup>) e dei batteri Gram-negativi (DAP-type PGN<sup>6</sup>), attivando rispettivamente il pathway Toll e il pathway Imd.

Il riconoscimento dei funghi entomopatogeni, invece, avviene grazie alla Gram-negative binding protein (GNBP3), una PRR circolante che agisce nel pathway Toll.

L'organizzazione dei pathway Toll e Imd è diversa; il primo è attivato dalle PRRs secrete nell'emolinfa, mentre il secondo è attivato dalle PRRs associate alla membrana. Tale differenza nell'architettura dei due pathway si riflette in due diversi meccanismi di azione nel riconoscimento dei patogeni: un meccanismo diretto per il pathway Toll, in cui le PRRs possono attaccarsi ai ligandi microbici presenti sulla superficie dei batteri Gram-positivi e dei funghi; un meccanismo indiretto per il pathway Imd, il quale è attivato dai PGN rilasciati dal periplasma dei batteri Gram-negativi.

Nel caso di Toll, una volta avvenuto il riconoscimento e l'attacco ai ligandi microbici da parte delle PRRs, si ha l'attivazione di SPE (Spätzle processing enzyme); questa proteina innesca una cascata proteolitica che porta alla liberazione di Spätzle, un peptide endogeno presente nell'emolinfa dell'insetto in forma inattiva (Pro-Spätzle). La citochina Spätzle si lega quindi ai recettori transmembrana Toll, che attivano la fosforilazione e la degradazione di Cactus, una proteina inibitrice dei fattori di

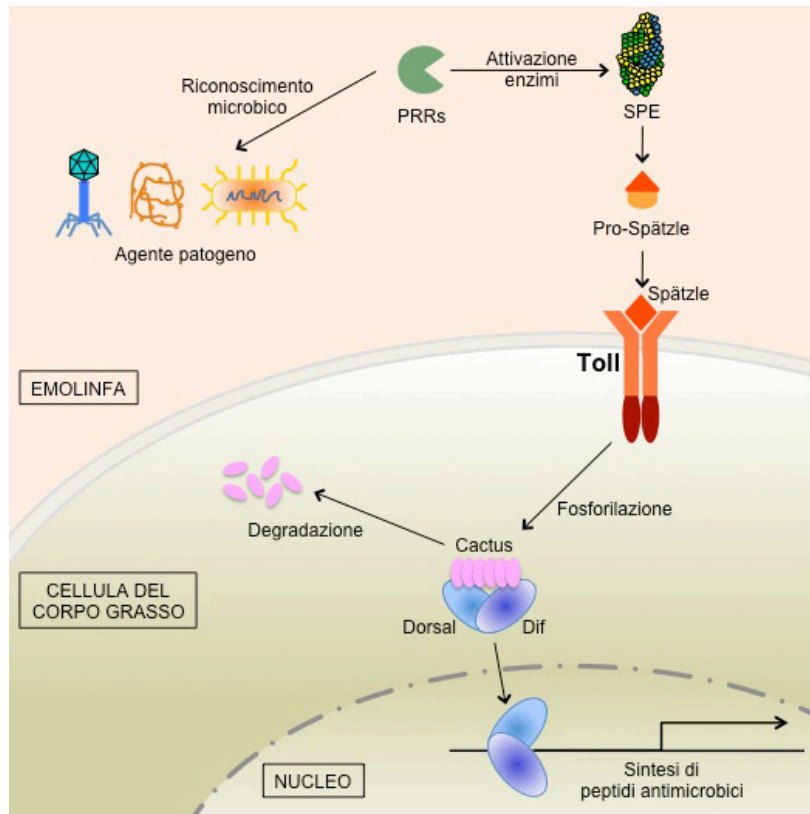
---

<sup>5</sup> I Lys-type PGN sono peptidoglicani che presentano la lisina sul terzo atomo di carbonio della catena.

<sup>6</sup> I DAP-type PGN sono peptidoglicani che hanno rimpiazzato, sul terzo atomo di carbonio della catena, la lisina con l'acido *meso*-diaminopimelico.

trascrizione della famiglia NF- $\kappa$ B, quali Dorsal e Dif. La distruzione di Cactus permette la traslocazione dei suddetti fattori di trascrizione nel nucleo, determinando un rapido incremento dell'espressione dei peptidi antimicrobici, che sono infine liberati nell'emolinfa (figura 3).

Figura 3 – Modello di attivazione del pathway Toll.



#### 1.6.2.1.2. Risposta cellulare

La cavità corporea di *Drosophila*, come quella di tutti gli artropodi, è piena di emolinfa circolante che contiene cellule libere e cellule sessili (emociti). Le larve di *Drosophila* posseggono migliaia di emociti, che possono essere distinti in tre tipi sulla base della loro struttura e funzione.

1. I plasmaciti, che rappresentano il 90-95% di tutti gli emociti maturi, possono fagocitare le cellule morte e i microrganismi patogeni (batteri e lieviti) in pochi minuti.

2. I lamellociti, che sono relativamente larghi e appiattiti, possono incapsulare o neutralizzare oggetti troppo grandi per essere fagocitati; non sono presenti negli embrioni e nemmeno negli individui adulti.

L'incapsulamento è una reazione di difesa estrema messa in atto contro i parassiti. In presenza di un parassita, infatti, i lamellociti formano una sorta di capsula multistratificata attorno all'intruso, seguita da un annerimento dovuto alla melanizzazione della capsula stessa. All'interno della capsula, il parassita viene eventualmente ucciso con composti citotossici.

3. Le cellule cristallo, che costituiscono circa il 5% degli emociti della larva, sono coinvolte nei processi di melanizzazione.

In *Drosophila*, l'ematopoiesi avviene durante la fase embrionale e durante lo sviluppo larvale; negli adulti non è stata osservata la formazione di emociti, che sono presenti sotto forma di qualche migliaio di plasmaciti maturi.



### 1.6.2.2. Risposta immunitaria locale

#### 1.6.2.2.1. Immunità epiteliale

Poiché l'epitelio è costantemente in contatto con un gran numero di microrganismi, questa superficie deve essere dotata di un efficiente sistema di ricognizione e controllo microbico. L'intestino e la trachea, due possibili vie di infezione, sono foderati da una matrice chitinosa, che conferisce resistenza all'attacco dei patogeni. Inoltre, il lume dell'intestino rappresenta un ambiente ostile per i microrganismi, grazie alle sue proprietà fisiche e fisiologiche, ma soprattutto grazie alla produzione locale di lisozima, che è dotato di attività antimicrobica.

Infine, la produzione locale di peptidi antimicrobici e di composti ossigenati reattivi (reactive oxygen species – ROS) rappresentano due ulteriori meccanismi di difesa nell'intestino degli insetti.

#### *Produzione di peptidi antimicrobici*

In *Drosophila*, i geni coinvolti nella sintesi di peptidi antimicrobici sono espressi in alcune zone dell'epitelio in contatto con l'ambiente esterno, quali l'epidermide, il sistema riproduttivo, il tratto respiratorio e quello digestivo. In questo caso, la sintesi dei peptidi antimicrobici attiene alla risposta immunitaria locale, che può essere a sua volta distinta in costitutiva o inducibile.

Nella risposta costitutiva, il gene responsabile della sintesi dei peptidi antimicrobici è espresso in un tessuto definito e la sua trascrizione non è sovra-regolata durante l'infezione microbica. Nella risposta inducibile, l'espressione del suddetto gene è innescata dall'infezione di batteri Gram-negativi ed è mediata dal pathway Imd.

#### *Produzione di ROS*

In *Drosophila*, l'infezione batterica induce una rapida sintesi nell'intestino di composti ossigenati reattivi. Il rilascio di tali composti avviene grazie all'attivazione del gene *Duox*, che avvia la sintesi di una proteina in grado di trasformare il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) in acido ipocloroso (HOCl), un potente microbicida. Tuttavia, l'eccessiva produzione di tale composto è dannosa anche per l'insetto, che è dotato di un sistema di detossificazione ad opera dell'immune responsive catalase (IRC).

Questo tipo di risposta immunitaria non attiene al pathway Imd e fornisce un'ulteriore barriera contro i microrganismi ingeriti dall'insetto.

#### 1.6.2.2.2. Coagulazione e melanizzazione

##### *Coagulazione*

Il processo di coagulazione dell'emolinfa è essenziale per limitare la perdita eccessiva di tale fluido dopo una ferita. Inoltre, il coagulo che si forma rappresenta una risposta immunitaria importante, in quanto costituisce una barriera fisica contro le infezioni, oltre a immobilizzare i batteri e promuovere la loro eliminazione.

In seguito a ferita, i plasmotociti rilasciano immediatamente una proteina (hemolectin) che, assieme ad altre, partecipa alla formazione delle fibre del coagulo. Le connessioni fra le fibre avvengono grazie ad altre proteine, quali Fondue, transglutaminasi e profenolossidasi (proPO); in particolare, Fondue è una proteina abbondante nell'emolinfa dell'insetto e la sua sintesi è regolata dal pathway Toll.

Solo dopo la chiusura della ferita iniziano i processi di melanizzazione e movimento dell'epitelio.

##### *Melanizzazione*

In *Drosophila*, una risposta immunitaria immediata riguarda la reazione di melanizzazione, che si osserva nei pressi della ferita cuticolare o sulla superficie del parassita che invade l'emocele. Tale reazione di annerimento deriva dalla deposizione di melanina sintetizzata *de novo*. La produzione di melanina avviene in seguito all'attivazione della profenonossidasi. Il genoma di *Drosophila* codifica per tre proPOs: DoxA1, CG8193 e DoxA3; le prime due sono espresse nelle cellule cristallo, mentre DoxA3 è espressa esclusivamente nei lamellociti, pertanto può partecipare ai processi di melanizzazione durante l'incapsulamento dell'intruso.

Nessuno dei classici immuno pathways (Toll, Imd e JACK/STAT) è coinvolto in un rilascio rapido delle fenolossidasi da parte delle cellule cristallo; inoltre, la fonte delle fenolossidasi negli adulti, che sono privi di cellule cristallo, non è tuttora nota.

#### 1.6.2.4. Immunità antivirale

I virus sono importanti patogeni naturali di *D. melanogaster*. Circa il 40% di questi insetti è infettato da virus, che possono essere trasmessi orizzontalmente o verticalmente. Tuttavia, l'immunità antivirale di *Drosophila* è stata studiata a fondo solo per pochi agenti virali, quali Sigma Virus e Drosophila C Virus (DCV).

In particolare, DCV produce una risposta trascrizionale diversa da quella prodotta a causa dell'infezione da batteri e funghi. Alcuni dei geni specifici attivati in seguito all'infezione di DCV sono regolati dal pathway JACK/STAT, mentre altre componenti del pathway Toll (Toll e Dif) sono implicate nella resistenza nei confronti di Drosophila X Virus. Anche in *Aedes aegypti* L. il pathway Toll è coinvolto nella difesa antivirale nei confronti di Dengue Virus (Xi *et al.*, 2008).

Costa *et al.* (2009) hanno dimostrato che il pathway Imd è coinvolto nella difesa antivirale, indicando come i mutanti di Imd siano sensibili all'infezione nei confronti di Cricket Paralysis Virus (CrPV).

Gli studi finora condotti supportano l'esistenza di una risposta antivirale in *Drosophila*. Tuttavia, i meccanismi attraverso cui l'insetto riconosce l'infezione virale non sono ancora stati indagati; inoltre, non sono ancora state identificate vere e proprie molecole antivirali in *Drosophila*.

In realtà, esistono altre risposte messe in atto da *Drosophila* per contenere l'infezione virale, quali la degradazione dell'RNA del virus attraverso RNA interference (RNAi) e l'attivazione delle citochine, che viene regolata dal pathway JACK/STAT. Anche una risposta cellulare, mediante la fagocitosi di cellule infette ad opera degli emociti, è utilizzata dall'insetto per controllare i virus (Costa *et al.*, 2009).

## ***1.7. I meccanismi di difesa in A. mellifera***

### *1.7.1. La difesa a livello di colonia*

Nelle colonie degli insetti sociali vivono migliaia di individui in uno spazio molto ridotto; tale densità, associata alla presenza di riserve alimentari in un ambiente omeostatico per temperatura e umidità, rende l'alveare un ottimo bersaglio per l'attacco di parassiti e patogeni. Tuttavia, gli insetti sociali, con particolare riferimento ad *A. mellifera*, sono in grado di esprimere diversi meccanismi di difesa collettiva di seguito elencati.

- Grooming behavior, inteso come la capacità di liberarsi dalla varroa da parte di una singola ape (*auto-grooming*) o grazie all'attività di altre api (*allo-grooming*) (Spivak, 1996).

- Removal behavior, inteso come la capacità di individuare efficacemente la covata infestata da un parassita o infettata da un patogeno, che viene quindi rimossa dalle cellette (Boecking e Spivak, 1999).

- Absconding, ovvero la tendenza delle colonie d'api ad abbandonare il nido in caso di infestazioni elevate da parte della varroa; tale abilità è maggiormente sviluppata nelle api africane rispetto a quelle europee (Frazier *et al.*, 2009).

- Costruzione del nido impiegando materiali ad azione antimicrobica, quali resine e propoli; quest'ultima sostanza viene inoltre impiegata per rivestire le cellette di covata, al fine di allevare le larve in un ambiente sterile (Simone-Finnstrom e Spivak, 2010).

- Incremento della temperatura del nido, al fine di provocare la cosiddetta "febbre dell'alveare" in risposta a un'infezione diffusa di patogeni termo sensibili (es. *Ascospaera apis*) (Starks *et al.*, 2000).

### *1.7.2. La difesa a livello di individuo: il sistema immunitario dell'ape*

Salvo dove specificato diversamente, le informazioni riportate in questo paragrafo sono state tratte da Evans *et al.* (2006).

Nonostante *A. mellifera* manifesti un difetto di geni del sistema immunitario pari al 30% rispetto ad altre specie di insetti come *D. melanogaster* e *Anopheles gambiae*

Giles, nel genoma dell'ape sono stati comunque identificati i principali immuno pathways: Toll, Imd, JAK/STAT e JNK. È stato ipotizzato che il ridotto numero di geni del sistema immunitario nell'ape sia dovuto alla sua maggiore capacità di rispondere all'attacco dei patogeni in qualità di insetto sociale; è altrettanto vero, però, che i meccanismi di difesa individuali sono comunque essenziali anche in un contesto sociale.

### *Pathway Toll*

Come già osservato per *Drosophila*, il pathway Toll si attiva quando la citochina Spätzle si lega al recettore transmembrana Toll. Nel genoma dell'ape sono stati evidenziati due possibili ortologi<sup>7</sup> di Spätzle (GB15688 e GB13503), tuttavia sono necessari test funzionali per stabilire quale dei due agisca come citochina che si lega a Toll.

In *Drosophila*, la degradazione di Cactus (la proteina che inibisce NF-κB) porta alla traslocazione del fattore di trascrizione Dorsal (ed eventualmente Dif) nel nucleo, con conseguente attivazione dei geni che codificano per la sintesi dei peptidi antimicrobici. Nel genoma dell'ape sono stati trovati due omologi<sup>8</sup> di Dorsal, nessuno dei quali sembra ortologo con Dif. Ulteriori indagini potranno determinare quale dei due paraloghi<sup>9</sup> rappresenti il fattore di trascrizione chiave di questo pathway.

In *A. mellifera*, i possibili effettori della risposta immunitaria mediata da Toll in seguito a ferita o all'attacco di patogeni sono i peptidi antimicrobici, gli agenti responsabili della melanizzazione e tre lisozimi.

### *Pathway Imd*

In *Drosophila*, l'attivazione del pathway Imd avviene grazie al fattore di trascrizione Relish (appartenente anch'esso alla famiglia NF-κB), il quale, una volta sbloccato, si porta verso il nucleo, inducendo la trascrizione dei peptidi antimicrobici. È stato osservato che il pathway Imd delle api è simile a quello di *Drosophila*,

---

<sup>7</sup> Gli ortologi sono geni evoluti direttamente da un gene ancestrale e che pertanto sono omologi in specie differenti.

<sup>8</sup> Gli omologi sono geni che, pur essendo presenti in specie diverse, codificano per la sintesi di proteine con struttura e funzione simile.

<sup>9</sup> I paraloghi sono geni originati dalla duplicazione di un unico gene nello stesso organismo e che pertanto sono omologi nella stessa specie.

manifestando la presenza di orologi per ciascuno dei suoi componenti. Anche in *A. mellifera*, quindi, Imd è responsabile della produzione di peptidi antimicrobici, oltre che di agenti responsabili della melanizzazione e dell'apoptosi cellulare.

Inoltre, l'attivazione di Relish determina la promozione di alcuni componenti del pathway JNK, il quale può fornire feed-back positivi e negativi riguardo l'espressione dei peptidi antimicrobici. Nel genoma dell'ape sono stati identificati i potenziali orologi per ciascuno dei componenti principali di JNK.

#### *Pathway JAK/STAT*

Il pathway JAK/STAT può contribuire all'espressione dell'immunità innata degli insetti, determinando la proliferazione degli emociti. Inoltre, in *Drosophila*, questo pathway svolge un ruolo attivo nella difesa antivirale. Gli omologhi del pathway JAK/STAT identificati nel genoma delle api comprendono il recettore della citochina Domeless (Dom), la JAK tirosina chinasi (Hopscotch) e il fattore di trascrizione STAT92E; ciò indica che il meccanismo di funzionamento di questo pathway è comune fra gli insetti ed è identico fra api e *Drosophila*.

Nonostante *A. mellifera* abbia mantenuto tutti gli immuno pathways conosciuti negli insetti, comparando un set di 17 famiglie di geni e di gruppi funzionali implicati nella risposta immunitaria, si nota che le api hanno un numero nettamente inferiore (71) di paraloghi rispetto a *Drosophila* e *Anopheles* (196 e 209 rispettivamente).

Con particolare riguardo agli immuno effettori, è possibile osservare che le api sono in grado di produrre solo 6 peptidi antimicrobici, contro i 20 e i 9 identificati in *Drosophila* e *Anopheles* rispettivamente. Inoltre, le api posseggono solo un gene che codifica per la sintesi di profenolossidasi (proPO) contro 3 e 9 geni presenti in *Drosophila* e *Anopheles* rispettivamente.

Nel genoma delle api, infine, sono presenti solo 3 lisozimi, che hanno attività antimicrobica e 4 proteine contenenti tiolesteri (TEPs), che in *Drosophila* si attivano in seguito a sepsi da ferita e promuovono la fagocitosi dei patogeni.

## ***1.8. Obiettivi della ricerca***

Il fenomeno “morie delle api”, registrato in varie regioni del pianeta in tempi recenti, presenta una grande variabilità nei suoi connotati e l’individuazione delle possibili cause è purtroppo ancora di là da venire. Viceversa, il fenomeno “collasso della colonia”, ovvero il repentino deperimento della famiglia oltre il livello di sostenibilità e l’eventuale spopolamento totale, quale che sia l’agente scatenante, è un evento caratteristico e peculiare che riguarda le famiglie di questi insetti sociali ed è legato all’interazione di fattori causali, meccanismi di difesa della colonia e condizioni ambientali.

Si ritiene che un approfondito studio meccanicistico del fenomeno del collasso rappresenti la premessa essenziale di qualsiasi indagine di carattere conoscitivo e anche di eventuali interventi curativi.

Pertanto, in questo lavoro sono state inizialmente prese in considerazione la sintomatologia e l’eziologia del fenomeno, predisponendo un adeguato esperimento di campo in cui è stato indagato il collasso delle colonie nel suo divenire; prove di laboratorio sono servite per integrare i dati raccolti in campo e confermare le tendenze osservate.

L’approccio adottato in questa ricerca è stato di tipo “longitudinale” ed è stata data rilevanza, più che alla variabile spazio, alla variabile tempo. In particolare, sono stati effettuati campionamenti periodici di materiale biologico, lungo il corso di un’intera stagione produttiva, sugli alveari di due apiari, uno trattato contro il parassita *V. destructor* e l’altro non trattato. Questo disegno sperimentale è stato concepito per consentire un esame dettagliato e diretto dei fattori che inducono il collasso, al fine di effettuare un’analisi causa-effetto<sup>10</sup> del problema anziché un semplice studio di correlazione geografica<sup>11</sup>.

Successivamente, sono state indagate le cause remote del fenomeno osservato in campo, ovvero i fattori che determinano la mortalità delle api sia nella sua forma “acuta”, che precede il collasso, sia nella forma “cronica” associata all’infestazione.

---

<sup>10</sup> Lo studio causa-effetto cerca il nesso tra il fattore di rischio e l’insorgenza della malattia legata a esso, ponendosi come obiettivo quello di rispondere alla domanda: “Perché?”.

<sup>11</sup> Lo studio di correlazione geografica analizza, in un territorio ben definito, la prevalenza dei fattori di rischio e la mortalità per una data patologia, dove la mortalità è messa in rapporto con la diversa esposizione/distribuzione di uno o più fattori di rischio.

Un simile studio ha richiesto, giocoforza, l'adozione di un approccio diverso da quelli utilizzati finora, oltre all'impiego di strumenti di indagine adeguati. In particolare, data la complessità del sistema "colonia di api", si è cercato di indagare l'evento a tutti i livelli dell'organizzazione biologica adottando, di volta in volta, gli strumenti più adeguati: dalle tecniche apistiche per la gestione degli alveari, alle metodologie chimico-analitiche, alle tecniche di biologia molecolare, fino ai più moderni strumenti di analisi metagenomica e trascrittomica.



## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1. Premessa

Il presente lavoro è frutto di una ricerca svolta nell'ambito del progetto "ApeNet – Ricerca e Monitoraggio in Apicoltura", finanziato dal MiPAAF (Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali) nel 2009 per far luce sulle cause delle morie di api che sono state registrate negli ultimi anni in Italia. Il progetto ha affrontato il problema dello spopolamento degli alveari sotto vari punti di vista, indagando ad esempio sulle relazioni esistenti fra le morie di api e l'utilizzo di agrofarmaci o di mais conciato, oppure sui fattori ambientali che possono determinare questo fenomeno.

In particolare, all'unità di Udine, attiva presso il Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali (UniUD) è stata affidata la linea di ricerca riguardante l'ape e i patogeni; ciò ha permesso di indagare l'effetto dei parassiti e dei patogeni sulla sopravvivenza delle colonie, in uno studio che parte dall'alveare, passa attraverso l'individuo fino ad arrivare ai suoi geni.

Una ricerca così complessa e articolata, per essere portata a termine, ha richiesto competenze, strutture, attrezzature e forza lavoro adeguate, requisiti questi che l'unità operativa di Udine, da sola, non era in grado di fornire. Per tale ragione, l'attività e i risultati che sono descritti in questa tesi di dottorato sono il frutto di una stretta collaborazione con l'unità operativa dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II", Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria "Filippo Silvestri" (UniNA) già inclusa nel progetto ApeNet, mentre alcune analisi specifiche sono state commissionate all'Istituto di Genomica Applicata (IGA) di Udine.

Al fine di fornire al lettore un quadro completo delle attività svolte ed essendo i risultati ottenuti dalle suddette unità operative strettamente connessi fra loro, è stato ritenuto opportuno includerli tutti nel presente lavoro. Tuttavia, per una maggiore chiarezza e soprattutto per correttezza nei confronti del lettore, di seguito si riporta una tabella relativa alle principali attività svolte nell'ambito di questa tesi, specificando, per ciascuna di esse, l'unità operativa che ha effettuato il campionamento, le analisi o l'elaborazione dei dati (tabella 1).

Tabella 1 – Elenco delle attività svolte dalle diverse unità operative.

§	Procedura sperimentale	Campionam.	Analisi	Elaborazione dati
2.3.	<i>Eziologia e sintomatologia del collasso della colonia (cause prossime del collasso)</i>			
2.3.1.	Prova di campo	UniUD	UniUD-UniNA	UniUD-UniNA
2.3.2.	Analisi metagenomica	UniUD	IGA	UniUD-IGA
2.3.3.	Analisi PCR dei virus delle api	UniUD	UniNA	UniNA
2.4.	<i>Cause remote del collasso</i>			
2.4.1.	Api e acari usati nelle prove di laboratorio	UniUD		
2.4.2.	Effetto dell'infestazione sulla replicazione virale	UniUD	UniNA	UniUD-UniNA
2.4.3.	Allevamento delle api in laboratorio	UniUD		
2.4.4.	Effetto dell'infezione virale sulla sopravvivenza delle api	UniUD	UniUD	UniUD
2.4.5.	RNA-seq	UniUD	IGA	UniUD-IGA
2.4.6.	Effetto dell'infestazione sull'espressione di <i>dorsal-1A</i>	UniUD	UniNA	UniUD-UniNA
2.4.7.	RNAi	UniNA	UniNA	UniNA
2.5.	<i>Ulteriori cause di mortalità delle api</i>			
2.5.1.	Effetto dell'infestazione sulla sopravvivenza delle api	UniUD	UniUD	UniUD
2.5.2.	Influenza del peso allo sfarfallamento sulla longevità delle api	UniUD	UniUD	UniUD
2.5.3.	Determinazione del contenuto idrico delle api	UniUD	UniUD	UniUD
2.5.4.	Dinamica della perdita di peso nell'ape: dallo stadio di pupa a quello di adulto	UniUD	UniUD	UniUD
2.5.5.	Estrazione dei lipidi totali	UniUD	UniUD	UniUD
2.5.6.	Estrazione degli idrocarburi cuticolari delle api e analisi GC-MS	UniUD	UniUD	UniUD
2.5.7.	Effetto dell'umidità sulla sopravvivenza delle api	UniUD	UniUD	UniUD
2.6.	<i>Analisi statistica</i>			UniUD

## 2.2. Il piano sperimentale

### *Eziologia e sintomatologia del collasso della colonia (cause prossime del collasso)*

In una località isolata del Friuli Venezia Giulia sono stati allestiti due apiari sperimentali; uno ha ricevuto i trattamenti acaricidi convenzionali contro la varroa, mentre l'altro non è stato trattato, al fine di monitorare gli effetti di un incremento progressivo della popolazione di acari sulla colonia di api. In particolare, è stata studiata la dinamica di popolazione delle api e della varroa, nonché la mortalità delle api. Sono stati inoltre effettuati campionamenti periodici di api per valutare, anche attraverso un'analisi metagenomica, la presenza e la quantità di patogeni nei due apiari, con particolare riguardo a DWV.

### *Cause remote del collasso*

Al fine di verificare quanto osservato in campo, ovvero confermare il nesso causale fra l'infestazione di *V. destructor* e l'infezione di DWV che determina l'incremento di mortalità delle api fino all'eventuale collasso della colonia, sono stati svolti alcuni esperimenti di laboratorio.

In particolare, è stata valutata la longevità delle api infestate artificialmente con 1 o 3 varroe e di quelle infettate iniettando un lisato di ape contenente dosi crescenti di copie virali di DWV; inoltre, è stato studiato l'effetto dell'infestazione sulla replicazione del virus. Per far ciò, le api sono state allevate in gabbiette di plastica in condizioni controllate di temperatura e umidità.

Infine, sono state studiate le possibili alterazioni del sistema immunitario, associate all'infestazione di *V. destructor*, che possono indurre la replicazione virale. Allo scopo, è stata svolta un'analisi trascrittomico di campioni di api adulte prelevati dalle colonie sperimentali a fine stagione, quando si registra il picco di mortalità delle api. In particolare, sono stati presi in considerazione i geni del sistema immunitario dell'ape, puntando l'attenzione su quelli risultati significativamente sotto-espressi negli alveari molto infestati e infettati. Il maggior effetto negativo è stato osservato per *dorsal-1A*, un gene appartenente alla famiglia NF- $\kappa$ B; per verificare se il livello di trascrizione di tale gene svolga un ruolo cruciale nella risposta immunitaria antivirale, controllando la replicazione di DWV, l'espressione di *dorsal-1A* è stata inibita mediante RNAi.

### *Ulteriori cause di mortalità delle api*

Dopo aver indagato le cause del repentino incremento di mortalità delle api che determina il collasso delle colonie, sono state studiate ulteriori cause di mortalità associate al lento declino degli alveari che precede tale evento.

Allo scopo, sono state infestate artificialmente con nessuna, 1 o 3 varroe, larve di api allevate in cellette di gelatina. Allo sfarfallamento, le api sono state pesate e allevate in condizioni di laboratorio per valutarne la longevità. Per individuare il motivo della differenza in peso che si osserva fra le api delle diverse tesi allo sfarfallamento, gli individui sono stati pesati prima e dopo essere stati disidratati in stufa. Il ridotto contenuto idrico che si rileva nelle api infestate potrebbe essere causato da un'incapacità di trattenere i liquidi, a sua volta provocata da un'alterazione del rivestimento lipidico presente sul tegumento degli insetti. Per tale motivo, sono stati estratti in esano gli idrocarburi cuticolari di api infestate e non, che sono stati analizzati da un punto di vista qualitativo e quantitativo con tecniche di gas-cromatografia.

Infine, è stata confrontata la sopravvivenza di api infestate e non, allevate a 34 °C ma a due diversi regimi di umidità relativa (60% e 75%), per verificare l'effettiva capacità delle api infestate di tollerare gli stress idrici.

Nella tabella 2 sono riportati in maniera dettagliata gli esperimenti svolti nella presente tesi.

Tabella 2 – Elenco dettagliato degli esperimenti svolti nel corso della tesi. Per ogni esperimento è stato riportato: l'età delle api impiegate nella prova; il numero di replicazioni; il numero di api usate complessivamente per ciascuna tesi.

§	Esperimento	Età Api	N. Repl.	N. api usate							dsRNA <i>dorsal-1A</i>	dsRNA <i>mGFP6</i>								
				L	L+1V	L+3V	NW <sub>1,000</sub>	DW <sub>1,000</sub>	DW <sub>1,000,000</sub>	DW <sub>1,000,000</sub>										
2.3.2.	Analisi metagenomica (1 x Co)	A	1	10x6	10x5															
2.3.3.	Prevalenza virus api (1 x Co)	A	5	5x6	5x5															
2.3.3.	Quantità DWV (1 Set. + 1 Ott.)	A	2	6+14	13+11															
2.4.2.	Effetto infestazione su replicazione virale	1g. PO 6g. PO 12g. PO	1																	
2.4.4.	Effetto infestazione su sopravvivenza api	PS	3						43	28		21								
2.4.5.	RNA-seq	A	1	10x6	10x5															
2.4.6.	Effetto infestazione su espressione <i>dorsal-1A</i>	S	1																	
2.4.7.	RNAi	0h PS 48h PS 96h PS	1																	
2.5.1.	Effetto infestazione su sopravvivenza api	PS	3																	
2.5.2.	Influenza del peso su longevità api	PS	3																	
2.5.3.	Determinazione contenuto idrico api	S	4																	
2.5.4.	Dinamica perdita peso: da pupa ad adulto	1-12g. PO	1																	
2.5.5.	Estrazione lipidi totali		3																	
2.5.6.	Estrazione e analisi idrocarburi cuticola api	S	1																	
2.5.7.	Umidità e sopravvivenza api	60% U.R. 75% U.R.	3																	

LEGENDA:

- I = n. individui
- Co = n. colonie
- A = adulta
- g. PO = giorni post opercolatura
- S = sfarfallamento
- PS = post sfarfallamento

## ***2.3. Etiologia e sintomatologia del collasso della colonia (cause prossime del collasso)***

### ***2.3.1. Prova di campo***

Per comprendere il fenomeno del collasso della colonia è necessario capire la dinamica di popolazione delle famiglie d'api e dei maggiori parassiti e patogeni presenti negli alveari.

Per raggiungere tale obiettivo, nell'Aprile del 2009, in una località isolata delle Prealpi Giulie (Porzus, Udine, Italia; 46°11' N, 13°20' E; 700 m s.l.m.) sono stati allestiti due apiari costituiti da sei alveari ciascuno. La zona è caratterizzata dalla presenza di prati stabili, che ospitano numerose essenze spontanee, aree arbustive (corniolo e nocciolo) e boschi subnaturali (acacia, acero, carpino, castagno e ciliegio), con fioriture di interesse apistico che si estendono da Aprile a Luglio. Studi condotti in precedenza indicavano che le popolazioni di api locali sono ibridi fra *A. m. ligustica* Spinola e *A. m. carnica* Pollman (Comparini e Biasiolo, 1991; Nazzi, 1992); le api regine erano locali e inseminate naturalmente.

Poiché la reinfestazione<sup>12</sup> può fortemente influenzare la dinamica di popolazione del parassita negli alveari di uno stesso apiario o comunque vicini fra loro (Greatti *et al.*, 1992), gli apiari distavano 1,6 km l'uno dall'altro.

In un apiario, la popolazione di *V. destructor* è stata mantenuta a livelli bassi per tutto il corso della prova, grazie all'utilizzo di trattamenti acaricidi comunemente impiegati nell'attività apistica; le colonie di questo apiario sono state indicate come CPI (colonie poco infestate). In presenza di covata (da metà Agosto a metà Settembre), questi alveari sono stati trattati con acaricidi naturali a base di timolo (ApiLife Var<sup>®</sup>). In assenza di covata (alla fine di Ottobre) sono stati applicati due trattamenti con acido ossalico a distanza di una settimana l'uno dall'altro; in particolare, sono stati spruzzati per ciascuna faccia di favo coperta da api, 5 ml di una soluzione preparata con 30 g di acido ossalico disciolti in 1 l di acqua deionizzata.

---

<sup>12</sup> La reinfestazione è un fenomeno strettamente legato al saccheggio di miele, che avviene fra gli alveari che stanno all'interno del raggio di volo delle api (1,5 km). Il saccheggio si verifica generalmente a fine estate, quando il flusso nettario è scarso. In questa occasione, le varroe dell'alveare saccheggiato, generalmente più debole e in fase di collasso, si trasferiscono sulle api "sacchegiatrici" per essere trasportate all'alveare saccheggiatore, numericamente più forte. In questo modo, nell'alveare saccheggiatore si registra un afflusso di varroe che può raggiungere i 75 acari/giorno e che vanifica l'effetto dei trattamenti acaricidi eventualmente impiegati.

Nell'altro apiario, invece, non sono stati effettuati trattamenti acaricidi per tutto il corso della sperimentazione; le colonie di questo apiario sono state indicate come CMI (colonie molto infestate). In Agosto, un alveare di questo apiario è stato escluso dalla prova, in quanto l'ape regina è diventata fucaiola<sup>13</sup>, determinando il rapido spopolamento della colonia.

Da Maggio a Ottobre è stato stimato mensilmente il numero di api presenti in ciascun alveare della prova, in seguito indicato come "forza della famiglia". La popolazione di api è stata rilevata al tramonto, quando tutti gli individui sono presenti nell'arnia, con il "metodo dei sestì", ovvero dividendo ipoteticamente un telaio in sei parti e contando il numero di sestì di telaio parzialmente o totalmente ricoperti di api; sapendo che un sestò di favo completamente ricoperto da api adulte corrisponde a 253 individui (Marchetti, 1985), è stato possibile calcolare la popolazione totale di api per ciascun alveare. Utilizzando lo stesso metodo e sapendo che un sestò di favo corrisponde a 728 cellette di covata di ape operaia, è stato calcolato il numero complessivo di cellette di covata opercolata per ciascun alveare, in seguito indicato come "forza della covata".

A partire da Giugno, sempre a cadenza mensile e sfruttando i dati riguardanti la "forza della famiglia" e la "forza della covata", sono state stimate in laboratorio l'infestazione delle api adulte e l'infestazione della covata per ciascun alveare dei due apiari.

L'infestazione delle api adulte è stata valutata su un campione di circa 1000 api, ottenute da un telaio posizionato nella parte centrale di ciascun alveare. In laboratorio, le api sono state trasferite in una beuta e coperte da una soluzione acquosa di alcol al 35%. La beuta è stata tappata con del parafilm e agitata vigorosamente a mano per circa 5 minuti. Le api sono quindi state filtrate in un setaccio a maglia grossa (2 mm Ø), che consentiva il solo passaggio della soluzione e delle varroe eventualmente presenti in essa. La soluzione è stata ulteriormente filtrata con un setaccio a maglia fine (0,5 mm Ø) per fermare le varroe ed è stata nuovamente utilizzata per sciacquare le api. Il campione è stato processato ripetutamente fino a quando, per tre lavaggi consecutivi, non sono stati più raccolti acari. L'infestazione è stata valutata in termini di numero di varroe per ape adulta.

---

<sup>13</sup> L'ape regina è detta fucaiola quando depone solo uova non fecondate, da cui originano individui maschi (fuchi).

L'infestazione della covata è stata valutata utilizzando una porzione di favo con covata opercolata (10x10 cm), prelevata da un telaio centrale di ciascun alveare durante i campionamenti mensili. Al fine di verificare la presenza o meno dell'acaro, in laboratorio sono state scelte a caso, per essere aperte e ispezionate, 50 cellette opercolate di ape operaia per ogni faccia di ciascuna porzione di favo. Per la stima sono state considerate solo le varroe rosso-brune, al fine di escludere dal computo la progenie della varroa madre. L'infestazione è stata espressa come numero di varroe per celletta di covata.

L'infestazione totale di ciascun alveare in prova è stata calcolata utilizzando la formula riportata di seguito.

$$\text{Infestaz.tot.} = \frac{[(\text{Infestaz api adulte} \times \text{n}^\circ \text{api adulte}) + (\text{Infestaz covata} \times \text{n}^\circ \text{celle covata})]}{(\text{n}^\circ \text{api adulte} + \text{n}^\circ \text{celle covata})} \times 1000$$

Da Maggio a Ottobre, con cadenza settimanale, sono state contate le api morte rinvenute nelle gabbie under-basket<sup>14</sup> che sono state collocate di fronte a ciascun alveare. Grazie a questo dato, è stato possibile calcolare la mortalità delle api, ottenuta dal rapporto fra la media delle api morte giornalmente nell'intervallo di tempo che intercorreva fra i campionamenti mensili e la popolazione media di api nel corrispondente periodo, moltiplicato per 1000.

Infine, a ogni campionamento mensile, sono state prelevate 25 api per alveare, di cui 5 sono state analizzate con RT-PCR al fine di verificare la prevalenza di alcuni dei principali virus che colpiscono le api, quali: ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV e SBV.

---

<sup>14</sup> La gabbia under-basket è una struttura rettangolare in legno (100x60x10 cm) con rete metallica (2 cm Ø) sul lato superiore e cassetto estraibile. Essa viene posizionata di fronte agli alveari per raccogliere e contare le api delle api morte che sono espulse dal nido dalle api di casa.



### 2.3.2. Analisi metagenomica

Nel mese di Ottobre, in corrispondenza del picco di mortalità delle api, da ciascun alveare in prova è stato prelevato un campione di 10 api. Una volta trasferite in azoto liquido, l'RNA delle api è stato estratto utilizzando il Tri-Reagent (Ambion Inc.). Il campione di RNA è stato quindi analizzato impiegando l'mRNA-seq sample prep kit (Illumina, Inc., CA, USA), saltando la fase di arricchimento di RNA messaggeri e partendo da 100 ng di RNA totale. Utilizzando cationi divalenti a temperature elevate, l'RNA è stato frammentato in piccole parti; successivamente, mediante una trascrizione inversa, è stato sintetizzato il cDNA, a cui sono stati legati gli adattatori Illumina. Sono stati quindi eliminati gli adattatori non legati con una procedura di purificazione ed è stata eseguita una selezione in base alle dimensioni (200-350 bp) di quelli legati su un gel di agarosio low-range al 2%. I campioni sono stati amplificati attraverso una PCR, al fine di selezionare i frammenti di DNA in libreria che portavano adattatori a entrambe le estremità.

I campioni sono stati sottoposti a sequenziamento "ultra-high throughput" (Ju *et al.*, 2006) usando l'Illumina Genome Analyzer IIX (GAIIx, Illumina Inc.). Sono state così ottenute 1-4 milioni di sequenze per colonia (lunghezza 75 o 100 bp), per un totale di 100-400 milioni di bp sequenziate per ogni colonia.

Le sequenze ottenute da ogni colonia sono state filtrate usando "Amel 4.0 bee genome reference sequence", "bee ribosomal RNA genes" e "Honey Bee Official Gene Set" (BeeBase, <http://genomes.arc.georgetown.edu/drupal/beebase/>).

Le restanti sequenze sono state assemblate *de novo* utilizzando CLC Genomics Workbench (CLCBio, Denmark). I contigui di dimensione maggiore a 200 bp sono stati filtrati per la seconda volta rispetto alle sequenze di riferimento dell'ape e i contigui non allineati sono stati comparati con le sequenze non ridondanti presenti nel database NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizzando BLASTN (nucleotide homology) e BLASTX (protein homology). Per analizzare i risultati sono state impiegate applicazioni autoprodotte in Perl.

### 2.3.3. Analisi PCR dei virus delle api

L'RNA totale di ciascun campione di api è stato estratto utilizzando il kit Trizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice. La concentrazione e la purezza dell'RNA totale sono state determinate mediante analisi spettrofotometrica (Nanodrop ND100, Thermo Scientific Inc.).

La presenza di virus è stata valutata mediante una RT-PCR qualitativa (Chen *et al.*, 2006a), utilizzando le coppie di primer riportate nella tabella 3. Le analisi sono state effettuate a cadenza mensile su campioni di 5 api provenienti da ciascun alveare sperimentale.

La quantificazione delle copie genomiche di DWV presenti nelle api è stata eseguita mediante SYBR Green Quantitative Real-Time RT-PCR, utilizzando la coppia di primer riportata nella tabella 3. La miscela e il profilo termico di reazione erano gli stessi impiegati per la RT-PCR qualitativa, utilizzando il kit diagnostico QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit (Quiagen, Hilden, Germany). Il titolo di DWV è stato ottenuto confrontando il valore  $C_T$  dei campioni sconosciuti con quello di una curva standard assoluta, ottenuta secondo il metodo proposto da Boncristiani *et al.* (2009). Le curve standard sono state determinate mediante diluizioni seriali di una soluzione di partenza, che presentava 155 ng di DNA plasmidico contenente l'insero di DWV.

L'efficienza della PCR ( $E=105,2\%$ ) è stata calcolata sulla base della pendenza e del coefficiente di correlazione ( $R^2$ ) della curva standard, utilizzando la seguente formula:  $E=10^{(-1/\text{slope})}-1$  (Slope=-3,203, Y-intercept=18,97,  $R^2=0,961$ ).

In questo caso, in Settembre sono state analizzate 6 e 13 api, mentre in Ottobre sono state analizzate 14 e 11 api provenienti rispettivamente dalle CPI e dalle CMI.

Tabella 3 – Coppie di primer usate per le analisi Conventional RT-PCR e Quantitative Real-Time RT-PCR.

Target	Forward and reverse primer sequences (5'-3') <sup>a</sup>	Expected product size (bp)
<i>Conventional RT-PCR</i>		
ABPV, AF150629	(F) TTATGTGTCCAGAGACTGTATCCA (R) GCTCCTATTGCTCGGTTTTTCGGT	900
BQCV, NC003784	(F) TGGTCAGCTCCCACTACCTTAAAC (R) GCAACAAGAAGAAACGTAAACCAC	700
CBPV, NC010711	(F) AGTTGTCATGGTTAACAGGATACGAG (R) TCTAATCTTAGCACGAAAGCCGAG	455
DWV, NC004830	(F) ATCAGCGCTTAGTGGAGGAA (R) TCGACAATTTTCGGACATCA	702
IAPV, NC009025	(F) GCGGAGAATATAAGGCTCAG (R) TTGCAAGATAAGAAAGGGGG	586
KBV, NC004807	(F) GATGAACGTCGACCTATTGA (R) TGTGGGTTGGCTATGAGTCA	415
SBV, NC002066	(F) GCTGAGGTAGGATCTTTGCGT (R) TCATCATCTTCACCATCCGA	824
<i>Quantitative Real-Time RT-PCR</i>		
DWV	(F) GCGCTTAGTGGAGGAAATGAA (R) GCACCTACGCGATGTAAATCTG	69

<sup>a</sup> F, forward - R, reverse

## ***2.4. Cause remote del collasso***

### *2.4.1. Api e acari usati nelle prove di laboratorio*

Il materiale biologico utilizzato per le prove di laboratorio (larve di api e femmine adulte di *V. destructor*) è stato prelevato dall'apiario sperimentale del Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali dell'Università di Udine, situato alla periferia Nord della città. Anche in questo caso, la popolazione di api locali era costituita da ibridi naturali di *A. m. ligustica* Spinola e *A. m. carnica* Pollman. Nell'apiario sperimentale, il trattamento estivo contro la varroa è stato condotto in presenza di covata con acaricidi a base di timolo (ApiLife Var<sup>®</sup>) ed è stato seguito da uno o più trattamenti con acido ossalico spruzzato direttamente sui favi in assenza di covata.

Le larve di api e le varroe utilizzate nei saggi biologici sono state ottenute da cellette opercolate nelle 15 ore precedenti l'inizio di ciascuna prova, in seguito indicate come 0-15 h PO (post opercolatura). Per ottenere larve di età nota, le cellette opercolate di un favo, contenente covata prossima all'opercolatura, sono state contrassegnate con correttore per dattilografia la sera precedente al giorno della prova. A distanza di 15 ore, i favi sono stati prelevati e trasferiti in laboratorio dove, con una pinzetta a punte fini, sono state disopercolate solo le cellette non contrassegnate e quindi opercolate durante la notte. Il favo disopercolato è stato introdotto in una cella termostatica a 34 °C e 75% di U.R., in posizione verticale e in assenza di luce. In queste condizioni, le larve tendono a fuoriuscire naturalmente dalle cellette, per cadere con la varroa ai piedi del favo, dove vengono raccolte su un foglio di carta assorbente.

### *2.4.2. Effetto dell'infestazione sulla replicazione virale*

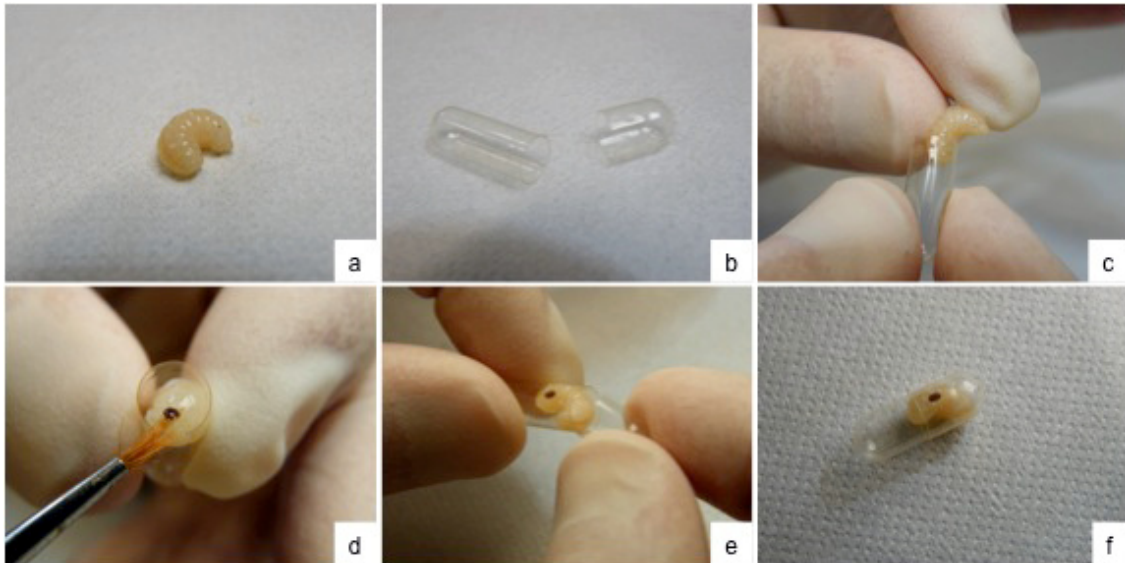
Questo esperimento è stato progettato per verificare l'effetto dell'attività trofica della varroa sulla replicazione di DWV nelle api. Le larve e le varroe impiegate in questa prova sono state ottenute seguendo la metodologia già descritta (§ 2.4.1.).

Ciascuna larva è stata inserita in capsule di gelatina (Agar Scientific Ltd.; diametro 6,5 mm, lunghezza 19 mm) e infestata artificialmente con 1 varroa (L+1V) o con 3 varroe (L+3V) (figura 4). Altre larve senza varroa (L) sono state poste nelle capsule di gelatina come controllo. Il materiale così preparato è stato trasferito in una

camera termostata (34 °C, 75% U.R., al buio) per 12 giorni, fino allo sfarfallamento delle api (Nazzi e Milani, 1994).

A distanza di 1, 6 e 12 giorni sono state prelevate 3 api per ciascun livello di infestazione, al fine di determinare il numero totale di copie genomiche di DWV attraverso l'analisi Quantitative Real-Time RT-PCR (§ 2.3.3.).

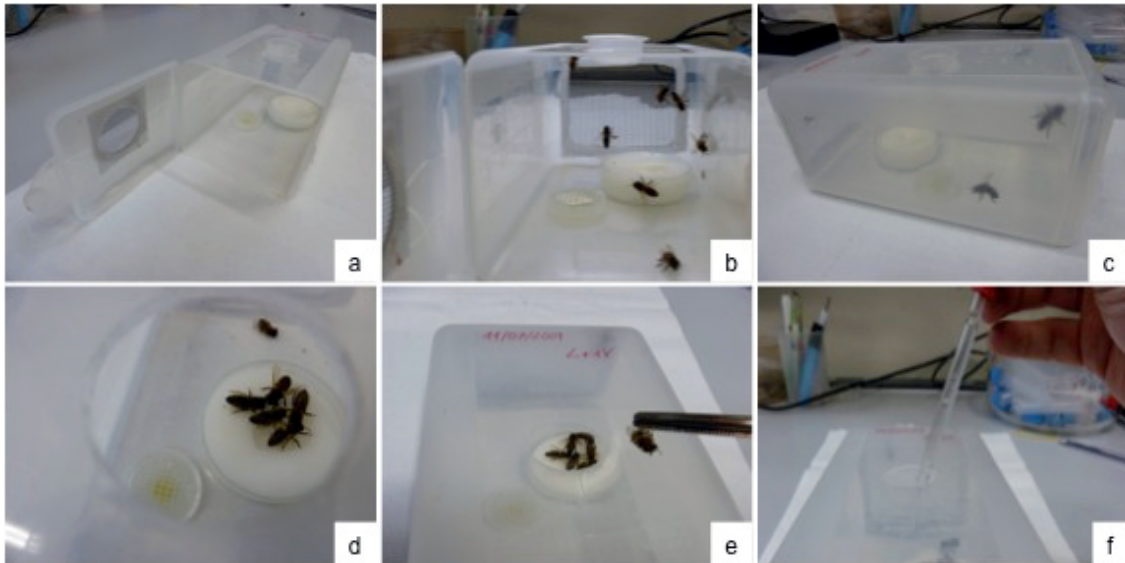
Figura 4 – Sequenza di immagini relative all'infestazione artificiale con una varroa di una larva d'ape 0-15 h PO in capsula di gelatina.



#### 2.4.3. Allevamento delle api in laboratorio

Allo sfarfallamento, quando le api adulte sono completamente sviluppate, le capsule di gelatina delle diverse tesi sono state aperte e le api sono state trasferite in gabbiette di plastica (185x105x85 mm) per essere allevate in condizioni di laboratorio. Le gabbiette avevano una porticina che ne consentiva l'apertura frontale e un foro superiore, opportunamente tappato (30 mm Ø), per agevolare le operazioni di alimentazione e pulizia. Nella parte anteriore e posteriore delle gabbiette era presente una finestra (40x40 mm) chiusa con rete in nylon (maglia di 2 mm Ø) per permetterne l'aerazione. Le gabbiette sono state mantenute in cella termostatica (34 °C, 75% U.R., al buio) e le api sono state alimentate con acqua e zucchero candito (Apifonda®) *ad libitum* per tutta la durata dell'esperimento. Durante le prove sono state quotidianamente contate e rimosse le api morte, di cui è stata registrata l'eventuale deformità delle ali (figura 5).

Figura 5 – Sequenza di immagini relative all'allevamento di api adulte in condizioni di laboratorio. Le api sono state mantenute in gabbiette di plastica (a,b,c) con acqua e zucchero candito (d); quotidianamente è stata effettuata la pulizia (e) ed è stata rinnovata l'acqua (f).



#### 2.4.4. Effetto dell'infezione virale sulla sopravvivenza delle api

Questo esperimento è stato progettato per verificare la longevità delle api adulte, ottenute da larve trattate con un'iniezione di lisato contenente un differente numero di copie genomiche di DWV.

Per infettare artificialmente con DWV larve 0-15 h PO, ottenute come descritto in precedenza (§ 2.4.1.), sono stati iniettati, con una siringa Hamilton (diametro dell'ago 0,3 mm), 2 µl di un lisato di api sintomatiche a due diverse diluizioni. Allo stesso modo, sono stati iniettati 2 µl di un lisato di api asintomatiche come controllo (figura 6).

Il lisato è stato preparato utilizzando cinque api con ali deformi (Deformed Wings – DW), prelevate da un alveare fortemente infestato da *V. destructor*. Le api sono state collocate in un mortaio e, dopo essere state congelate con azoto liquido, sono state schiacciate con un pestello. Una volta polverizzate, le api sono state sospese in 5 ml di PBS (Phosphate Buffered Saline) a pH 7,4. Il PBS è stato ottenuto solubilizzando in un litro di acqua deionizzata i seguenti composti: 8 g di cloruro di sodio (NaCl), 0,2 g di diidrogeno fosfato di potassio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 2,9 g di idrogenofosfato di disodio dodecaidrato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O) e 0,2 g di cloruro di potassio (KCl); il PBS è stato autoclavato alla temperatura di 121 °C per 20 minuti ed è stato conservato a temperatura ambiente.

Il lisato ottenuto è stato centrifugato a 3000 rpm per 30 minuti alla temperatura di 4 °C. Il surnatante è stato trasferito in Eppendorf autoclavate, che sono state conservate a -20 °C fino al loro utilizzo (Iqbal e Mueller, 2007).

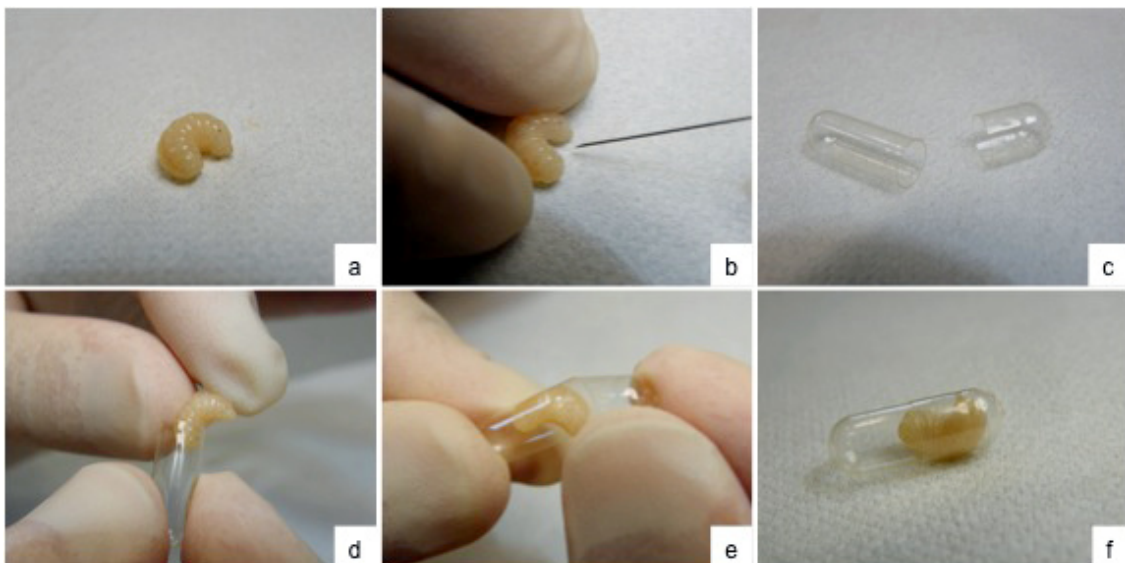
Il numero di copie virali presenti nel lisato è stato valutato attraverso un'analisi Quantitative Real-Time RT-PCR come descritto in precedenza (§ 2.3.3.). Le diluizioni in PBS ( $10^{-3}$  e  $10^{-5}$ ) utilizzate per le iniezioni hanno permesso di inoculare nelle larve trattate, in seguito indicate come DW<sub>1000</sub> e DW<sub>100000</sub>, un numero di copie virali stimato rispettivamente in  $1,6 \times 10^3$  e 16,6.

Il lisato di cinque api con ali sane (Normal Wings – NW), ovvero api che non manifestavano i sintomi di DWV, è stato preparato seguendo la procedura appena descritta. La diluizione in PBS ( $10^{-3}$ ) di questo lisato è stata utilizzata per le iniezioni delle larve della tesi controllo, in seguito indicate come NW<sub>1000</sub>; l'analisi Quantitative Real-Time RT-PCR (§ 2.3.3.) eseguita sul lisato di ape sana ha rivelato l'assenza di copie genomiche del virus.

Dopo l'iniezione, le larve sono state collocate in capsule di gelatina (figura 6) e mantenute in cella termostatica per 12 giorni (§ 2.4.2.). Allo sfarfallamento, le api sono state liberate dalle capsule di gelatina, collocate in gabbiette di plastica e allevate in condizioni controllate fino al termine della prova (§ 2.4.3.).

L'esperimento è stato replicato 3 volte, utilizzando nel complesso 43 api NW<sub>1000</sub>, 28 api DW<sub>1000</sub> e 21 api DW<sub>100000</sub>.

Figura 6 – Sequenza di immagini relative all'infezione artificiale di una larva d'ape 0-15 h PO, mediante diluizioni di lisato di api sintomatiche (DW<sub>1000</sub> e DW<sub>100000</sub>) o asintomatiche (NW<sub>1000</sub>).



### 2.4.5. RNA-seq

Lo stesso RNA totale utilizzato per le analisi metagenomiche è stato impiegato per l'analisi dell'espressione genica. È stato usato l'mRNA sample prep kit di Illumina per produrre sequenze aventi 36 bp di lunghezza, in numero di circa 25-30 milioni per campione. Per calcolare il livello di espressione dei geni, sulla base dell'approccio proposto da Mortazavi *et al.* (2008), è stato usato il software CLC-Bio Genomics Workbench (CLC Bio, Denmark). I valori di espressione genica sono stati riportati in Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads (RPKM), con la rispettiva deviazione standard. Per rappresentare eventuali espressioni differenziali è stato calcolato il "fold change", ovvero il rapporto fra il valore medio di espressione del gene nelle api delle CMI e il suo valore medio rilevato nelle api delle CPI; i valori inferiori a 1 indicano una significativa sotto-espressione del livello di trascrizione del gene nelle CMI, mentre i valori superiori a 1 manifestano la sua sovra-espressione.

Il differente livello di espressione dei 3 geni più sotto-espressi e più sovra-espressi è stato confermato per mezzo di una Quantitative Real-Time RT-PCR, utilizzando le coppie di primer riportate in tabella 4.

Tabella 4 – Coppie di primer usate nelle analisi Quantitative Real-Time RT-PCR per la validazione dei risultati dell'analisi RNA-seq.

Target	Forward and reverse primer sequences (5'-3') <sup>a</sup>	Expected product size (bp)
dorsal-1A Toll/TLR	(F) TCGGATGGTGTCTACGAGCGA (R) AGCATGCTTCTCAGCTTCTGCCT	153
cSP33 ser proteases	(F) CGTCGGTGGTAAAGCGGCGA (R) AACGGCGACCAACGTTGCCA	175
SPH51 ser proteases	(F) TGGCAATTGTCTTTGCGGGCG (R) TACTTCCGCCGCCGTTACGC	196
Eater like EGE Family	(F) GGCGAGTGCACCGGCTTGAA (R) GCGCCATCGCGTCATAGCCA	169
NimC2Phagocytosis	(F) GCGTGGAGGACGGGAAACCG (R) ACATCGATGGCAGAGCGGCG	185
PGRP-S2	(F) GGCCACACACCAAATGCAGCAG (R) CGAGGACCAGTGTGGCCATGT	177

<sup>a</sup> F, forward - R, reverse



#### 2.4.6. Effetto dell'infestazione sull'espressione di dorsal-1A

Questo esperimento è stato progettato per verificare l'effetto dell'attività trofica della varroa sul livello di espressione di *dorsal-1A* in pupe d'ape DWV-esenti.

Per far ciò, sono state infestate artificialmente larve 0-15 h PO con nessuna o una varroa (§ 2.4.2.). Per aumentare le possibilità di campionare api senza virus, l'esperimento è stato condotto in primavera, quando la prevalenza di DWV negli alveari è bassa (Martin *et al.*, 1998). Allo sfarfallamento, solo i campioni risultati virus-esenti, in seguito a un'analisi RT-PCR qualitativa (§ 2.3.3.), sono stati processati con un'analisi Quantitative Real-Time RT-PCR, volta a stabilire il livello di espressione di *dorsal-1A*.

In totale, sono state analizzate 6 api per ciascuna tesi.

#### 2.4.7. RNAi

L'RNA interference (RNAi) è un meccanismo mediante il quale frammenti di RNA a doppio filamento interferiscono con l'espressione di un gene. Nel caso specifico, l'esperimento è stato progettato per verificare l'effettivo coinvolgimento di *dorsal-1A* nella risposta antivirale dell'ape.

Il doppio filamento di *dorsal-1A* dell'ape (*A. mellifera* Dorsal variant A, mRNA, GI:58585243, 2389 bp) è stato preparato utilizzando il MEGAscript RNAi kit (Ambion), seguendo le istruzioni contenute nel protocollo standard fornito dalla ditta produttrice.

La sequenza target è stata amplificata mediante PCR con primer specifici, che portavano in posizione 5' il promotore T7 ed è stata utilizzata come modello per la trascrizione *T7-dipendente in-vitro*.

I primers impiegati erano:

F-5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACAATCCAGCACTTATTC-3';

R-5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGCCTGAATAGTGTTATTAGC-3'.

Il prodotto di reazione è stato sottoposto a digestione mediante DNase e purificato; il prodotto finale è stato risospeso in acqua nuclease-free.

Le api utilizzate per la prova sono state ottenute da telai con covata sfarfallante, prelevati dagli alveari e conservati per una notte in cella termostatica a 34 °C e 90% di U.R.. Il giorno seguente, le api appena sfarfallate sono state trasferite in gruppi di trenta

individui all'interno di gabbiette sterili, come proposto da Evans *et al.* (2009). Le api trattate sono state alimentate quotidianamente con 2 ml di una soluzione saccarosio/proteine al 50%, che conteneva 50 µg di dsRNA di *dorsal-1A*; le api controllo sono state nutrite con una soluzione analoga alla precedente, contenente 50 µg di dsRNA di mGFP6 (Green Fluorescent Protein).

All'inizio dell'esperimento sono state prelevate 5 api per tesi, impiegate per saggiare il livello di partenza dei parametri registrati in seguito; lo stesso è stato fatto dopo 48 e 96 ore dall'esposizione alla soluzione nutritiva contenente il dsRNA. I campioni sono stati conservati a -80 °C fino all'analisi quando, in seguito all'estrazione dell'RNA, processato attraverso una SYBR Green Quantitative Real-Time RT-PCR, è stato possibile verificare il livello di trascrizione di *dorsal-1A* e il numero di copie di DWV presenti.

## ***2.5. Ulteriori cause di mortalità delle api***

### *2.5.1. Effetto dell'infestazione sulla sopravvivenza delle api*

Per verificare l'effetto dell'infestazione sulla sopravvivenza delle api, un certo numero di larve 0-15 h PO sono state infestate artificialmente con nessuna, 1 o 3 varroe (§ 2.4.2.). Allo sfarfallamento, le api sono state ripulite dalla varroa e dall'eventuale progenie, trasferite in gabbiette di plastica e allevate in condizioni controllate (§ 2.4.3.). Ogni giorno sono state contate e rimosse le api morte, di cui è stata registrata l'eventuale deformità delle ali.

L'esperimento è stato replicato 6 volte, utilizzando nel complesso 77 api per la tesi L, 68 api per la tesi L+1V e 55 api per la tesi L+3V.

### *2.5.2. Influenza del peso allo sfarfallamento sulla longevità delle api*

Per verificare un'eventuale influenza del peso sulla longevità delle api adulte, un certo numero di larve 0-15 h PO sono state infestate artificialmente con nessuna, 1 o 3 varroe (§ 2.4.2.).

Dopo 12 giorni, le capsule delle diverse tesi sono state aperte e le api sono state ripulite dal parassita e dalla sua eventuale progenie. Le api sono state quindi pesate con una bilancia elettronica di precisione (Sartorius CP2P, capacità di carico massima 2000 mg, lettura 0,001/0,002/0,005 mg) e marcate utilizzando un kit marca-regine, costituito da bollini colorati e numerati (2 mm Ø) da applicare, con una colla a base di resina naturale, sulla parte dorsale del torace delle api. In questo modo è stato attribuito un numero a ogni ape pesata allo sfarfallamento, per la quale è stato possibile stabilire esattamente la durata della vita. Le api così marcate sono state trasferite in gabbiette di plastica con acqua e zucchero candito *ad libitum* e mantenute in cella termostatica (34 °C, 75% U.R., al buio) fino al termine della prova (§ 2.4.3.). Durante i controlli quotidiani, sono state rimosse le api morte ed è stata annotata l'eventuale deformità delle ali.

L'esperimento è stato replicato 3 volte utilizzando nel complesso 35 api per la tesi L, 28 api per la tesi L+1V e 22 api per la tesi L+3V.

### *2.5.3. Determinazione del contenuto idrico delle api*

L'esperimento è stato progettato per determinare il contenuto idrico e il peso secco delle api allo sfarfallamento.

Dopo 12 giorni dall'infestazione artificiale di larve 0-15 h PO con nessuna o una varroa (§ 2.4.2.), le capsule di gelatina sono state aperte ed è stato allontanato dalle api il parassita e l'eventuale progenie. Le api sono state pesate con una bilancia elettronica di precisione (§ 2.5.2.), collocate in una capsula Petri e trasferite in stufa a 80 °C per 24 ore. In seguito, dopo aver trascorso 30 minuti a temperatura ambiente, sono state pesate le api ormai disidratate.

L'esperimento è stato replicato 4 volte, utilizzando nel complesso 50 api per la tesi L e 51 api per la tesi L+1V.

### *2.5.4. Dinamica della perdita di peso nell'ape: dallo stadio di pupa a quello di adulto*

Un certo numero di larve 0-15 h PO non infestate o infestate artificialmente con una varroa sono state trasferite in capsule di gelatina e mantenute in condizioni controllate (34 °C, 75% U.R., al buio) per 12 giorni (§ 2.4.2.). Le capsule così preparate sono state pesate due volte al giorno (a metà mattina e a metà pomeriggio), fino a quando le api non avessero completato lo sviluppo e raggiunto lo stadio di adulto. Il peso è stato rilevato utilizzando una bilancia elettronica di precisione (§ 2.5.2.), che è stata collocata direttamente all'interno della camera termostata. Dalle pesate sono stati eliminati gli individui morti o quelli con sviluppo ritardato rispetto alla norma.

Per questo esperimento sono state utilizzate 21 larve non infestate (L) e 21 larve infestate con una varroa (L+1V); di queste, 14 L e 6 L+1V erano asintomatiche e hanno fornito dati utili.

### *2.5.5. Estrazione dei lipidi totali*

Dopo essere stata disidratata e pesata (§ 2.5.3.), ogni ape è stata inserita in una provetta assieme a 1 ml di etere (Sigma-Aldrich®), per essere estratta un'ora in un bagno a ultrasuoni. Successivamente, i campioni sono stati asciugati in stufa a 80 °C per 15 minuti, mantenuti a temperatura ambiente per 30 minuti e infine pesati. La quantità di lipidi totali presenti sull'ape è stata calcolata come differenza fra il peso dei campioni prima e dopo l'estrazione.

L'esperimento è stato replicato 3 volte utilizzando nel complesso 30 api per ciascuna tesi.

### *2.5.6. Estrazione degli idrocarburi cuticolari delle api e analisi GC-MS*

Al fine di valutare l'effetto dell'infestazione sul tipo e sulla quantità di idrocarburi cuticolari presenti sulle api adulte, sono stati preparati e analizzati con tecniche di gas-cromatografia abbinata alla spettrometria di massa (GC-MS) estratti di api neo-sfarfallate.

Le api sono state ottenute da larve 0-15 h PO non infestate o infestate artificialmente con 1 o 3 varroe, che sono state allevate in capsule di gelatina per 12 giorni (§ 2.4.2.).

Ogni estratto è stato preparato introducendo, in una provetta conica di vetro, un'ape assieme a 1 ml di esano (Sigma-Aldrich®) e 100 ng di 1-octadecene (Sigma-Aldrich®) come standard interno. Dopo 15 minuti, l'estratto è stato trasferito in una nuova provetta conica di vetro e ridotto sotto flusso di azoto fino a 10 µl. Utilizzando una siringa Hamilton, 1 µl di estratto (corrispondente a 0,1 ape equivalente) è stato prelevato e iniettato nel gascromatografo per l'analisi.

L'analisi degli estratti cuticolari della api è stata condotta utilizzando un gas cromatografo Varian 3400 abbinato a uno spettrometro di massa Varian Saturn 2000. In fase di analisi, la colonna (CP-SIL 8, 30 m x 0,25 mm ID, film thickness: 0,25 µm) è stata mantenuta alla temperatura di 50 °C per un minuto quindi, con un incremento di 10 °C/minuto, è stata portata a 320 °C. La temperatura dell'iniettore era di 250 °C. È stato utilizzato l'elio come gas di trasporto (flusso: 1 ml/minuto). Il volume di

campione analizzato era di 1  $\mu$ l e l'iniezione è stata effettuata in modalità splitless. L'energia di ionizzazione dello spettrometro di massa era 70 eV.

L'identificazione degli idrocarburi cuticolari è stata eseguita comparando gli spettri e il tempo di ritenzione ottenuti da ciascuna analisi con quelli di una miscela standard di idrocarburi alifatici (da C8 a C32) in esano (Sigma-Aldrich®) analizzata in precedenza. L'analisi quantitativa dei composti identificati è stata condotta utilizzando il metodo dello standard interno (1-octadecene).

Nel complesso sono state estratte 5 api per tesi e ciascun estratto è stato analizzato 3 o 4 volte.

### *2.5.7. Effetto dell'umidità sulla sopravvivenza delle api*

Un certo numero di larve 0-15 h PO non infestate o infestate artificialmente con una varroa sono state inserite in capsule di gelatina e mantenute in condizioni controllate per 12 giorni (§ 2.4.2.). Allo sfarfallamento, le api adulte sono state ripulite dalla varroa e dall'eventuale progenie.

Gli individui delle due tesi sono stati trasferiti nelle rispettive gabbiette di plastica, che sono state mantenute al buio a 34 °C, ma con due diversi regimi di umidità relativa: 60% e 75%. Le api sono state alimentate con zucchero candito (Apifonda®) e acqua *ad libitum*. Le gabbiette sono state ispezionate quotidianamente per contare e allontanare le eventuali api morte.

L'esperimento è stato replicato 3 volte, utilizzando nel complesso: 40 api non infestate (L) e 37 api infestate (L+1V) mantenute a 60% di U.R.; 42 api non infestate (L) e 33 api infestate (L+1V) mantenute a 75% di U.R..

## 2.6. *Analisi statistica*

Il numero di alveari e api usate in tutte le analisi di cui si riferisce in questo paragrafo sono riportati in tabella 2.

Il confronto fra le colonie poco infestate (CPI) e le colonie molto infestate (CMI), per quanto riguarda la popolazione di api, la mortalità delle api, l'infestazione da parte della varroa e il valore di espressione dei geni risultante dall'RNA-seq, è stato eseguito utilizzando il test non parametrico Mann-Whitney. In tutti i casi, il numero di replicazioni per ciascun gruppo corrispondeva al numero di colonie, che era pari a 6 per l'apiario trattato con i prodotti acaricidi (CPI) e 5 per l'apiario non trattato (CMI).

La proporzione di api infestate da DWV rispetto al totale delle api analizzate nelle colonie poco e molto infestate è stata comparata utilizzando il test della soluzione esatta di Fisher.

Il numero di copie genomiche di DWV presenti nelle singole api provenienti da colonie poco e molto infestate è stato confrontato con il test non parametrico Mann-Whitney.

I dati ottenuti dall'esperimento relativo all'effetto dell'attività trofica della varroa sulla replicazione del virus nelle larve di api sono stati analizzati utilizzando l'estensione di Scheirer-Ray-Hare del test di Kruskal-Wallis.

Il confronto fra i tassi di sopravvivenza delle api iniettate con i lisati di api sane o infette è stato eseguito con il logrank test senza correzione per la continuità, utilizzando il software WinPepi versione 9.4 (Abramson, 2004).

I dati relativi all'espressione di *dorsal-1A* nelle api virus-essenti infestate con nessuna e una varroa sono stati comparati con il test non parametrico Mann-Whitney.

Negli esperimenti relativi all'RNAi, l'espressione dei geni e la replicazione virale in api alimentate con dsRNA di *dorsal-1A* e con dsRNA di Green Fluorescent Protein come controllo sono stati confrontati utilizzando l'estensione di Scheirer-Ray-Hare del test di Kruskal-Wallis.

La percentuale di api con ali deformi, così come la mortalità delle api infestate con nessuna, 1 o 3 varroe è stata confrontata utilizzando la procedura di Marascuilo, eseguita mediante l'ausilio di un programma di analisi statistica reperito on-line ([www.stattools.net](http://www.stattools.net), consultato il 15/10/2011).

Il confronto relativo alla sopravvivenza delle api, al peso delle api allo sfarfallamento e alla percentuale di acqua nelle api infestate con nessuna, 1 o 3 varroe è

stato effettuato mediante General Linear Model, impiegando il programma Minitab 16 Statistical Software (2010).

L'analisi statistica della regressione lineare riguardante la relazione peso-longevità nelle api infestate e non è stata svolta utilizzando il software StatPlus:mac (2009).

Il confronto fra la quantità di idrocarburi saturi a catena corta in api infestate con nessuna, 1 o 3 varroe è stato effettuato mediante il test del t di Student.

Il confronto della mortalità di api esposte a diversi livelli di infestazione e diversi regimi di umidità è stato condotto con il test del Chi-quadro.



### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### *3.1. Etiologia e sintomatologia del collasso (cause prossime del collasso)*

##### *3.1.1. Dinamica di popolazione negli alveari*

Inizialmente è stata osservata la dinamica di popolazione delle colonie presenti nei due apiari (CPI e CMI). In particolare, è stata confrontata la forza delle famiglie nei due gruppi di alveari, ovvero è stata calcolata, nei diversi intervalli di tempo, la media del numero di api presenti negli alveari di ciascun apiario (§ 2.3.1.).

Dopo il picco di Giugno, si osserva che la forza delle famiglie tende a diminuire, seguendo un andamento apparentemente analogo in entrambi gli apiari (grafico 1). Tale andamento non sorprende particolarmente, in quanto il calo di popolazione che si osserva da Luglio in poi è in parte dovuto a una minore disponibilità di risorse nettariifere e pollinifere, che si registra normalmente in questo periodo nelle regioni a clima temperato, con conseguente riduzione dell'allevamento di giovani api nella colonia.

Dal grafico 1, si desume pure che i due gruppi di alveari non erano identici quanto a popolazione iniziale di api; tuttavia, se si considera il rapporto fra la forza delle famiglie negli alveari poco infestati e molto infestati, si osserva che questo non cambia nel corso della stagione, per poi raddoppiare a Ottobre, quando il declino delle CMI è più pronunciato.

In effetti, il collasso delle colonie molto infestate si è verificato in Ottobre, quando è stata registrata una riduzione significativa della popolazione di api nello stesso gruppo di alveari ( $U=0$ ,  $n_1=6$ ,  $n_2=5$ :  $P<0,01$ ; grafico 2). In questo periodo, infatti, tre colonie molto infestate sono ormai collassate, mentre le restanti due hanno una popolazione di api insufficiente a superare l'inverno. Viceversa, a fine stagione gli alveari trattati contro la varroa hanno in media 10000 api, un numero adeguato a superare l'inverno e riprendere l'attività nella stagione successiva.

Grafico 1 – Dinamica di popolazione delle colonie poco infestate (CPI) e delle colonie molto infestate (CMI). Sull'asse secondario è riportato il rapporto fra la popolazione media delle CPI e delle CMI.

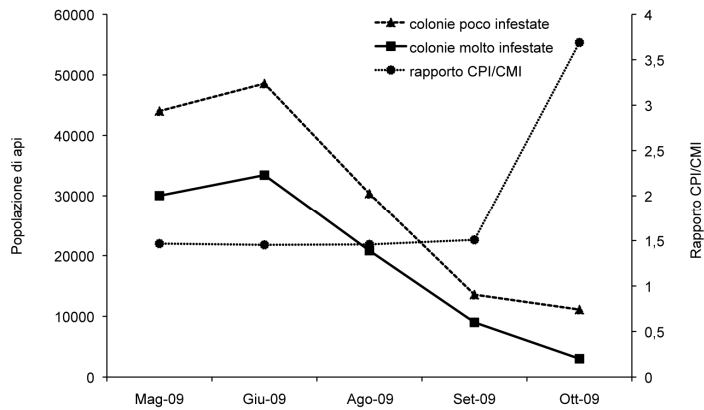
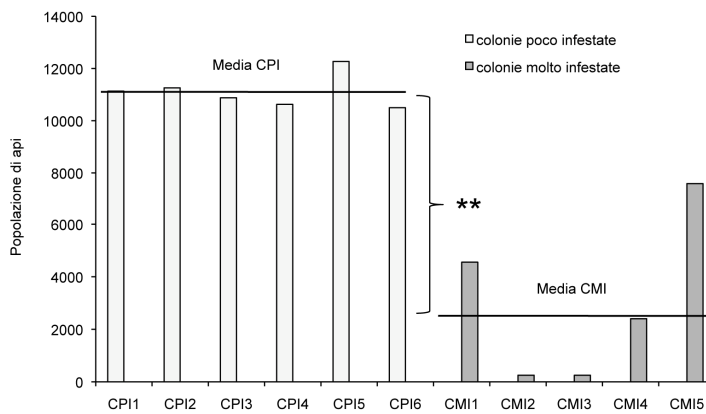


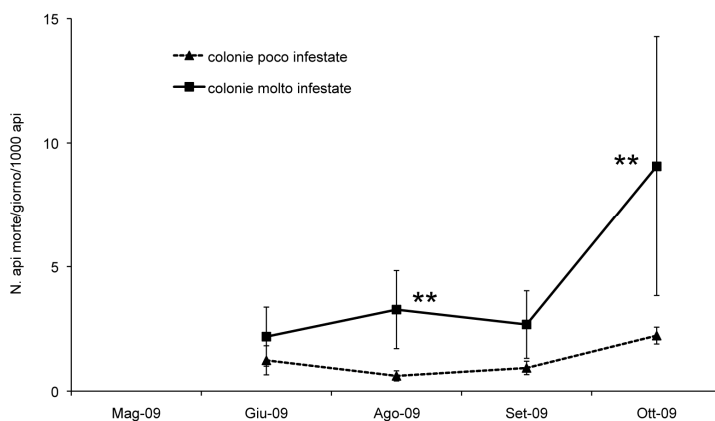
Grafico 2 – Numero di api stimato per ciascun alveare a Ottobre, quando è stato registrato un improvviso calo della popolazione nelle CMI. La differenza significativa nel numero medio di api nei due apiari è stata segnalata con gli asterischi (\*\*  $P \leq 0,01$ ).



### 3.1.2. Mortalità delle api

I dati risultanti dalla conta settimanale degli individui morti, rinvenuti nelle gabbie underbasket (§ 2.3.1.), rivelano che la drastica riduzione del numero di api registrata a fine stagione nelle colonie molto infestate è dovuta, almeno in parte, a un incremento significativo della mortalità delle api registrata nello stesso periodo ( $U=0$ ,  $n_1=6$ ,  $n_2=5$ :  $P=<0,01$ ; grafico 3).

Grafico 3 – Mortalità delle api nel corso della stagione. Le barre di errore indicano la deviazione standard; le differenze significative nei valori medi di mortalità, registrati nei diversi intervalli di tempo, sono state segnalate con gli asterischi (\*\*  $P\leq 0,01$ ).



### 3.1.3. Infestazione delle colonie

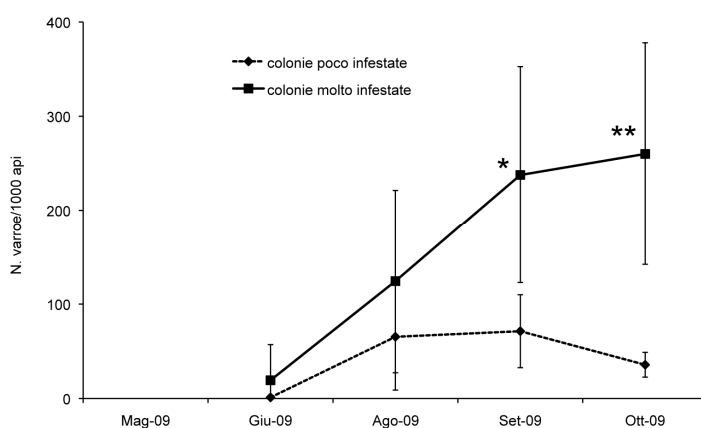
L'infestazione totale delle colonie poco infestate (CPI) e molto infestate (CMI) è stata ottenuta dal rapporto fra il numero di varroe presenti sulle api adulte e sulla covata e il numero totale di api presenti negli alveari in un dato periodo (§ 2.3.1.).

L'infestazione totale delle CPI aumenta da Giugno ad Agosto quando, in seguito all'inizio dei trattamenti acaricidi contro la varroa, tende a stabilizzarsi per poi decrescere fra Settembre e Ottobre (grafico 4). Pertanto, i trattamenti impiegati si sono dimostrati efficaci nel contenere la popolazione di *V. destructor* a livelli tali da non provocare il collasso delle colonie a fine stagione o durante l'inverno (grafico 2).

L'infestazione totale delle colonie che non hanno subito alcun trattamento acaricida (CMI), invece, tende a crescere nel tempo, raggiungendo a Settembre e a Ottobre un livello significativamente più elevato rispetto agli alveari trattati contro la varroa (CPI) (grafico 4).

Alla luce di questo risultato, è possibile affermare che la mortalità delle api, registrata a fine stagione nelle CMI, è legata all'incremento dell'infestazione. Tuttavia, confrontando l'andamento della mortalità (grafico 3) con quello dell'infestazione (grafico 4) si nota che la prima aumenta improvvisamente fra Settembre e Ottobre, mentre la seconda aumenta in modo graduale, di modo che, fino a un certo punto, a valori di infestazione relativamente alti corrispondono valori di mortalità ancora accettabili. Ciò suggerisce che altri fattori, diversi da *V. destructor*, ma probabilmente legati a essa, possono essere coinvolti nella mortalità delle api registrata a fine estate.

Grafico 4 – Infestazione (numero di varroe/1000 api) delle CPI e delle CMI nel tempo. Le barre di errore indicano la deviazione standard; le differenze significative di infestazione, registrate nei diversi intervalli di tempo, sono state segnalate con gli asterischi (\* $P \leq 0,05$ ; \*\* $P \leq 0,01$ ).



### 3.1.4. Analisi metagenomica

Al fine di verificare la presenza di ulteriori fattori di mortalità, che possono interagire con la varroa per provocare il collasso delle colonie a fine stagione, è stata eseguita un'analisi metagenomica di api prelevate a Ottobre nelle colonie poco e molto infestate (§ 2.3.2.).

Attraverso questa procedura è stata rilevata, nella maggior parte degli alveari, la presenza di alcuni microrganismi simbiotici molto comuni, quali *Lactobacillus* sp., *Acetobacter* sp., *Bifidobacterium* sp., *Neisseria* sp., già descritti da Babendreier *et al.* (2007). Riguardo ai microrganismi patogeni, invece, non sono state riscontrate differenze qualitative fra i due gruppi di alveari (tabella 5).

In particolare, *N. ceranae*, già associato al collasso delle colonie in Spagna, è presente sia nelle CPI sia nelle CMI. Anche DWV è stato rilevato nelle colonie di entrambi i gruppi, lasciando intendere che la sola presenza di questi o di altri patogeni è comune negli alveari a fine stagione, ma non è sufficiente a determinarne il collasso.

Tabella 5 – Taxa più rappresentativi riscontrati negli alveari dei due apiari (CPI e CMI).

<b>Regno</b>	<b>Microrganismo</b>
Batteri	<i>Lactobacillus</i> sp.
	Uncultured bacterium
	<i>Acetobacter</i> sp.
	<i>Bifidobacterium</i> sp.
	<i>Neisseria</i> sp.
	<i>Erwinia</i> sp.
	Pasteurellaceae bacterium
	<i>Pediococcus</i> sp.
	Uncultured <i>Gluconacetobacter</i> sp.
	<i>Proteus</i> sp.
	<i>Enterococcus</i> sp.
	<i>Escherichia</i> sp.
	<i>Kingella</i> sp.
Funghi	<i>Nosema ceranae</i>
Virus	Deformed Wing Virus

### 3.1.5. Prevalenza dei virus nelle colonie

L'analisi metagenomica da sola, come già dimostrato in altri studi, non è stata in grado di sciogliere i dubbi relativi alla responsabilità di uno o più patogeni nel collasso delle colonie. Per tale motivo, al fine di indagare ulteriormente sui fattori coinvolti nella mortalità delle api, è stata eseguita un'analisi dettagliata, mediante tecniche molecolari, sui principali virus delle api (§ 2.3.3.) in campioni prelevati mensilmente dagli alveari sperimentali di entrambi gli apiari. Attraverso questa analisi è stata rilevata nelle colonie poco e molto infestate la sola presenza di BQCV, SBV e DWV.

La prevalenza di BQCV e SBV ha mostrato un andamento altalenante e nel complesso è diminuita nel corso della stagione in entrambe le tesi (grafico 5).

Di contro, fino ad Agosto la prevalenza di DWV ha seguito l'andamento dell'infestazione in entrambi gli apiari, mantenendosi comunque a livelli inferiori al 50% anche negli alveari maggiormente infestati; da Settembre, invece, la prevalenza di DWV ha approssciato il 100% in tutti gli alveari sperimentali (grafico 6). Risultati analoghi sono già stati riportati da Martin *et al.* (2010).

Grafico 5 – Prevalenza di Black Queen Cell Virus (BQCV) e di Sacbrood Virus (SBV) nel corso della stagione nei due apiari. Le barre di errore indicano la deviazione standard.

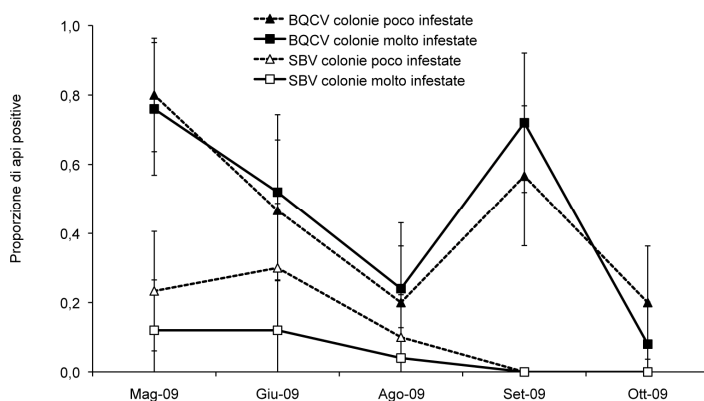
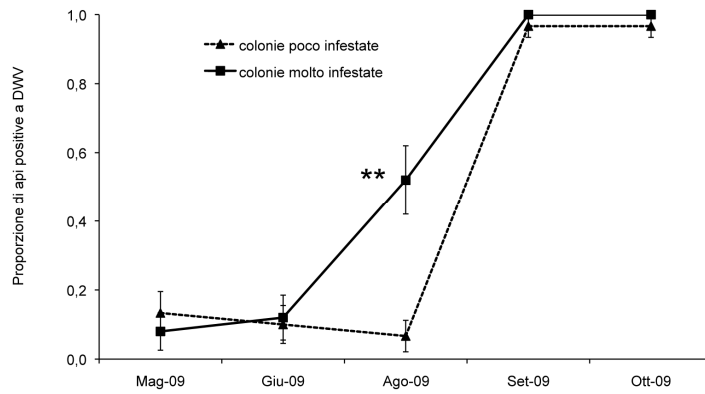


Grafico 6 – Prevalenza di Deformed Wing Virus (DWV) nel corso della stagione. Le barre di errore indicano la deviazione standard; la differenza significativa nella proporzione di api infette, registrata ad Agosto fra le due tesi, è stata segnalata con gli asterischi (\*\* $P \leq 0,01$ ).

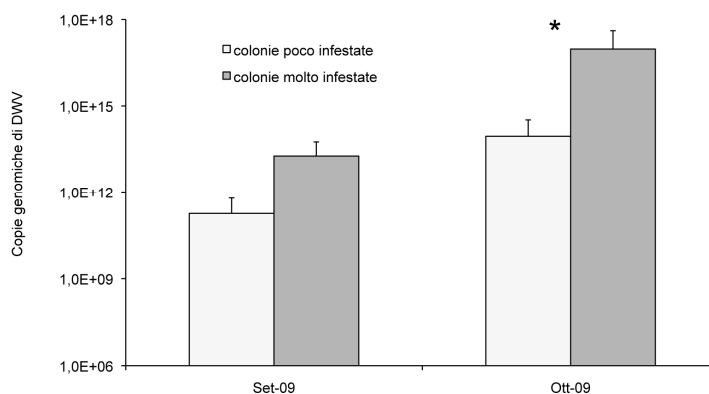


### 3.1.6. Quantificazione di DWV negli alveari sperimentali

Nemmeno gli studi riguardanti la prevalenza dei virus delle api (in particolare di DWV) sono stati sufficienti a evidenziare una differenza tale da giustificare la maggiore mortalità delle api nelle colonie molto infestate, che sono collassate a fine stagione, rispetto a quelle poco infestate, che invece sono sopravvissute.

Per comprendere tale fenomeno è stata quindi effettuata un'analisi di tipo quantitativo, mediante la tecnica Quantitative Real-Time RT-PCR (§ 2.3.3.), sui campioni di api raccolti in Settembre e in Ottobre negli alveari sperimentali. Ciò ha permesso di stimare il numero di copie genomiche di DWV nei campioni analizzati, che in Ottobre è risultato significativamente più basso nelle CPI rispetto alle CMI ( $U=46$ ,  $n_1=14$ ,  $n_2=11$ :  $P \leq 0,05$ ; grafico 7). L'elevata mortalità delle api, osservata a fine stagione nelle CMI (grafico 3), potrebbe pertanto essere associata alla loro maggiore carica virale registrata nello stesso periodo.

Grafico 7 – Numero di copie genomiche di DWV registrato nelle api campionate a Settembre e a Ottobre nelle CPI e nelle CMI. Le barre di errore indicano la deviazione standard; la differenza significativa registrata a Ottobre è stata segnalata con gli asterischi (\* $P \leq 0,05$ ).





## 3.2. Cause remote del collasso

### 3.2.1. Effetto dell'infestazione sulla replicazione virale

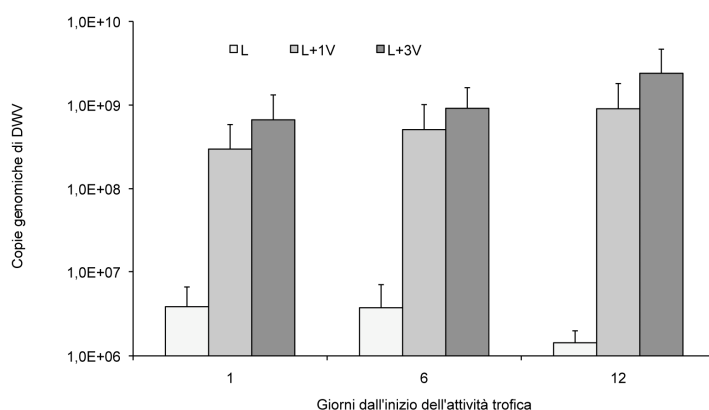
Per confermare quanto osservato in campo, sono stati condotti degli esperimenti di laboratorio volti a verificare la relazione esistente fra l'infestazione e la replicazione virale. In particolare, sono state infestate artificialmente delle larve d'ape con nessuna, 1 o 3 varroe (§ 2.4.2.).

A distanza di 1, 6 e 12 giorni dall'infestazione, è stato registrato, mediante un'analisi Quantitative Real-Time RT-PCR, un numero di copie genomiche di DWV significativamente più elevato nei campioni infestati dalla varroa ( $H=8,51$ ,  $gdl=2$ ;  $P<0,05$ ; grafico 8).

Il risultato di questo esperimento conferma che l'attività trofica della varroa è in grado di innescare la replicazione di DWV nelle api, spiegando come nelle colonie molto infestate in Ottobre si registri una carica virale significativamente più elevata rispetto alle colonie poco infestate.

Tuttavia, tale risultato da solo non è sufficiente a giustificare la maggiore mortalità delle api che si osserva a fine estate nelle colonie molto infestate, che presentano perciò un'elevata carica virale.

Grafico 8 – Numero di copie genomiche di DWV registrate nelle larve d'ape infestate artificialmente con nessuna, 1 o 3 varroe nei diversi intervalli di tempo (1, 6 e 12 giorni dall'infestazione). Le barre di errore indicano l'errore standard.

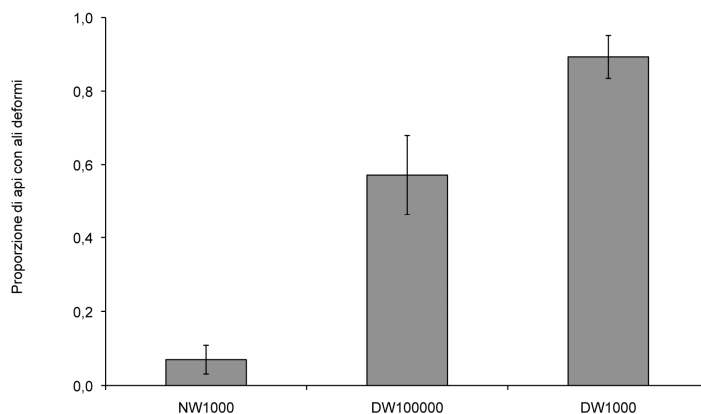


### 3.2.2. Effetto dell'infezione virale sulla sopravvivenza delle api

Al fine di confermare la relazione fra il livello di infezione virale e la sopravvivenza delle api, è stato eseguito un ulteriore esperimento di laboratorio in cui è stata valutata la longevità di api infettate artificialmente con dosi crescenti di virus (§ 2.4.4.).

La proporzione di api sfarfallate con ali deformi è significativamente più bassa negli individui trattati con il lisato di api sane (NW<sub>1000</sub>) rispetto a quelli trattati con il lisato di api virosate (Overall Chi Square=48,817, gdl=2:  $P<0,001$ ; grafico 9) e cresce all'aumentare del numero di copie virali iniettate (rispettivamente DW<sub>100000</sub> e DW<sub>1000</sub>). La relazione dose-risposta (copie di DWV inoculate-proporzioni di api sintomatiche) osservata in questo esperimento conferma l'efficacia del metodo utilizzato per infettare artificialmente le api.

Grafico 9 – Proporzioni di api sfarfallate con le ali deformi in seguito all'iniezione con diluizioni decrescenti di lisato di api sintomatiche (rispettivamente DW<sub>100000</sub> e DW<sub>1000</sub>) e con il lisato di api asintomatiche (NW<sub>1000</sub>) come controllo; le barre di errore indicano l'errore standard.

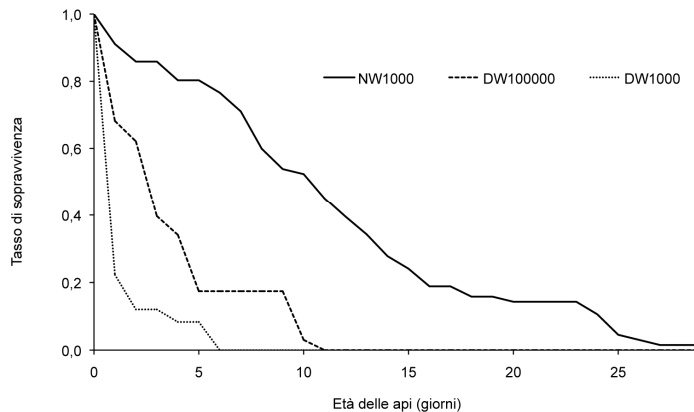


Il tasso di mortalità degli individui trattati con il lisato di api virosate è significativamente più elevato ( $M=5,645$  per DW<sub>100000</sub> e  $M=7,442$  per DW<sub>1000</sub>:  $P<0,01$ ) rispetto a quello degli individui trattati con il lisato di api sane (NW<sub>1000</sub>). Inoltre, è stata osservata una relazione fra il tasso di mortalità delle api trattate e la dose di virus inoculata ( $M=2,564$  per la differenza fra le due dosi:  $P<0,01$ ; grafico 10).

Nel complesso, i risultati ottenuti in laboratorio confermano e avvalorano quanto già osservato in campo. In particolare, è stato verificato che esiste una relazione diretta fra l'infestazione da parte di *V. destructor* e la replicazione di DWV. Inoltre, è stato dimostrato come all'aumentare del numero di copie virali aumenti anche il tasso di

mortalità delle api, tanto a livello individuale quanto a livello di intera colonia, così da determinarne l'eventuale collasso.

Grafico 10 – Sopravvivenza delle api trattate con diluizioni decrescenti di lisato di api con ali deformi (rispettivamente  $DW_{100000}$  e  $DW_{1000}$ ) e con il lisato di api asintomatiche ( $NW_{1000}$ ) come controllo.



Quanto descritto sinora può rendere conto del declino e del successivo collasso degli alveari che si può osservare a fine stagione, tuttavia non spiega ancora quali siano i meccanismi molecolari che stanno alla base di questi processi; di qui, la necessità di indagare a livello di gene l'effetto di quanto osservato in campo e in laboratorio.

### 3.2.3. Sistema immunitario dell'ape e collasso della colonia

Per far luce sulle alterazioni a carico del sistema immunitario dell'ape associate all'incremento della replicazione virale, causata a sua volta dall'infestazione parassitaria, è stata svolta un'analisi trascrittomico di campioni di api adulte raccolti da ciascuna colonia sperimentale a fine stagione (§ 2.4.5.), concentrando l'attenzione sui geni del sistema immunitario dell'ape.

Nella tabella 6 sono riportati i valori di espressione genica nelle api campionate in Ottobre dalle colonie poco infestate (CPI) e molto infestate (CMI). Nel complesso, dei circa 180 geni del sistema immunitario dell'ape (Evans *et al.*, 2006), 19 geni, che codificano principalmente per la sintesi di molecole di riconoscimento e segnale, sono risultati significativamente sotto-espressi e 6 geni, perlopiù di natura antibatterica, sono risultati significativamente sovra-espressi, mentre non sono state osservate alterazioni significative a carico dei geni effettori.

In particolare, il gene dell'immunità che è risultato maggiormente sotto-regolato è *dorsal-1A*, un membro della famiglia NF- $\kappa$ B. *Dorsal-1A* è un gene appartenente al pathway Toll e la sua sotto-espressione può interferire con diversi meccanismi di difesa messi in atto dal sistema immunitario dell'ape, quali: la coagulazione dell'emolinfa e la melanizzazione dei tessuti (processi che si innescano in seguito alla ferita provocata dalla varroa), la sintesi di peptidi antimicrobici e soprattutto la difesa antivirale (Lemaitre e Hoffmann, 2007).

Tabella 6 – Geni del sistema immunitario dell'ape che manifestano un livello di trascrizione significativamente diverso ( $P \leq 0,05$ ) fra colonie poco infestate (CPI) e colonie molto infestate (CMI).

Gene id	Name	Family/Pathway	RPKM (CPI) X $\pm$ SD	RPKM (CMI) X $\pm$ SD	Fold change
GB19066	dorsal-1A*	NF- $\kappa$ B/Toll	0,76 $\pm$ 0,40	0,12 $\pm$ 0,21	0,16
GB14309	cSP33*	serine proteases	0,13 $\pm$ 0,09	0,03 $\pm$ 0,04	0,22
GB13397	SPH51*	serine proteases	1,67 $\pm$ 0,39	0,71 $\pm$ 0,28	0,42
GB13813	AmSCR-B5	Scav. Receptor B	24,11 $\pm$ 5,32	13,63 $\pm$ 3,69	0,57
GB15549	AmSCR-B7	Scav. Receptor B	16,66 $\pm$ 4,53	9,50 $\pm$ 2,20	0,57
GB14642	IGFn3-1	IG Superfam. Genes	40,74 $\pm$ 5,69	24,87 $\pm$ 2,72	0,61
GB17018	Angiopoietin	Fibrinogen	4,90 $\pm$ 1,18	3,07 $\pm$ 0,32	0,63
GB18789	TEPA	TEP	9,41 $\pm$ 0,88	6,05 $\pm$ 1,45	0,64
GB17167	Hem	JNK	15,95 $\pm$ 2,04	10,75 $\pm$ 2,13	0,67
GB11846	IGFn3-7	IG Superfamily	24,27 $\pm$ 1,47	16,78 $\pm$ 0,72	0,69
GB11358	IGFn3-2	IG Superfamily	34,09 $\pm$ 6,60	23,85 $\pm$ 2,48	0,70
GB14382	CTL8	C-lectin domain	25,59 $\pm$ 2,81	19,04 $\pm$ 1,28	0,74
GB13522	MAPKKK9	MAPK	27,91 $\pm$ 3,00	20,95 $\pm$ 3,73	0,75
GB18949	SOCS	JakSTAT	89,91 $\pm$ 10,51	67,66 $\pm$ 5,18	0,75
GB14664	Tak1	IMD	32,92 $\pm$ 3,47	24,94 $\pm$ 2,29	0,76
GB11373	Rac	RAC1 protein	230,71 $\pm$ 27,37	178 $\pm$ 54 $\pm$ 22,84	0,77
GB18324	Galectin-2	Galectin	21,50 $\pm$ 1,74	17,18 $\pm$ 1,48	0,80
GB10026	Galectin-1	Galectin	162,84 $\pm$ 11,12	130,91 $\pm$ 11,23	0,80
GB18923	STAT92E	JakSTAT	32,98 $\pm$ 2,34	26,58 $\pm$ 3,98	0,81
GB11320	RIP1	MAPK	14,08 $\pm$ 1,83	19,37 $\pm$ 3,71	1,38
GB14603	SP17	serine proteases	3500,37 $\pm$ 541,87	4815,52 $\pm$ 669,39	1,38
GB14654	SP11	serine proteases	5,99 $\pm$ 1,80	11,65 $\pm$ 3,18	1,95
GB14645	Eater-like*	EGF Family	14,64 $\pm$ 4,84	33,27 $\pm$ 13,01	2,27
GB13979	NimC2*	Phagocytosis	13,93 $\pm$ 5,48	32,50 $\pm$ 11,71	2,33
GB19301	PGRP-S2*	PGRP	226,29 $\pm$ 52,86	981,11 $\pm$ 868,53	4,34

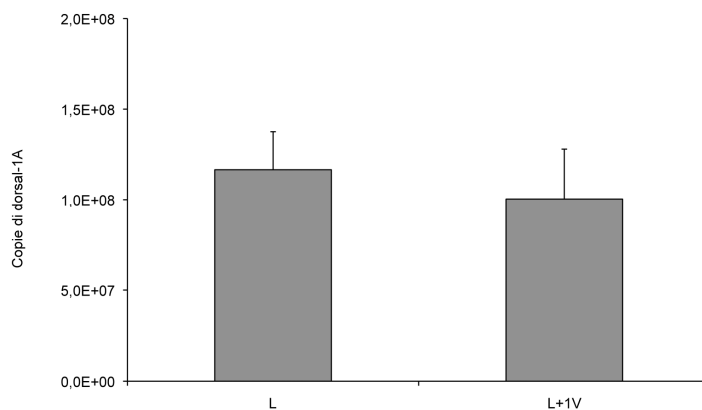
\* Gene per il quale è stato confermato, mediante un'analisi Quantitative Real-Time RT-PCR, il diverso livello di trascrizione registrato fra le due tesi.

### 3.2.4. Effetto dell'infestazione sull'espressione di dorsal-1A

Dalle indagini sin qui condotte, non risultava ancora chiaramente chi fra *V. destructor* e DWV fosse responsabile della sotto-espressione del fattore di trascrizione *dorsal-1A*. Per far luce su tale aspetto, è stato misurato con un'analisi Quantitative Real-Time RT-PCR il livello di espressione di *dorsal-1A* in api neo-sfarfallate, che sono state infestate con nessuna o una varroa e che erano risultate DWV-esenti alla fine dell'esperimento (§ 2.4.6.).

Non sono state riscontrate differenze significative nell'espressione di *dorsal-1A* fra le api infestate e non (grafico 11), suggerendo indirettamente che la sotto-regolazione di *dorsal-1A* può essere attribuita principalmente all'azione del virus. Tale ipotesi è supportata da un'ampia analisi del profilo trascrizionale delle api infestate dalla varroa ma non infettate dai virus, che evidenzia come, fra le api infestate e non, esista una chiara differenza di espressione dei soli geni coinvolti nei processi metabolici e nella segnalazione nervosa (Zhang *et al.*, 2010).

Grafico 11 – Livello di trascrizione di *dorsal-1A* in api infestate con nessuna e una varroa, ma risultate senza DWV. Le barre di errore indicano la deviazione standard.



### 3.2.5. RNAi

Al fine di dimostrare il collegamento fra l'espressione di *dorsal-1A* e la progressione dell'infezione virale, il suddetto gene è stato sotto-regolato attraverso RNAi ed è stato parallelamente calcolato il numero di copie virali presenti nei campioni (§ 2.4.7.).

È stata così osservata una significativa soppressione della trascrizione di *dorsal-1A* nelle api alimentate con il corrispondente dsRNA ( $H=7,00$ ,  $gdl=1$ ;  $P=0,008$ ; grafico 12), con un conseguente significativo incremento delle copie genomiche di DWV osservato nelle stesse api ( $H=9,61$ ,  $gdl=1$ ;  $P=0,002$ ; grafico 13).

Questo risultato dimostra che il livello di trascritto di *dorsal-1A* influenza direttamente la risposta antivirale messa in atto dal sistema immunitario dell'ape che, nella fattispecie, controlla la replicazione di DWV; in pratica, minore è la disponibilità di *dorsal-1A* nell'ape, maggiore è la capacità di replicazione espressa dal virus e viceversa.

I risultati di tale esperimento suggeriscono la possibile strategia di virulenza messa in atto da DWV, che mirerebbe alla soppressione del fattore di trascrizione della famiglia NF- $\kappa$ B, al fine di promuovere la propria replicazione.

Grafico 12 – Livello di trascrizione di *dorsal-1A* in api alimentate per tempi diversi con una soluzione saccarosio/proteine contenente dsRNA di *dorsal-1A* o dsRNA di Green Fluorescent Protein come controllo. Le barre di errore indicano la deviazione standard.

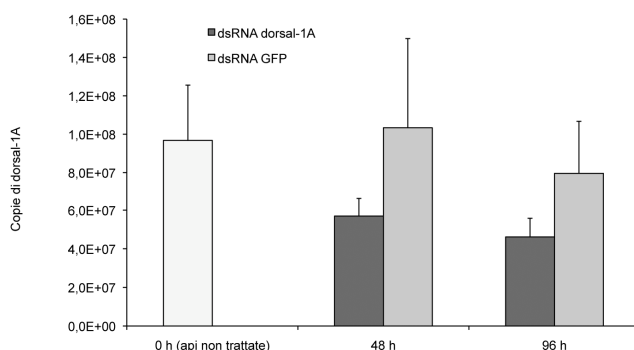
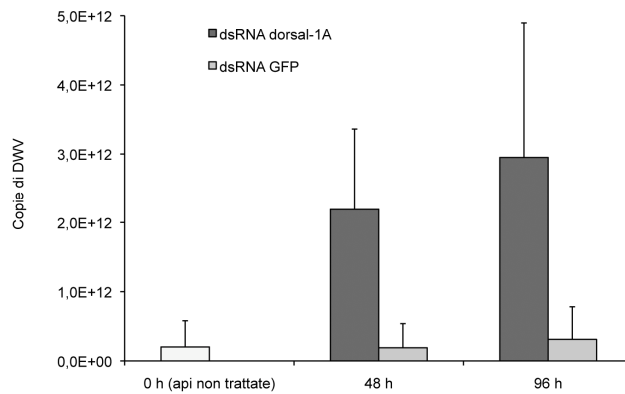


Grafico 13 – Copie genomiche di DWV in api alimentate per tempi diversi con una soluzione saccarosio/proteine contenente dsRNA di *dorsal-1A* o dsRNA di Green Fluorescent Protein come controllo. Le barre di errore indicano la deviazione standard.



### 3.2.6. Interazioni *V. destructor*-DWV

I risultati di questi esperimenti fanno luce sull'interazione fra *V. destructor* e DWV e permettono di ipotizzare una sorta di simbiosi mutualistica fra il parassita e il patogeno.

Negli insetti un'eventuale ferita è in grado di innescare il fattore di trascrizione NF-κB, provocando l'attivazione dei processi di coagulazione dell'emolinfa e di melanizzazione dei tessuti (Lemaitre e Hoffmann, 2007). È possibile che, in un'ape infetta, la reazione alla ferita provocata dalla varroa determini un ulteriore depauperamento del pool cellulare di NF-κB, già limitato a causa del virus. Rimosso l'ostacolo di natura immunitaria, DWV può così replicarsi intensamente fino a provocare la morte dell'ape. In questo modo, la varroa contribuisce indirettamente alla transizione dallo stato di infezione virale latente a quello di infezione conclamata.

Dal canto suo, l'immunosoppressione attuata dal virus nell'ospite può fornire dei benefici sostanziali alla varroa, provocando l'interruzione delle naturali reazioni immunitarie messe in atto dall'ape in seguito all'attività trofica del parassita. In pratica, la varroa può continuare ad alimentarsi liberamente sull'ape, che non è in grado di attivare i processi di coagulazione dell'emolinfa e necrosi dei tessuti nei pressi del foro di alimentazione aperto dall'acaro.

### ***3.3. Ulteriori cause di mortalità delle api***

Gli studi sin qui condotti hanno evidenziato come l'infestazione da parte di *V. destructor* inneschi la replicazione di DWV, determinando l'incremento del numero di copie virali nelle api infestate allo stadio di pupa. È stato inoltre dimostrato che maggiore è il numero di copie genomiche di DWV nelle api, più elevata è la mortalità degli individui, condizione questa che determina il collasso della colonia intera.

Tuttavia, lo studio di campo ha anche permesso di rivelare come, anche prima del drastico incremento indotto dall'interazione letale fra varroa e virus, le colonie molto infestate soffrano di una maggiore mortalità, verosimilmente associata in maniera preponderante all'infestazione (grafici 3 e 4).

Per far luce su questo aspetto, sono stati condotti degli esperimenti di laboratorio volti a studiare nel dettaglio gli effetti provocati dalla parassitizzazione in presenza di infezioni virali latenti e non conclamate.



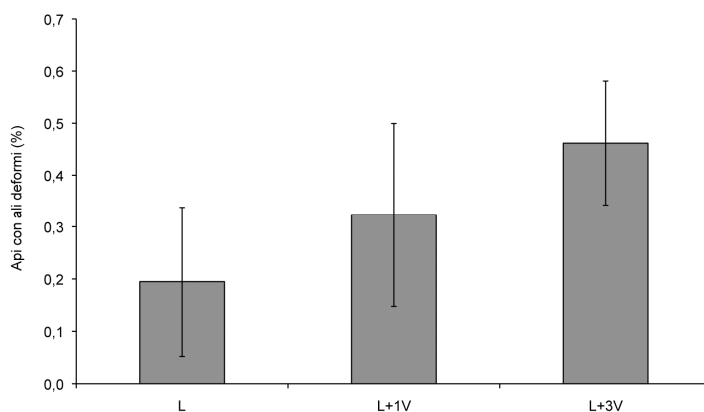
### 3.3.1. Effetto dell'infestazione sulla deformità delle ali

Innanzitutto, è stata studiata a livello di singola ape l'interazione fra *V. destructor* e DWV. In particolare, è stato analizzato in che misura le api infestate con nessuna, 1 o 3 varroe manifestano il sintomo più caratteristico dell'infezione conclamata da DWV, ovvero la deformità delle ali (§ 2.5.1.).

La proporzione di api che manifestano la deformità delle ali allo sfarfallamento è significativamente più bassa negli individui non infestati rispetto a quelli infestati (Overall Chi Square=10,424, gdl=2:  $P<0,01$ ; grafico 14) e cresce all'aumentare del livello di infestazione (0, 1 o 3 varroe). Questo risultato conferma la capacità della varroa di indurre la replicazione virale (già osservato in § 3.2.1.; grafico 8).

È possibile inoltre notare che una piccola percentuale di api non infestate è sfarfallata con le ali deformi, indicando come la sola infestazione sia una condizione sufficiente ma non necessaria, per determinare un'infezione conclamata e che altri fattori possano essere coinvolti nel determinare tale stato.

Grafico 14 – Percentuale di api sfarfallate con le ali deformi in seguito all'infestazione artificiale con nessuna, 1 o 3 varroe durante lo stadio di pupa; le barre di errore indicano la deviazione standard.



### 3.3.2. Influenza dell'infestazione e dell'infezione virale sulla sopravvivenza delle api

In seguito, è stata presa in esame la sopravvivenza delle api infestate con nessuna, 1 o 3 varroe, distinguendo le api sfarfallate con le ali sane da quelle nate con le ali deformi (§ 2.5.1.).

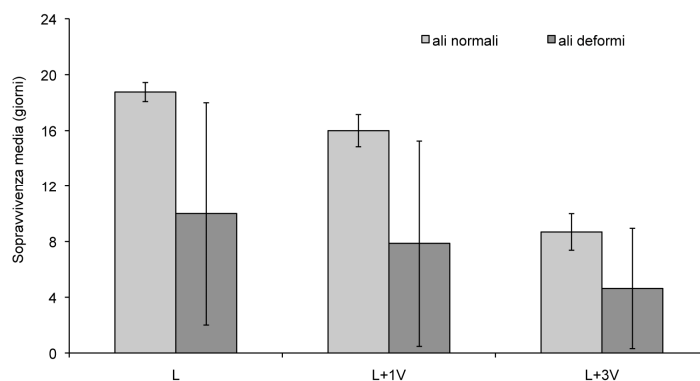
In generale, la sopravvivenza media registrata per le api con le ali deformi è stata, a tutti i livelli di infestazione, significativamente più bassa rispetto a quella rilevata per le api con ali normali ( $F=44,49$ ,  $gdl=1$ ;  $P<0,001$ ; grafico 15).

Inoltre, è stato notato che l'infestazione ad opera di *V. destructor* riduce la longevità delle api, tanto nelle api con ali normali quanto in quelle con ali deformi ( $F=18,22$ ,  $gdl=2$ ;  $P<0,001$ ; grafico 15).

Alla luce di tali risultati, è possibile affermare che l'infezione conclamata è associata a una marcata riduzione della vita delle api; tuttavia, anche la sola infestazione determina un significativo effetto sulla longevità delle api che non mostrano i sintomi di una replicazione virale attiva.

La ridotta sopravvivenza delle api con le ali deformi può essere attribuita alla loro scarsa capacità motoria, che potrebbe condizionare la possibilità di alimentarsi e abbeverarsi adeguatamente rispetto alle compagne con le ali sane. Inoltre, utilizzando l'arnia di osservazione, è stato notato che le api di casa manifestano un comportamento aggressivo nei confronti delle api deformi, tale da aggravare ulteriormente la sopravvivenza di quest'ultime anche in condizioni di campo (dati non pubblicati).

Grafico 15 – Sopravvivenza media (giorni) delle api infestate artificialmente con nessuna, 1 o 3 varroe durante lo stadio di pupa; i dati relativi alle api sfarfallate con le ali normali e con le ali deformi sono riportati separatamente. Le barre di errore indicano la deviazione standard.

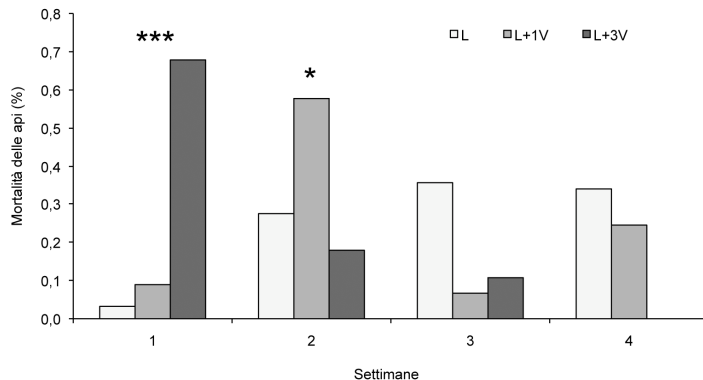


### 3.3.3. Influenza della sola infestazione sulla sopravvivenza delle api

Come già osservato nel § 3.3.2., l'infestazione determina una riduzione della sopravvivenza delle api.

Le api infestate che sono sfarfallate con le ali deformi muoiono entro la prima settimana di vita. Le api infestate asintomatiche, invece, muoiono entro le prime due settimane di osservazione, mentre le api non infestate manifestano una ridotta mortalità nello stesso intervallo (grafico 16). In particolare, è stata registrata una differenza significativa nella mortalità delle api asintomatiche con diversi livelli di infestazione nella prima settimana (Overall Chi Square=31,5819, gdl=2:  $P<0,001$ ; grafico 16) e nella seconda settimana di osservazione (Overall Chi Square=6,9602, gdl=2:  $P=0,0308$ ; grafico 16), suggerendo che gli effetti più gravi della parassitizzazione da parte della varroa sulla mortalità delle api si verificano già nei primi giorni di vita.

Grafico 16 – Mortalità osservata nei diversi intervalli di tempo in api, risultate asintomatiche allo sfarfallamento, infestate artificialmente con nessuna, 1 o 3 varroe durante lo stadio di pupa; le differenze significative registrate nei diversi intervalli di tempo sono state segnalate con gli asterischi (\* $P\leq 0,05$ ; \*\*\* $P\leq 0,001$ ).



Mentre per le api non infestate la mortalità cresce col passare del tempo e può perciò essere attribuita al naturale invecchiamento delle api, lo stesso non si può dire per gli individui infestati. Infatti, anche in condizioni controllate (analoghe a quelle dell'alveare), più alto è il livello di infestazione, maggiori sono i danni provocati dal parassita all'ape e, di conseguenza, maggiore è la mortalità precoce.

### 3.3.4. Influenza dell'infestazione e dell'infezione virale sul peso delle api

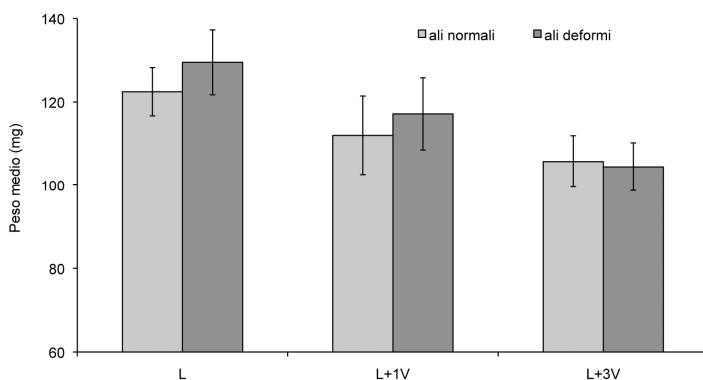
Successivamente, è stato preso in esame il peso allo sfarfallamento delle api infestate con nessuna, 1 o 3 varroe, distinguendo le api nate con le ali sane da quelle nate con le ali deformi (§ 2.5.2.).

Il peso medio delle api infestate è significativamente più basso rispetto a quello delle api non infestate, sia negli individui nati con le ali sane sia in quelli sfarfallati con le ali deformi; inoltre, il peso delle api diminuisce significativamente all'aumentare del livello di infestazione, tanto nelle api sane quanto in quelle sintomatiche ( $F=36,6$ ,  $gdl=2$ ;  $P<0,001$ ; grafico 17).

Tuttavia, confrontando i pesi per ciascun livello di infestazione, è stato notato che le api con le ali deformi hanno un peso simile a quello delle api asintomatiche ( $F=1,68$ ,  $gdl=1$ ;  $P=0,199$ ; grafico 17), suggerendo come la deformità non influenzi il peso dell'ape.

I risultati ottenuti confermano quanto già osservato da Yang e Cox-Foster (2007), secondo i quali la riduzione del peso delle api è il sintomo più evidente causato dalla parassitizzazione da parte della varroa.

Grafico 17 – Peso medio allo sfarfallamento (mg) delle api infestate artificialmente con nessuna, 1 o 3 varroe durante lo stadio di pupa; i dati relativi alle api sfarfallate con le ali normali e con le ali deformi sono riportati separatamente. Le barre di errore indicano la deviazione standard.



Poiché solo una piccola parte delle api infestate presenta le ali deformi allo sfarfallamento (circa il 30% delle api infestate con una varroa, grafico 14) e poiché è stata osservata una sostanziale somiglianza fra il peso delle api con ali sane e quello delle api con ali deformi, suggerendo come la perdita di peso non sia strettamente

associata a un'infezione conclamata ma piuttosto all'infestazione (grafico 17), è stato deciso di escludere dalle analisi successive le api che presentavano i sintomi indotti da DWV. L'attenzione è stata pertanto rivolta allo studio delle cause che determinano la ridotta sopravvivenza delle sole api asintomatiche infestate dalla varroa.

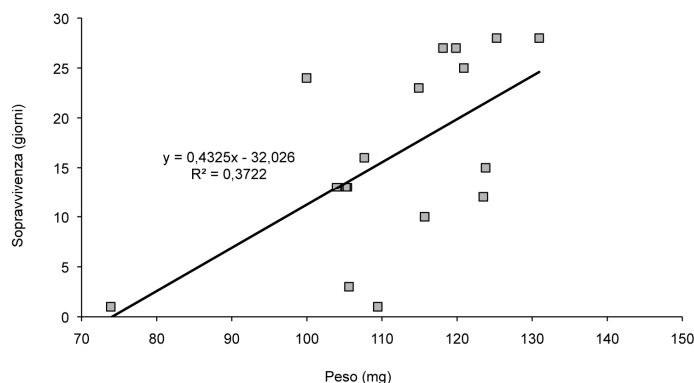
### 3.3.5. Influenza del peso sulla sopravvivenza delle api

Sulla base dei dati sin qui raccolti e dei risultati ottenuti, è stato deciso di valutare l'influenza del peso sulla longevità delle api infestate con nessuna, 1 o 3 varroe (§ 2.5.2.).

Nelle api infestate con una varroa è stata osservata una correlazione significativa fra il peso allo sfarfallamento e la sopravvivenza ( $y=0,4325x-32,026$ ,  $R^2=0,3722$ ;  $P=0,003$ ; grafico 18); in altre parole, maggiore è il peso delle api, più alta è la sopravvivenza. Una correlazione più scarsa, invece, è stata osservata nelle api infestate con tre varroe, anche se, in questo caso, la numerosità del campione era ridotta.

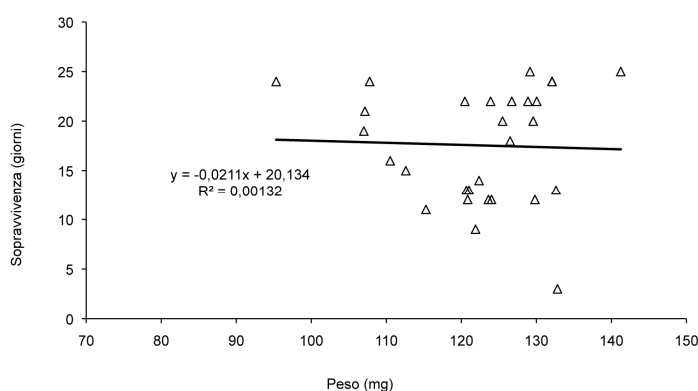
Questi risultati suggeriscono che nelle api infestate esiste una relazione fra il peso alla nascita e la sopravvivenza; tuttavia, essendo il coefficiente di correlazione non molto elevato, è possibile che altri fattori, diversi dal peso, influenzino la longevità delle api parassitate.

Grafico 18 – Correlazione fra il peso allo sfarfallamento (mg) e la durata della vita (giorni) nelle api infestate con una varroa durante lo stadio di pupa.



È interessante notare che la relazione fra il peso allo sfarfallamento e la durata della vita non è stata osservata nelle api non infestate, ( $y = -0,0211x + 20,134$ ,  $R^2 = 0,00132$ ;  $P = 0,853$ ; grafico 19), suggerendo come il peso di per sé non sia correlato alla sopravvivenza delle api. Di contro, la riduzione del peso sembra essere un buon indicatore dell'intensità del danno provocato dalla varroa, che si riflette, con una legge proporzionale inversa, sulla sopravvivenza dell'ape.

Grafico 19 – Correlazione fra il peso allo sfarfallamento (mg) e la durata della vita (giorni) nelle api non infestate.



Questi risultati sono in apparente contrasto con quanto osservato da Yang e Cox-Foster (2007), che riportano una mancanza di correlazione fra il peso delle api infestate e la sopravvivenza, basando tale affermazione solo sulla bassa significatività del coefficiente di correlazione. Tuttavia, non è corretto escludere una correlazione sulla base di una bassa significatività, in quanto questa può essere legata a problemi di campionamento più che a una mancanza di relazione fra le variabili.

### 3.3.6. Contenuto idrico delle api

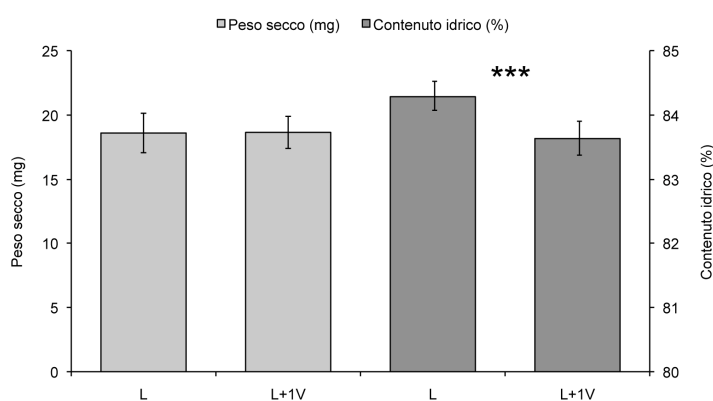
In seguito, si è voluto indagare sulle cause della riduzione di peso che si osserva per le api infestate, ponendo inizialmente l'attenzione sul peso secco e sul contenuto idrico delle api allo sfarfallamento (§ 2.5.3.).

Il contenuto idrico misurato allo sfarfallamento nelle api infestate con una varroa è risultato significativamente più basso rispetto a quello delle api non infestate ( $F=25,57$ ,  $gdl=1$ :  $P<0,001$ ; grafico 20); di contro, il peso secco delle api, non sembra essere influenzato dall'infestazione ( $F=0,16$ ,  $gdl=1$ :  $P=0,687$ ; grafico 20).

Alla luce di questo risultato, è possibile affermare che il minor peso registrato nelle api infestate (grafico 17) è attribuibile principalmente alla riduzione del contenuto idrico.

La riduzione del peso nelle api infestate era già stata osservata da Bowen-Walker e Gunn (2001), i quali attribuiscono tale evidenza alla sottrazione di emolinfa esercitata dall'attività trofica della varroa; inoltre, essi sostengono che la quantità di emolinfa prelevata dal parassita all'ape durante l'infestazione in celletta è comparabile con la riduzione di peso osservata allo sfarfallamento.

Grafico 20 – Peso secco (mg) e contenuto idrico allo sfarfallamento (%) delle api infestate artificialmente con nessuna e una varroa durante lo stadio di pupa. Le barre di errore indicano la deviazione standard. La differenza significativa registrata per il contenuto idrico è stata segnalata con gli asterischi (\*\*\*) ( $P\leq 0,001$ ).

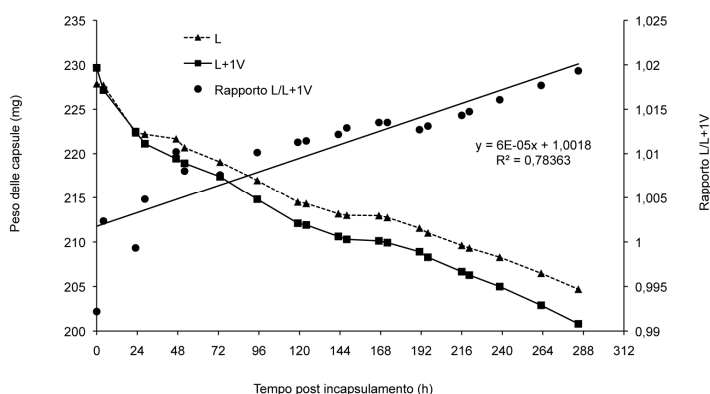


### 3.3.7. Dinamica della perdita di peso nell'ape: dallo stadio di pupa a quello di adulto

Sulla base dei risultati fin qui ottenuti, è stato deciso di studiare la dinamica della perdita di peso che si verifica in celletta durante la metamorfosi dell'ape (§ 2.5.4).

È stato osservato che il peso delle api non infestate e di quelle infestate da una varroa diminuisce passando dallo stadio di pupa a quello di adulto. In particolare, il peso delle capsule contenenti le pupe di api infestate con una varroa cala di più rispetto a quello delle capsule che contengono le pupe non infestate (grafico 21).

Grafico 21 – Peso (mg) delle capsule contenenti api non infestate o infestate con una varroa (dallo stadio di pupa allo sfarfallamento delle api); l'asse secondario si riferisce all'andamento della riduzione di peso osservata per le api infestate.



Alla luce di quanto osservato in questa prova, non è possibile dare per scontata l'ipotesi che la sola sottrazione dell'emolinfa provochi la riduzione del peso che si rileva nelle api infestate. In effetti, se la semplice perdita di emolinfa determinasse la riduzione del peso delle api, il peso totale della capsula contenente l'ospite e il suo parassita non dovrebbe variare nel tempo, trattandosi di un mero trasferimento di materiale da un individuo all'altro.

I risultati ottenuti, invece, suggeriscono che altri fattori, diversi dalla sola sottrazione dell'emolinfa, siano coinvolti nella riduzione del peso delle api infestate.



### 3.3.8. Estrazione degli idrocarburi cuticolari delle api e analisi GC-MS

Come tutti gli insetti, anche le api hanno il corpo ricoperto da una cuticola impermeabile, che impedisce loro di disidratarsi. Lo strato impermeabile della cuticola è costituito da idrocarburi, la cui carenza potrebbe alterarne il corretto funzionamento. Si è voluto pertanto indagare se l'infestazione di *V. destructor* determini eventuali alterazioni a carico degli idrocarburi cuticolari dell'ape. Per far ciò, sono state svolte analisi GC-MS di estratti di api neo-sfarfallate infestate con nessuna, 1 o 3 varroe durante lo stadio di pupa (§ 2.5.6.).

Come già osservato da Francis *et al.* (1989), la quantità totale di lipidi che può essere estratta con esano dalla cuticola di un'ape appena sfarfallata è di circa 40 µg. L'analisi GC-MS di tali estratti ha rivelato la presenza di diversi idrocarburi lineari saturi, che presentano un numero dispari di atomi di carbonio (da 19 a 33), accompagnati dai corrispondenti idrocarburi monoinsaturi, oltre a idrocarburi saturi ramificati (figura 7), come già riscontrato da diversi autori (Francis *et al.*, 1989; Salvy *et al.*, 2001; Del Piccolo *et al.*, 2010).

Nel complesso, non sono state rilevate differenze qualitative fra gli idrocarburi presenti sulla cuticola di api non infestate e infestate (figura 7), confermando quanto già osservato da Salvy *et al.* (2001).

La quantità assoluta di idrocarburi saturi, che alla temperatura di alveare (34 °C) si presentano allo stato solido, fornendo all'insetto una barriera efficace nei confronti della perdita idrica, è simile fra le api non infestate e quelle infestate da una varroa, mentre risulta più bassa nelle api infestate da tre acari (grafico 22).

Figura 7 – Profilo cuticolare ottenuto dall’analisi GC-MS di estratti di api neo-sfarfallate, infestate artificialmente con nessuna, 1 o 3 varroe durante lo stadio di pupa. In ordinata è riportata l’intensità del segnale in Mcounts (total ion current – TIC).

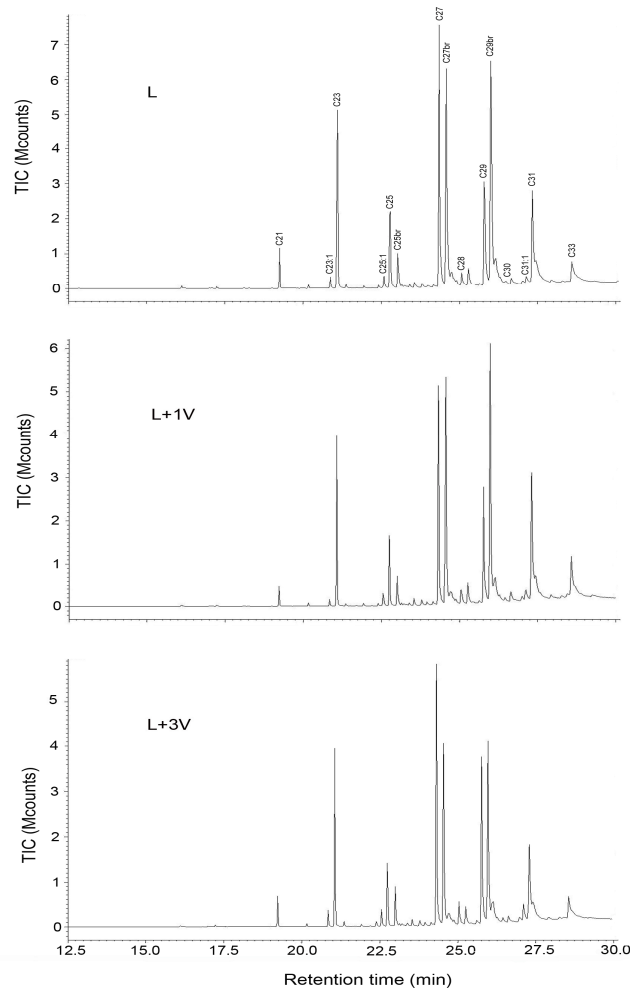
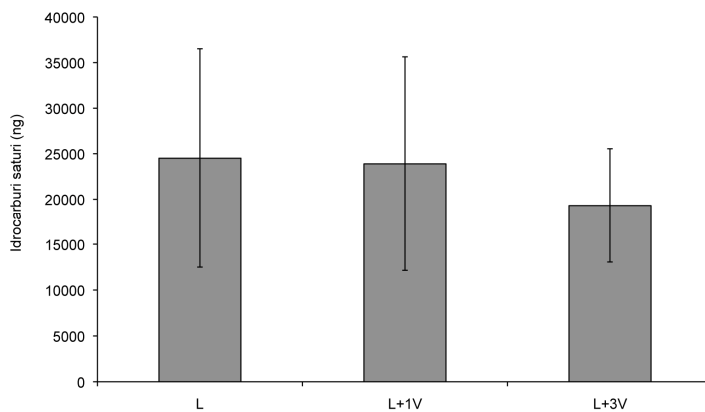


Grafico 22 – Quantità assoluta (ng) registrata per gli idrocarburi saturi (C19-C33) presenti allo stato solido su api appena sfarfallate, infestate artificialmente con nessuna, 1 o 3 varroe durante lo stadio di pupa.



La quantità totale di lipidi che è stata estratta dall'intero corpo delle api infestate non è significativamente diversa da quella estratta dalle api non infestate. In effetti, il contenuto relativo di grassi estratti è stato di  $7,54 \pm 0,80\%$  e  $6,63 \pm 1,08\%$ , rispettivamente per le api infestate e non; tale risultato è in linea con quanto già osservato da Bowen-Walker e Gunn (2001).

L'infestazione dell'ape durante lo stadio di pupa, pertanto, non si ripercuote sul metabolismo dei lipidi, bensì potrebbe interferire con lo sviluppo della cuticola, riducendo la quantità di alcuni idrocarburi che si depositano sulla superficie esterna dell'insetto. Tale fenomeno potrebbe essere in relazione con la sottrazione di emolinfa, la quale contiene le lipoforine, che trasportano gli idrocarburi prodotti dagli enociti alla cuticola dell'insetto (Bagnères e Blomquist, 2010). In pratica, la sottrazione dell'emolinfa potrebbe determinare un minore accumulo degli idrocarburi sulla superficie cuticolare dell'ape infestata, interferendo con la permeabilità della cuticola e determinando una minore capacità di prevenire la perdita di acqua attraverso la sua superficie corporea.

Nonostante i lipidi cuticolari svolgano un ruolo importante nella prevenzione della disidratazione, essi rappresentano solo un tassello del complesso mosaico che compone la cuticola degli insetti. Pertanto, sono necessari studi più approfonditi per individuare ulteriori componenti, come ad esempio la melanina, coinvolti nella difesa dell'insetto contro la disidratazione e per verificare gli eventuali effetti dell'infestazione sulla disponibilità per l'ape di tali composti.

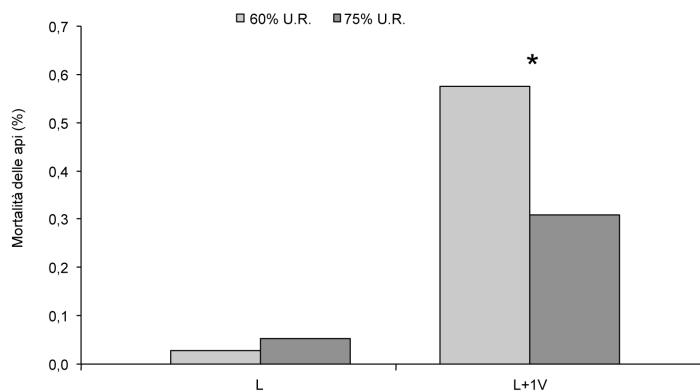
### *3.3.9. Effetto dell'umidità sulla sopravvivenza delle api*

Al fine di verificare l'ipotesi secondo cui l'infestazione altererebbe l'integrità dello strato cuticolare delle api, influenzando la capacità di ridurre la perdita di acqua attraverso la cuticola, è stato condotto un esperimento in cui api infestate con nessuna o con una varroa sono state allevate a due diversi regimi di umidità (§ 2.5.7.); in particolare, è stata confrontata la mortalità delle api che si registra nei primi giorni di vita, quando sembra che l'infestazione da parte della varroa abbia maggior effetto sulla sopravvivenza dell'ospite (§ 3.3.3.; grafico 16).

Durante la prima settimana di osservazione, le api infestate, che sono state mantenute al livello inferiore di umidità relativa (60%), hanno manifestato una minore

sopravvivenza rispetto a quelle allevate all'umidità più alta (75%) (Chi Square=4,210, gdl=1:  $P=0,04$ ; grafico 23), mentre la sopravvivenza delle api non infestate è stata simile nei due regimi di umidità. Ciò evidenzia come le api infestate, il cui rivestimento lipidico potrebbe essere stato danneggiato, siano maggiormente sensibili a condizioni di umidità relativa più bassa rispetto a quella registrata normalmente in alveare.

Grafico 23 – Mortalità di api infestate e non infestate, allevate a diverse condizioni di umidità relativa (60% e 75%) durante la prima settimana di vita; la differenza significativa è stata segnalata con gli asterischi ( $*P\leq 0,05$ ).



In questo studio è stato osservato come l'infestazione produca effetti a carico del rivestimento idrocarburico, con conseguenti ripercussioni sull'igroregolazione. Tuttavia, oltre alle conseguenze dirette sulla capacità di igroregolazione da parte delle api, l'alterazione del rivestimento cuticolare causata dall'acaro potrebbe avere effetti collaterali non trascurabili. Infatti, la cuticola rappresenta la prima barriera contro l'infezione dei patogeni e in questa chiave gli idrocarburi, assieme ad altri composti, possono svolgere un ruolo importante (Turillazzi *et al.*, 2006). È possibile quindi che l'infestazione, determinando l'alterazione della cuticola, non condizioni solo il contenuto idrico delle api, ma anche la loro capacità di far fronte all'ingresso dei vari agenti patogeni.

Si tenga infine presente che la vita sociale delle api e, in particolare, il riconoscimento fra compagni di nido sono profondamente legati all'impronta chimica codificata negli idrocarburi cuticolari (Page *et al.*, 1991); in quest'ottica, le alterazioni riportate in questo studio potrebbero avere effetti anche sulle complicate interazioni all'interno della colonia.

## 4. CONCLUSIONI

Il presente lavoro, avente per oggetto il collasso delle colonie d'api, ha fatto luce sul ruolo svolto dall'interazione fra l'acaro parassita *V. destructor* e Deformed Wing Virus nel collasso delle colonie di *A. mellifera*.

È stato dimostrato che, in condizioni di campo, l'elevata infestazione da parte della varroa è in grado di promuovere la replicazione di DWV, che può così raggiungere livelli tali da determinare un incremento della mortalità delle api e il collasso della colonia. Gli esperimenti di laboratorio hanno evidenziato come l'attività trofica della varroa attivi la replicazione del virus nelle api, le quali manifestano un tasso di mortalità direttamente proporzionale alla carica virale.

Questi risultati forniscono la prima prova di campo relativa all'esistenza di un nesso causale fra l'infestazione di *V. destructor*, l'abbondanza di DWV nelle colonie e la mortalità delle api, spiegando il declino e il collasso che si osserva a fine stagione nelle colonie infestate. L'analisi trascrittomica delle api provenienti dagli alveari infestati, in prossimità del collasso, ha individuato in NF- $\kappa$ B uno degli elementi chiave della risposta immunitaria che viene attivata in questo caso. Questa famiglia di geni, è coinvolta anche in pathway riguardanti la risposta a diversi fattori di stress. Ciò suggerisce come altri fattori possano competere per l'utilizzo del pool cellulare di NF- $\kappa$ B o comunque agire negativamente sul sistema immunitario dell'ape, favorendo la proliferazione di patogeni silenti associati alle api e determinando l'eventuale collasso delle colonie.

Il presente lavoro, dunque, si propone come un modello interpretativo per lo studio delle cause di varia natura che sono in grado di interferire con il sistema immunitario delle api, alterandone la funzionalità e provocando, di conseguenza, l'incapacità di reazione dell'ape e la sua morte.

La sindrome immunosoppressiva, evidenziata in questo studio, può quindi spiegare l'origine multifattoriale del collasso delle colonie di api e costituire il perno di ulteriori studi riguardanti ad esempio l'impatto di stress abiotici (es. cattiva alimentazione, impiego di pesticidi, ecc.) sulla salute delle api. Ulteriori e approfondite

ricerche in tal senso potranno contribuire in modo significativo alla comprensione definitiva dei meccanismi di base che determinano il collasso delle colonie.

Gli studi sulle ulteriori cause di mortalità delle api hanno permesso di dimostrare che l'acaro è in grado di provocare un'alterazione fisiologica nell'ape che, privata di parte degli idrocarburi normalmente presenti sulla cuticola, è impedita a svolgere una corretta igroregolazione, con conseguente riduzione della sopravvivenza degli individui.

Attraverso questo lavoro, quindi, è stato spiegato un ulteriore effetto negativo del parassita sull'ape e ciò potrebbe rappresentare un primo passo nello sviluppo di soluzioni alternative al problema della varroa basate, ad esempio, sulla possibilità di ricostituire, mediante una nutrizione supplementare *ad hoc*, lo strato di idrocarburi cuticolari compromesso in seguito all'infestazione.

## Ringraziamenti

La presente ricerca non sarebbe stata possibile senza il lavoro di molte persone.

Esprimo la mia sincera gratitudine nei confronti del dott. Francesco Nazzi per l'assistenza fornita durante tutto il percorso di dottorato e per l'essenziale contributo scientifico apportato in fase di progettazione e realizzazione di questo studio.

Un ringraziamento lo rivolgo al dott. Fabio Del Piccolo e al dott. Giorgio Della Vedova, afferenti al Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali (Università degli Studi di Udine), per aver collaborato, assieme alla sig.ra Francesca Covre e al dott. Nicola Franceschi, alla realizzazione degli esperimenti di campo e di laboratorio.

Desidero inoltre ringraziare il prof. Francesco Pennacchio, il dott. Gennaro Di Prisco, la dott.ssa Paola Varricchio e il dott. Emilio Caprio, afferenti al Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria "Filippo Silvestri" (Università degli Studi di Napoli "Federico II"), per aver messo a disposizione le proprie competenze scientifiche e per aver realizzato le analisi molecolari.

Ringrazio la dott.ssa Federica Cattonaro dell'Istituto di Genomica Applicata (Parco Scientifico e Tecnologico Luigi Danieli, Udine) per aver svolto l'analisi metagenomica e l'analisi trascrittomica.

Un ringraziamento lo porgo al prof. Ignazio Floris (Dipartimento Protezione Piante, Università di Sassari) e al prof. Giuseppe Gargiulo (Dipartimento di Biologia Evoluzionistica Sperimentale, Università di Bologna) per il prezioso contributo fornito in fase di revisione dell'elaborato.

Si ringrazia il Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali per aver finanziato il progetto "ApeNet – Ricerca e Monitoraggio in Apicoltura", che ha permesso questa ricerca.

## BIBLIOGRAFIA

- Abramson J. H. (2004) – WINPEPI (PEPI for Windows): computer programs for epidemiologists. *Epidemiologic Perspectives & Innovations*, 1: 6.
- Allen M., Ball B. V. (1996) – The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World*, 77: 141-162.
- Amdam G. V., Hartfelder K., Norberg K., Hagen A., Omholt S. W. (2004) – Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): A factor in colony loss during overwintering? *Journal of Economic Entomology*, 97: 741-747.
- Anderson D. L., Trueman J. W. H. (2000) – *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, 24: 165-189.
- Anderson D., East I. J. (2008) – The Latest Buzz About Colony Collapse Disorder. *Science*, 319: 724-725.
- Ashiralieva A., Genersch E. (2006) – Reclassification, genotypes and virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood in honeybees - a review. *Apidologie*, 37: 411-420.
- Babendreier D., Joller D., Romeis J., Bigler F., Widmer F. (2007) – Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiology Ecology*, 59: 600-610.
- Bagnères A. G., Blomquist G. J. (2010) – Site of synthesis, mechanism of transport and selective deposition of hydrocarbons. In “Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology”, Blomquist G. J., Bagnères A. G. (Eds.), Cambridge University Press, Cambridge (UK), pp. 75-99.
- Bailey L. (1983) – *Melissococcus pluton*, the cause of European foulbrood of honey bees (*Apis* spp.). *Journal of Applied Bacteriology*, 55: 65-69.
- Bailey J., Scott-Dupree C., Harris R., Tolman J., Harris B. (2005) – Contact and oral toxicity to honey bees (*Apis mellifera*) of agents registered for use for sweet corn insect control in Ontario, Canada. *Apidologie*, 36: 623-633.
- Benjamin A., McCallum B. (2008) – A World Without Bees. Guardian Books, London (UK), pp. 298.



- Boecking O., Spivak M. (1999) – Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud.. *Apidologie*, 30: 141-158.
- Boncristiani H. F., Di Prisco G., Pettis J. S., Hamilton M., Chen Y. P. (2009) – Molecular approaches to the analysis of deformed wing virus replication and pathogenesis in honey bees, *Apis mellifera*. *Virology Journal*, 6: 221.
- Boot W. J., Calis J. N. M., Beetsma J. (1992) – Differential period of *Varroa* mite invasion into worker and drone cells of honey bees. *Experimental and Applied Acarology*, 16: 295-301.
- Bowen-Walker P. L., Martin S. J., Gunn A. (1999) – The transmission of Deformed Wing Virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud.. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73: 101-106.
- Bowen-Walker P. L., Gunn A. (2001) – The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 101: 207-217.
- Brodschneider R., Crailsheim K. (2010) – Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41: 278-294.
- Cameron S. A., Lozier J. D., Strange J. P., Koch J. B., Cordes N., Solter L. F., Griswold T. L. (2011) – Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *PNAS*, 108: 662-667.
- Chauzat M. P., Faucon J. P., Martel A. C., Lachaize J., Cougoule N., Aubert M. A. (2006) – A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *Journal of Economic Entomology*, 99: 253-262.
- Chen Y. P., Pettis J. S., Collins A., Feldlaufer M. F. (2006a) – Prevalence and Transmission of Honeybee Viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 606-611.
- Chen Y., Evans J., Feldlaufer M. (2006b) – Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92: 152-159.
- Claudianos C., Ranson H., Johnson R. M., Biswas S., Schuler M. A., Berenbaum M. R., Feyereisen R., *et al.* (2006) – A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, 15: 615-636.

- Comparini A., Biasiolo A. (1991) – Genetic discrimination of Italian bee, *Apis mellifera ligustica* versus Carniolan bee, *Apis mellifera carnica* by allozyme variability analysis. *Biochemical Systematics and Ecology*, 19: 189-194.
- Costa A., Jan E., Sarnow P., Schneider D. (2009) – The Imd Pathway Is Involved in Antiviral Immune Responses in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 4: e7436.
- Cox-Foster D. L., Conlan S., Holmes E. C., Palacios G., Evans J. D., Moran N. A., Quan P. L., *et al.* (2007) – A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Science*, 318: 283-287.
- Coyaud S. (2008) – La scomparsa delle api. Mondadori, Milano (Italia), pp. 231.
- Crailsheim K., Brodschneider R., Neumann P. (2009) – The COLOSS puzzle: filling in the gaps. Proceedings of the 4<sup>th</sup> COLOSS Conference, 3-4 March 2009. Zagreb, Croatia, pp. 46-47.
- Crane E. (1990) – Bees and beekeeping: science, practice, and world resources. Heinemann Newnes, Oxford (UK), pp. 614.
- De Jong D., De Jong P. H., Goncalves L. S. (1982) – Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*, 21: 165-167.
- de Miranda J. R., Genersch E. (2010) – Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: S48-S61.
- de Miranda J. R., Cordonni G., Budge G. (2010) – The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: S30-S47.
- Del Piccolo F., Nazzi F., Della Vedova G., Milani N. (2010) – Selection of *Apis mellifera* workers by the parasitic mite *Varroa destructor* using host cuticular hydrocarbons. *Parasitology*, 137: 967-973.
- Donzé G., Guerin P. M. (1994) – Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 34: 305-319.
- Duan J. J., Marvier M., Huesing J., Dively G., Huang Z. Y. (2008) – A Meta-Analysis of Effects of Bt Crops on Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *PLoS ONE*, 3: e1415.
- Ellis J. D., Evans J. D., Pettis J. S. (2010) – Colony losses, managed colony population decline and Colony Collapse Disorder in the United States. *Journal of Apicultural Research*, 49: 134-136.

- European Food Safety Authority (2009) – Bee Mortality and Bee Surveillance in Europe. Reperibile all'indirizzo: <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/27e.htm>, consultato il 02/12/2011.
- Evans J. D., Aronstein K., Chen Y. P., Hetru C., Imler J.-L., Jiang H., Kanost M., *et al.* (2006) – Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15: 645-656.
- Evans J. D., Chen Y. P., Di Prisco G., Pettis J. S., Williams V. (2009) – Bee cups: Single-use cages for honey bee experiments. *Journal of Apicultural Research*, 48: 300-302.
- Fazier M., Muli E., Conklin T., Schmehl D., Torto B., Frazier J., Tumlinson J., *et al.* (2009) – A scientific note on *Varroa destructor* found in East Africa; threat or opportunity? *Apidologie*, 41: 463-465.
- Francis B. R., Blanton W. E., Littlefield J. L., Nunamaker R. A. (1989) – Hydrocarbons of the cuticle and hemolymph of the adult honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Annals of Entomological Society of America*, 82: 486-494.
- Fries I., Rosenkranz P. (1996) – Number of reproductive cycles of *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Experimental and Applied Acarology*, 20: 103-112.
- Fries I. M., Feng F., da Silva A. J., Slemenda S. B., Pieniazek N. J. (1996) – *Nosema ceranae* n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, 32: 356-365.
- Genersch E., Yue C., Fries I., de Miranda J. R. (2005) – Detection of *Deformed wing virus*, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities. *Journal of Invertebrate Pathology*, 91: 61-63.
- Gibbs A. G. (2002) – Lipid melting and cuticular permeability: new insights into an old problem. *Journal of Insect Physiology*, 48: 391-400.
- Gibbs A. G., Rajpurohit S. (2010) – Cuticular lipids and water balance. In “Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology”, Blomquist G. J., Bagnères A. G. (Eds.), Cambridge University Press, Cambridge (UK), pp. 100-120.
- Gisder S., Aumeier P., Genersch E. (2009) – Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology*, 90: 463-467.

- Greatti M., Milani N., Nazzi F. (1992) – Reinfestation of an acaricide-treated apiary by *Varroa jacobsoni* Oud.. *Experimental and Applied Acarology*, 16: 279-286.
- Harz M., Müller F., Radenmacher E. (2010) – Organic acids: Acute toxicity on *Apis mellifera* and recovery in the haemolymph. *Journal of Apicultural Research*, 49: 95-96.
- Highfield A. C., El Nagar A., Mackinder L. C. M., Noël L. M.-L. J., Hall M. J., Martin S. J., Schroeder D. C. (2009) – Deformed Wing Virus Implicated in Overwintering Honeybee Colony Losses. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 7212-7220.
- Hoffmann J. A. (2003) – The immune response of *Drosophila*. *Nature*, 426: 33-38.
- Ifantidis M. D. (1983) – Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in worker and drone honeybee brood cells. *Journal of Apicultural Research*, 22: 200-206.
- Imdorf A., Bogdanov S., Ochoa R. I., Calderone N. W. (1999) – Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* (Oud.) in honey bee colonies. *Apidologie*, 30: 209-228.
- Iqbal J., Mueller U. (2007) – Virus infection causes specific learning deficits in honeybee foragers. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274: 1517-1521.
- Johnson R. M., Ellis M. D., Mullin C. A., Frazier M. (2010) – Pesticides and honey bee toxicity - USA. *Apidologie*, 41: 312-331.
- Ju J., Kim D. H., Bi L., Meng Q., Bai X., Li Z., Li X., *et al.* (2006) – Four-color DNA sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators. *PNAS*, 103: 19635-19640.
- Klein A. M., Vaissière B. E., Cane J. H., Dewenter I. S., Cunningham S. A., Kremen C., Tscharntke T. (2007) – Importance of pollinators in changing land scapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274: 303-313.
- Kovac H., Crailsheim K. (1988) – Lifespan of *Apis mellifera carnica* Pollm. infested by *Varroa jacobsoni* Oud. in relation to season and extent of infestation. *Journal of Apicultural Research*, 27: 230-238.
- Le Conte Y., Ellis M., Ritter W. (2010) – *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie*, 41: 353-363.
- Lemaitre B., Hoffmann J. (2007) – The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Entomology*, 25: 697-743.

- Marchetti S. (1985) – Il “metodo dei sestì” per la valutazione numerica degli adulti in famiglie di *Apis mellifera* L.. *Apicoltura*, 1: 41-61.
- 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.
- Martin S. J., Medina L. M. (2004) – Africanized honey bees have unique tolerance to *Varroa* mites. *Trends in Parasitology*, 20: 112-114.
- Martin S. J., Ball B. V., Carreck N. L. (2010) – Prevalence and persistence of deformed wing virus (DWW) in untreated or acaricide-treated *Varroa destructor* infested honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Journal of Apicultural Research*, 49: 72-79.
- Martín-Hernández R., Meana A., Prieto L., Salvador A. M., Garrido-Bailón E., Higes M. (2007) – Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 6331-6338.
- Milani N. (1999) – The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie*, 30: 229-234.
- Minitab 16 Statistical Software (2010) – [Computer software]. State College, PA: Minitab, Inc. (www.minitab.com).
- Möckel N., Gisder S., Genersch E. (2011) – Horizontal transmission of deformed wing virus: pathological consequences in adult bees (*Apis mellifera*) depend on the transmission route. *Journal of General Virology*, 92: 370-377.
- Moritz R. F. A., de Miranda J., Fries I., Le Conte Y., Nuemann P., Paxton R. J. (2010) – Research strategies to improve honeybee health in Europe. *Apidologie*, 41: 227-242.
- Mortazavi A., Williams B. A., McCue K., Schaeffer L., Wold B. (2008) – Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 5: 621-628.
- Nazzi F. (1992) – Morphometric analysis of honey bees from an area of racial hybridization in northeastern Italy. *Apidologie*, 23: 89-96.
- Nazzi F., Milani N. (1994) – A technique for reproduction of *Varroa jacobsoni* Oud. under laboratory conditions. *Apidologie*, 25: 579-584.
- Nazzi F. (2008) – Varroa e CCD: considerazioni sul possibile ruolo di *Varroa destructor* nella sindrome del collasso della colonia. *APOidea*, 5: 72-77.

- Neumann P., Carreck N. L. (2010) – Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*, 49: 1-6.
- Oldroyd B. P. (2007) – What’s Killing American Honey Bees? *PLoS Biology*, 5: 1195-1199.
- Page R. E., Metcalf R. A., Metcalf R. L., Erickson E. H., Lampman R. L. (1991) – Extractable hydrocarbons and kin recognition in honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Chemical Ecology*, 17: 745-756.
- Paxton R. J. (2010) – Does infection by *Nosema ceranae* cause “Colony Collapse Disorder” in honey bees (*Apis mellifera*)? *Journal of Apicultural Research*, 49: 80-84.
- Pettis J. S., Delaplane K. S. (2010) – Coordinated responses to honey bee decline in the USA. *Apidologie*, 41: 256-263.
- Potts S. G., Roberts S. P. M., Dean R., Marris G., Brown M. A., Jones H. R., Neumann P., *et al.* (2010) – Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research*, 49: 15-22.
- Rademacher E., Harz M. (2006) – Oxalic acid for the control of varroosis in honey bee colonies - a review. *Apidologie*, 37: 98-120.
- Ramirez-Romero R., Chaufaux J., Pham-Delègue M.-H. (2005) – Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. *Apidologie*, 36: 601-611.
- Ratnieks F. L. W., Carreck N. L. (2010) – Clarity on Honey Bee Collapse? *Science*, 327: 152-153.
- Ribière M., Ball B., Aubert M. F. A. (2008) – Natural history and geographical distribution of honeybee viruses, In: “Virology and the Honey Bee”, Aubert M., Ball B., Fries I., Moritz R. F. A., Milani N., Bernardinelli I. (Eds.), European Commission, Brussels, pp. 15-84.
- Salvy M., Martin C., Bagnères A. G., Provost E., Roux M., Le Conte Y., Clément J. L. (2001) – Modifications of the cuticular hydrocarbon profile of *Apis mellifera* worker bees in the presence of the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in brood cells. *Parasitology*, 122: 145-159.
- Sammataro D., Gerson U., Needham G. (2000) – Parasitic mites of honey bees: life history, implications, and impact. *Annual Review of Entomology*, 45: 519-548.

- Schulz A. E. (1984) – Reproduction and population dynamics of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. in correlation with the brood cycle of *Apis mellifera*. *Apidologie*, 5: 401-419.
- Shah K. S., Evans E. C., Pizzorno M. C. (2009) – Localization of deformed wing virus (DWV) in the brains of the honeybee, *Apis mellifera* Linnaeus. *Virology Journal*, 6: 182.
- Shen M., Yang X., Cox-Foster D., Cui L. (2005) – The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology*, 342: 141-149.
- Simone-Finstrom M., Spivak M. (2010) – Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*, 41: 295-311.
- Spivak M. (1996) – Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, 27: 245-260.
- Starks P. T., Blackie C. A., Seeley T. D. (2000) – Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften*, 87: 229-231.
- StatPlus:mac (2009) – AnalystSoft Inc., StatPlus:mac - programmi di analisi statistica. Versione 2009 ([www.analystsoft.com/it/](http://www.analystsoft.com/it/)).
- Summers A. (2010) – Honey Bee Stress Syndrome (HBSS) (or redefining what's been affecting our bees). *American Bee Journal* (August 2010). Reperibile all'indirizzo: [http://www.americanbeejournal.com/site/epage/86436\\_828.htm](http://www.americanbeejournal.com/site/epage/86436_828.htm), consultato il 06/12/2011.
- Sumpter D. J. T., Martin S. J. (2004) – The dynamics of virus epidemics in *Varroa*-infested honey bee colonies. *Journal of Animal Ecology*, 73: 51-63.
- Tentcheva D., Gauthier L., Zappulla N., Dainat B., Cousserans F., Colin M. E., Bergoin M. (2004) – Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 7185-7191.
- Thompson H. M. (2003) – Behavioural effects of pesticides in bees - Their potential for use in risk assessment. *Ecotoxicology*, 12: 317-330.
- Turillazzi S., Mastrobuoni G., Dani F. R., Moneti G., Pieraccini G., La Marca G., Bartolucci G., *et al.* (2006) – Dominulin A and B: Two New Antibacterial Peptides Identified on the Cuticle and in the Venom of the Social Paper Wasp *Polistes dominulus* using MALDI-TOF, MALDI-TOF/ TOF, and ESI-Ion Trap. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17: 376-383.

- vanEngelsdorp D., Underwood R., Caron D., Hayes J. Jr. (2007) – An estimate of managed colony losses in the winter of 2006-2007: a report commissioned by the Apiary Inspectors of America. *American Bee Journal*, 147: 599-603.
- vanEngelsdorp D., Hayes J. Jr., Underwood R. M., Pettis J. (2008) – A Survey of Honey Bee Colony Losses in the U.S., Fall 2007 to Spring 2008. *PLoS ONE*, 3: e4071.
- vanEngelsdorp D., Evans J. D., Saegerman C., Mullin C., Haubruge E., Nguyen B. K., Frazier M., *et al.* (2009) – Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE*, 4: e6481.
- vanEngelsdorp D., Hayes J. Jr., Underwood R. M., Pettis J. S. (2010) – A survey of honey bee colony losses in the US, fall 2008 to spring 2009. *Journal of Apicultural Research*, 49: 7-14.
- Wallner K. (1999) – Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie*, 30: 235-248.
- Winston M. L. (1987) – The biology of the honey bee. Harvard University Press, Cambridge (Massachusetts), London (England), pp. 281.
- Xi Z., Ramirez J. L., Dimopoulos G. (2008) – The *Aedes aegypti* Toll Pathway Controls Dengue Virus Infection. *PLoS Pathogens*, 4: e1000098.
- 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.
- Yang X., Cox-Foster D. (2007) – Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. *Parasitology*, 134: 405-412.
- Yue C., Genersch E. (2005) – RT-PCR analysis of *Deformed wing virus* in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology*, 86: 3419-3424.
- Yue C., Schroder M., Gisder S., Genersch E. (2007) – Vertical-transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of General Virology*, 88: 2329-2336.
- Zhang Y., Liu X., Zhang W., Han R. (2010) – Differential gene expression of the honey bees *Apis mellifera* and *A. cerana* induced by *Varroa destructor* infection. *Journal of Insect Physiology*, 56: 1207-1218.



## APPENDICE

### *Comunicazioni scientifiche risultanti dalla presente ricerca*

### *Allegato 1*

Nazzi F., Brown S. P., Annoscia D., Del Piccolo F., Di Prisco G., Varricchio P., Della Vedova G., Cattonaro F., Caprio E., Pennacchio F. (2011) – Interazioni sinergistiche tra parassiti e patogeni e collasso delle colonie d'api. Atti del XXIII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Genova, 13-16 Giugno 2011, p. 81.

*Sessione III - Insetti sociali ed Apidologia. Presentazioni orali*

#### **INTERAZIONI SINERGICHE TRA PARASSITI E PATOGENI E COLLASSO DELLE COLONIE D'API\***

**F. Nazzi<sup>1</sup>, S. P. Brown<sup>2</sup>, D. Annoscia<sup>1</sup>, F. Del Piccolo<sup>1</sup>, G. Di Prisco<sup>3</sup>, P. Varricchio<sup>3</sup>, G. Della Vedova<sup>1</sup>, F. Cattonaro<sup>4</sup>, E. Caprio<sup>3</sup> & F. Pennacchio<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università degli Studi di Udine, Via delle Scienze 208, 33100 Udine E-mail: francesco.nazzi@uniud.it

<sup>2</sup>Centre for Immunity, Infection and Evolution, School of Biological Sciences, University of Edinburgh, West Mains Road, Edinburgh EH9 3JT, Regno Unito

<sup>3</sup>Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria "Filippo Silvestri", Università degli Studi di Napoli "Federico II", Via Università 100, 80055 Portici (NA)

<sup>4</sup>Istituto di Genomica Applicata, Parco Scientifico e Tecnologico Luigi Danieli, Via J. Linussio 51, 33100 Udine

I recenti fenomeni di morie di api, registrati anche in Italia, rappresentano una concreta minaccia per l'apicoltura e più in generale per le produzioni agricole. Vari autori hanno ipotizzato che tali fenomeni derivino dalle interazioni fra patogeni e altri fattori di stress, come parassiti.

Per chiarire questo aspetto è stato svolto uno studio su alveari in cui il collasso è stato indotto dall'infestazione progressiva da parte dell'acaro parassita *Varroa destructor* Anderson & Trueman. Allo scopo sono stati installati, in una località isolata delle Prealpi friulane (Porzus), due apiari, uno trattato con i metodi acaricidi convenzionali, l'altro non trattato. Le colonie sono state seguite per tutta la stagione eseguendo periodicamente osservazioni sulla consistenza della famiglia, l'infestazione della stessa, la mortalità delle api, la prevalenza dei principali patogeni delle api. Parallelamente sono state svolte indagini di laboratorio volte a confermare gli effetti osservati in campo, oltre ad indagini trascrittomiche aventi per oggetto i geni della difesa immunitaria dell'ape.

È stato così possibile accertare che, nelle condizioni della prova, il collasso della colonia è determinato da una netta impennata della mortalità delle api che si registra all'inizio dell'autunno in concomitanza con l'aumento del numero di copie genomiche del virus delle ali deformi (DWV); contemporaneamente si registrano anche gravi effetti a carico dell'espressione dei geni del sistema immunitario dell'ape.

Nel complesso, i risultati suggeriscono che la varroa eserciti un effetto sinergico nei confronti del DWV, provocando, tramite l'influsso sulle difese immunitarie dell'ape, la transizione da innocue infezioni latenti a disastrose esplosioni virali.

**Parole chiave:** *Apis mellifera*, DWV, *Varroa destructor*.

\*Ricerca effettuata nell'ambito del progetto "Apenet: monitoraggio e ricerca in apicoltura", finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali.

## Allegato 2

Di Prisco G., Nazzi F., Annoscia D., Del Piccolo F., Varricchio P., Della Vedova G., Cattonaro F., Caprio E., Pennacchio F. (2011) – Synergistic parasite-pathogen interactions and honeybee colony collapse. Proceedings of 2<sup>nd</sup> Annual Meeting of the European PhD Network in “Insect Science”, Tours (France), 7<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> November 2011, p. 62.

### European PhD Network « Insect Science »

#### Session 4: Insect Interactions

Wednesday 9<sup>th</sup> November, 11:15-11:30

#### **Synergistic parasite-pathogen interactions and honeybee colony collapse**

**GENNARO DI PRISCO<sup>(1)</sup>, FRANCESCO NAZZI<sup>(2)</sup>, DESIDERATO ANNOSCIA<sup>(2)</sup>, FABIO DEL PICCOLO<sup>(2)</sup>, PAOLO VARRICCHIO<sup>(1)</sup>, GIORGIO DELLA VEDOVA<sup>(2)</sup>, FEDERICA CATTONARO<sup>(3)</sup>, EMILIO CAPRIO<sup>(1)</sup> AND FRANCESCO PENNACCHIO<sup>(1)</sup>**

*(1) Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria “Filippo Silvestri”, Università degli Studi di Napoli “Federico II”, Portici (Napoli), ITALY*

*(2) Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università degli Studi di Udine, Udine, ITALY*

*(3) Istituto di Genomica Applicata, Parco Scientifico e Tecnologico Luigi Danieli, Udine, ITALY  
gennaro.diprisco@unina.it*

*Varroa destructor* represents the most important parasite of the honeybee, but its role in recent widespread collapses of bee colonies is still disputed. Several studies aiming at identifying possible causes of colony collapse have been carried out recently, but their results are rather fragmentary and do not allow to establish a direct link with a unique causal agent. To better understand the role of varroa mite, we carried out a study from population to molecular level.

At the colony level mite infestation caused a fatal decline in the bee population that is correlated to increasing bee mortality. Parallel lab studies indicated that this is caused both by the direct action of the mite and its role in vectoring and activating covert viral infections. This is triggered by a complex immunosuppressive syndrome, which has been characterized at molecular level.

Overall, this study combines molecular, field-longitudinal and theoretical approaches to provide a mechanistic account for the multifactorial origin of honeybee losses.

### *Allegato 3*

Nazzi F., Brown S. P., Annoscia D., Del Piccolo F., Di Prisco G., Varricchio P., Della Vedova G., Cattonaro F., Caprio E., Pennacchio F. – Synergistic Parasite-Pathogen Interactions Mediated by Host Immunity Can Drive the Collapse of Honeybee Colonies. Inviato a PLoS Pathogens.

#### **Synergistic Parasite-Pathogen Interactions Mediated by Host Immunity Can Drive the Collapse of Honeybee Colonies**

Francesco Nazzi<sup>1</sup>, Sam P. Brown<sup>2</sup>, Desiderato Annoscia<sup>1</sup>, Fabio Del Piccolo<sup>1</sup>, Gennaro Di Prisco<sup>3</sup>, Paola Varricchio<sup>3</sup>, Giorgio Della Vedova<sup>1</sup>, Federica Cattonaro<sup>4</sup>, Emilio Caprio<sup>3</sup>, Francesco Pennacchio<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università degli Studi di Udine, Udine, Italy

<sup>2</sup> Centre for Immunity, Infection and Evolution, School of Biological Sciences, University of Edinburgh, Edinburgh, UK

<sup>3</sup> Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria “Filippo Silvestri”, Università degli Studi di Napoli “Federico II”, Portici (Napoli), Italy

<sup>4</sup> Istituto di Genomica Applicata, Parco Scientifico e Tecnologico Luigi Danieli, Udine, Italy

#### **Abstract**

The health of the honeybee and, indirectly, global crop production are threatened by several biotic and abiotic factors, which play a poorly defined role in the induction of widespread colony losses. Recent descriptive studies suggest that colony collapse is related to an interaction between pathogens and other stress factors including parasites.

We combined molecular, field-longitudinal and theoretical approaches to describe the mechanistic basis and dynamical properties of collapse-causing interactions. We found that the parasitic mite *Varroa destructor* can de-stabilise the within-host dynamics of Deformed wing virus (DWV), transforming a cryptic and vertically transmitted virus into a rapidly replicating killer. The de-stabilisation of DWV results from a widespread immunosuppression characterized by a strong downregulation of the transcription factor NF- $\kappa$ B. The centrality of NF- $\kappa$ B to host responses to a range of environmental challenges suggests that this transcription factor acts as a common currency underlying colony collapse that may be triggered by different causes.

This study provides a mechanistic account for the multifactorial origin of honeybee losses and offers a new framework for assessing, and possibly mitigating, the impact of environmental challenges on honeybee health.

*Allegato 4*

Annoscia D., Del Piccolo F., Nazzi F. – What kills a parasitized honeybee? Cuticular modifications induced by *Varroa destructor* and their effect on *Apis mellifera* survival. In preparazione.

**What kills a parasitized honeybee?**

**Cuticular modifications induced by *Varroa destructor* and their effect on *Apis mellifera* survival**

Desiderato Annoscia, Fabio Del Piccolo, Francesco Nazzi

Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali

Università degli Studi di Udine

Via delle Scienze 208

33100 Udine, Italy

**Abstract**

Several factors threaten the health of honeybees; among them the parasitic mite *Varroa destructor* and the Deformed Wing Virus play a major role. Recently, the dangerous interplay between the mite and the virus was studied in detail and the transition, triggered by mite feeding, from a benign covert infection to a devastating viral outbreak, characterized by an intense viral replication, was described. In this study we deal with the events preceding that crucial transition; in particular, we carried out standardized lab experiments to study the effects of the parasitization in asymptomatic bees to establish a relationship between such effects and bee mortality. It appears that parasitization alters the cuticle of infested bees and consequently the capacity of the honeybee to regulate water exchange; this in turn have severe effects on bee survival.

These results are discussed in light of possible novel strategies aiming at mitigating the impact of the parasite on honeybee health.