

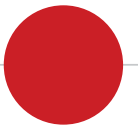
# Biologia molecolare in apicoltura

**Anna Granato**

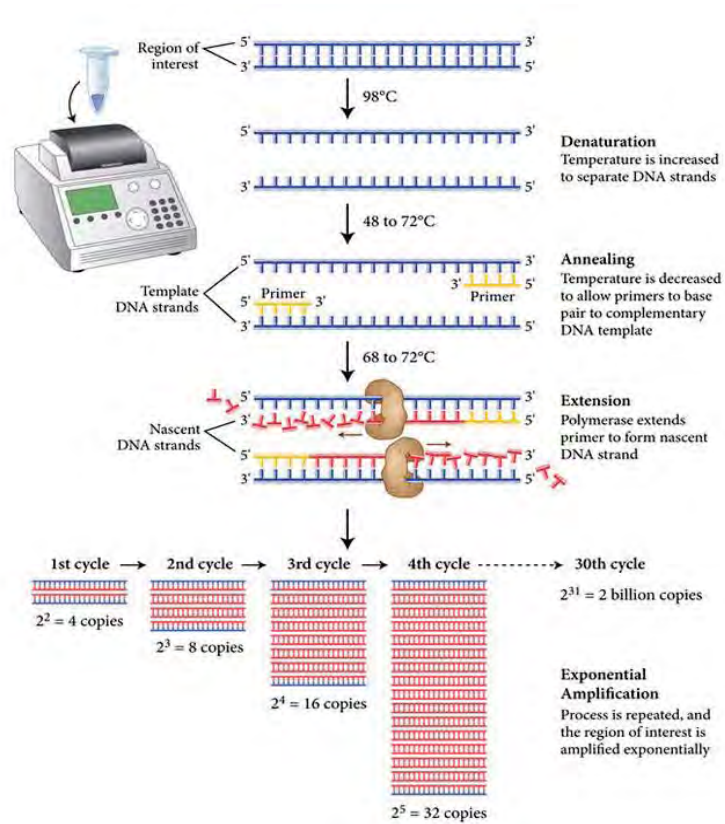
*SCS3 Diagnostica specialistica, istopatologia e parassitologia*

---

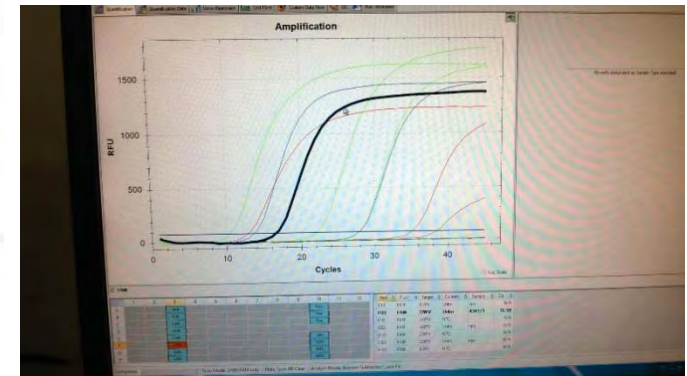
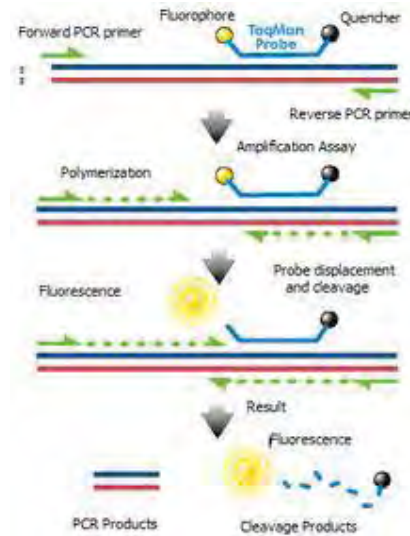
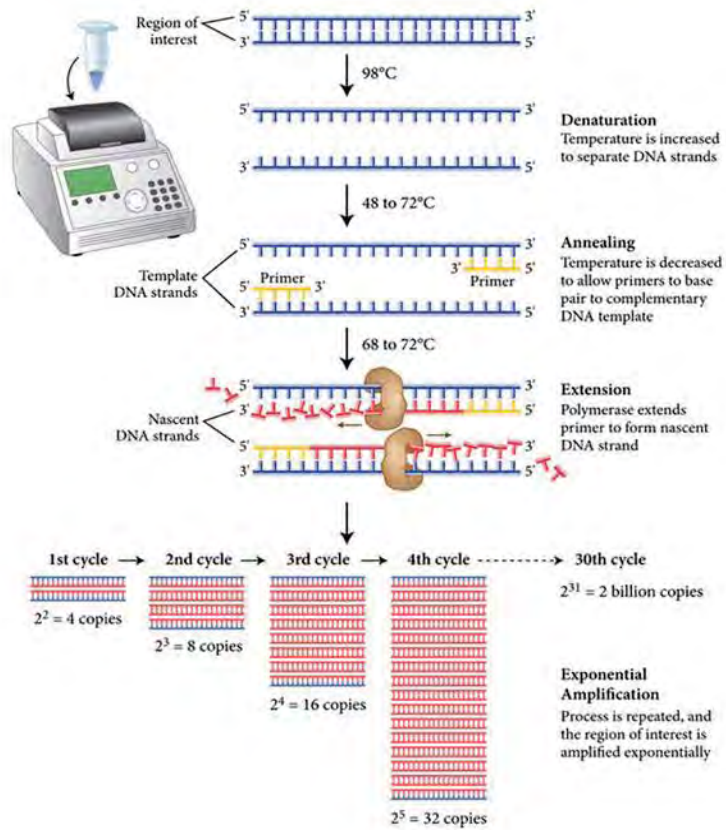
Biologia molecolare in apicoltura – Centro di referenza nazionale per l'Apicoltura



# Polymerase chain reaction (PCR) = reazione a catena della polimerasi



# Real time PCR



# Sequenziamento

**Determinare l'esatto ordine dei nucleotidi (A,C,T,G) di un frammento di DNA/RNA**

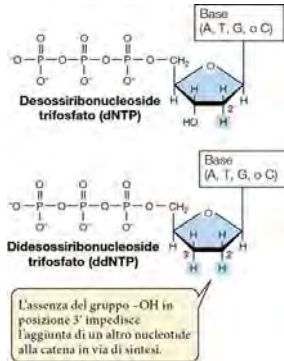
- Metodo tradizionale (Sanger)
- Next Generation Sequencing

Le informazioni che possiamo ricavare permettono, per esempio, di:

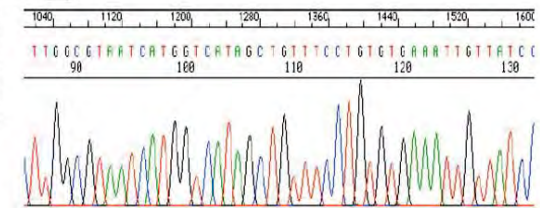
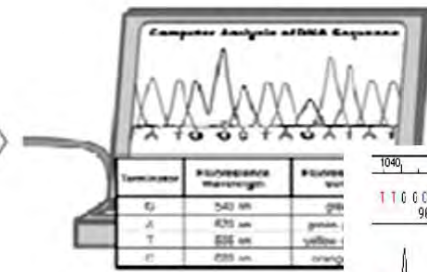
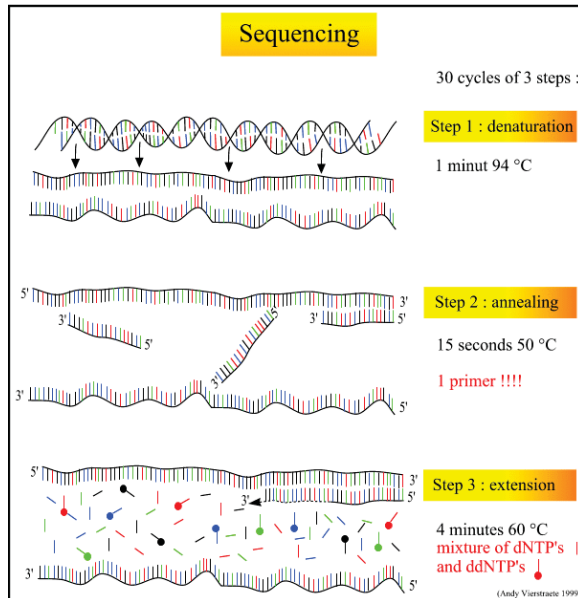
- comparare il genoma di diversi ceppi batterici/virali
- comprendere come un agente patogeno si espande
- identificare nuovi genotipi
- identificare nuovi patogeni

# Sequenziamento

## Metodo di Sanger



I frammenti che emergono dall'estremità del capillare passano attraverso un laser che eccita i marcatori fluorescenti legati ai ddNTP presenti all'estremità di ciascun amplicone. La fluorescenza viene rilevata da una fotocellula e mostrata dal computer sottoforma di un picco di colore diverso a seconda della lunghezza d'onda emessa dal marcatore.



# Malattie delle api

**Funghi:** *Nosema spp*, *Ascosphaera apis*

**Virus:** sono almeno 26 i virus descritti in *Apis mellifera*.

Nell'attività diagnostica i più ricercati sono:

- Virus delle ali deformi (DWV)
- Virus della paralisi acuta (ABPV)
- Virus della paralisi cronica (CBPV)

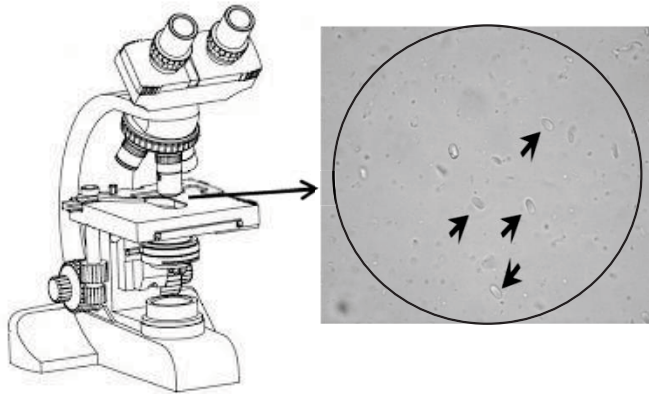
a cui seguono:

- Virus della covata a sacco (SBV)
- Virus della cella reale nera (BQCV)
- Kashmir virus (KBV)
- Virus israeliano della paralisi acuta (IAPV)

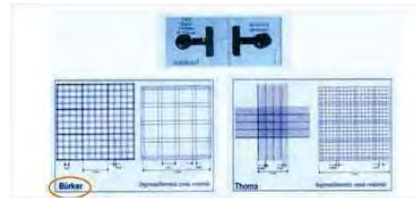
**Batteri:** *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*

Virus	EU distribution
Acute Bee Paralysis Virus (ABPV)	+
Kashmir Bee Virus (KBV)	+
Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV)	+
Black Queen Cell Virus (BQCV)	+
Deformed Wing Virus (DWV)	+
Varroa destructor Virus 1 (VDV-1)	+
Sacbrood Virus (SBV)	+
Slow Bee Paralysis Virus (SBPV)	+
Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV)	+
Cloudy Wing Virus (CWV)	+
Bee Virus X (BVX)	+
Bee Virus Y (BVY)	+
Arkansas Bee Virus (ABV)	?
Berkeley Bee Virus (BBPV)	?
Macula-like Virus (MLV)	+
Filamentous Virus (AmFv)	+
Apis Iridescent Virus (AIV)	?
Aphid Lethal Paralysis virus (ALPV)	?
Big Sioux River virus (BSRV)	?
Lake Sinai Virus 1 (LSV1)	?
Lake Sinai Virus 2 (LSV2)	?
Egypt Bee Virus	?
Kakugo Virus	?
Moku virus	?

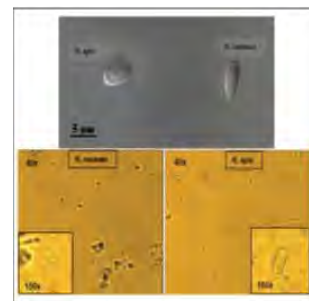
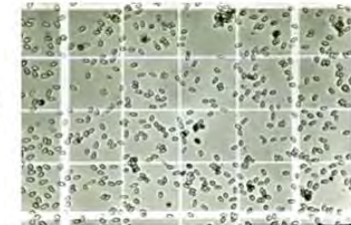
# Nosemiasi – *Nosema apis*/*Nosema ceranae*



= presenza spore *Nosema* spp



= spore *Nosema* spp/ape

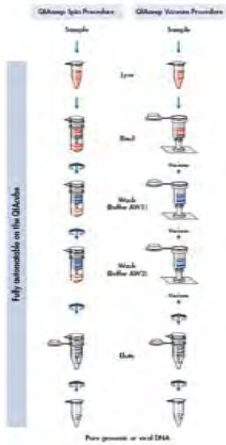


= PCR per identificazione specie  
*Nosema apis*/*Nosema ceranae*

# Nosema apis/Nosema ceranae

GENE TARGET: subunità ribosomiale 16S.  
*N. apis*: 321 bp  
*N. ceranae*: 218-219 bp

## Estrazione del DNA



Quantificazione spettrofotometrica



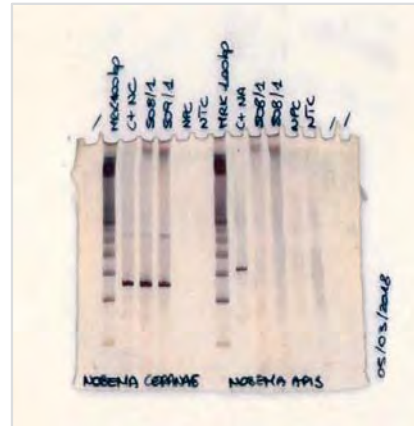
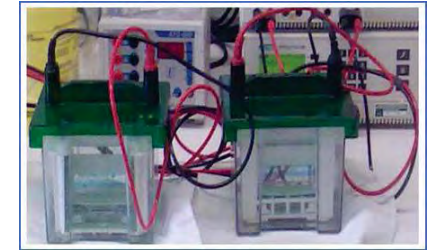
Preparazione master mix



Amplificazione



Elettroforesi e silver staining



Risultato finale



# *Paenibacillus larvae* e *Melissococcus plutonius*

*Paenibacillus larvae* responsabile peste americana

Gene target: subunità ribosomiale 16S

Dimensione prodotto di amplificazione: 1106 bp

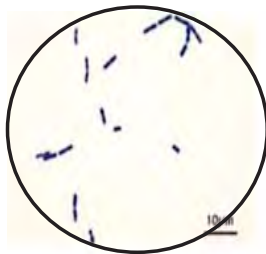
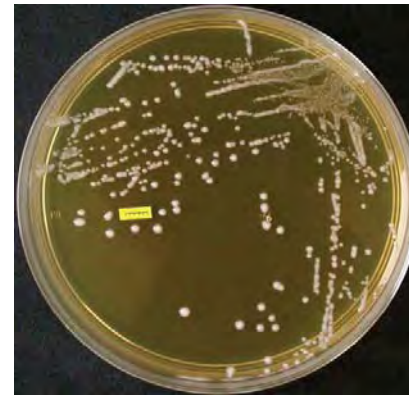
*Melissococcus plutonius* responsabile peste europea

Gene target: subunità ribosomiale 16S

Dimensione prodotto di amplificazione: 831 bp



Fig.4: Characteristic colony morphology of *P. larvae* cultivated on Columbia sheep blood agar plates: (a) Reference strain ATCC 9545 (ERIC II) and (b) Strain PL SAG m290 (ERIC II). Photos: A.M. Alippi



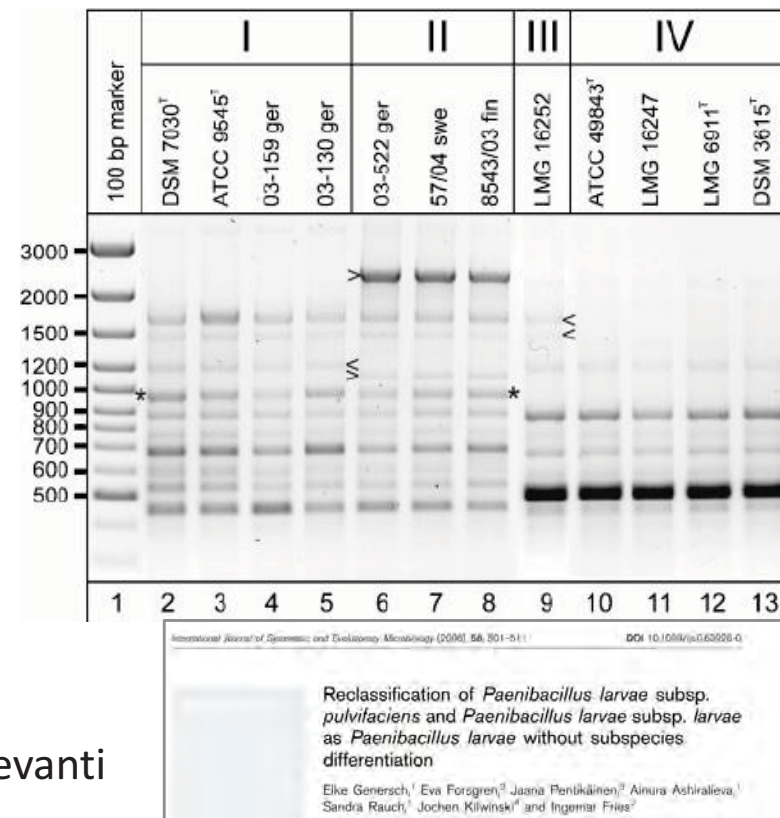
# Genotipizzazione di *Paenibacillus larvae*

L'amplificazione di elementi ripetitivi casualmente dispersi nel genoma dei batteri permette di differenziare i 4 diversi genotipi

Genotipo ERIC I è il genotipo più frequente ed è la causa probabilmente della maggior parte dei focolai nel mondo

Genotipo ERIC II sembrava essere limitato all'Europa, ma recentemente rilevato anche in Canada, Nuova Zelanda, Arabia e paesi asiatici

Genotipi ERIC III e IV isolati molto raramente e pertanto poco rilevanti





## Genotipizzazione *Paenibacillus larvae*

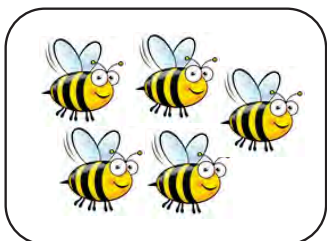
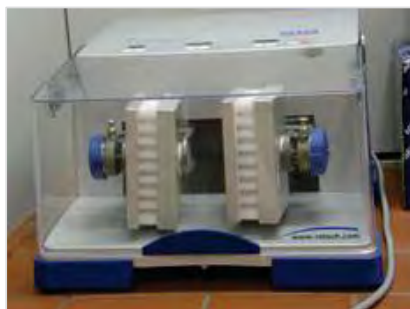
La possibilità di poter **discriminare** i diversi **ceppi di *Paenibacillus larvae*** è essenziale per lo **studio dell'epidemiologia** della peste americana

Consente di:

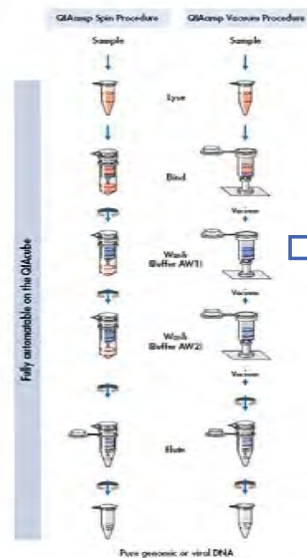
- identificare i focolai della malattia
- determinare la relazione tra focolai
- riconoscere ceppi più virulenti
- monitorare le strategie di prevenzione e trattamento

# Virus delle api - DWV, ABPV e CBPV

## Omogenizzazione



## Estrazione dell'RNA



## Quantificazione spettrofotometrica



## Preparazione master mix



## Amplificazione



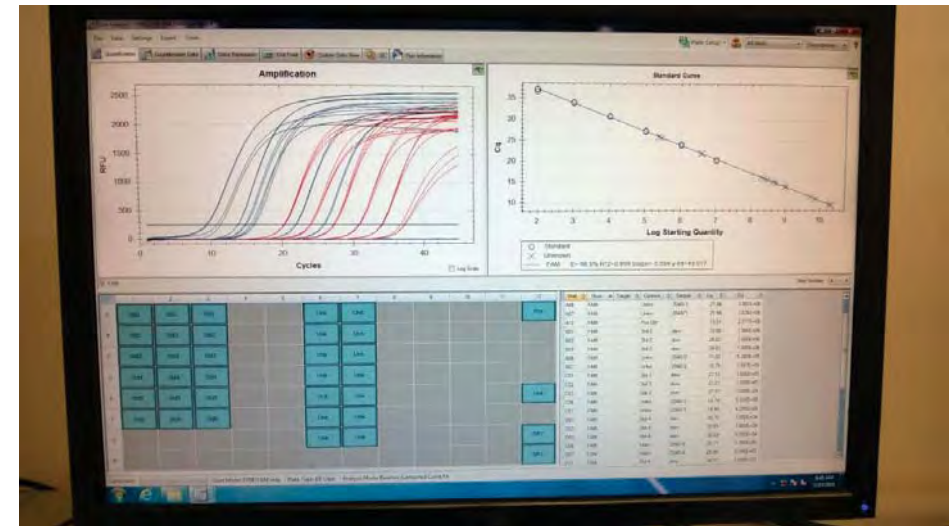
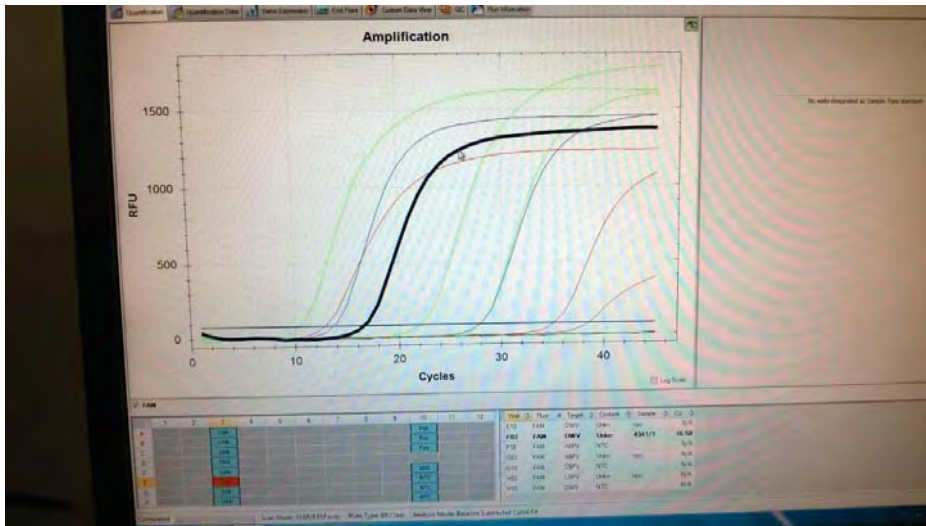
# Virus delle api - DWV, ABPV e CBPV

## GENE TARGET

**DWV:** gene DWgp1 che codifica per una poliproteina.

**ABPV:** regione non codificante che precede il gene ABPVgp1

**CBPV:** gene denominato RdRP ORF 3 che codifica per una presunta RNA polimerasi RNA dipendente



Rilevazione virus



Quantificazione virus



# Virus delle api - DWV, ABPV e CBPV



Nel **72%** dei 79 campioni **identificato almeno un principio attivo**

59,4% insetticidi (neonicotinoidi 41,8%, seguito da fungicidi 40,6%)

**Infezioni virali multiple** ad eccezione di un campione, positivo solo per CBPV

Alta prevalenza di CBPV e DWV

71% positivi CBPV e 37% positivi DWV presentavano un numero elevato di copie virali per ape ( $> 10^7$ )

**Possibile relazione tra mortalità primaverile nelle api e trattamenti antiparassitari.  
Virus potrebbero esacerbare in modo sinergico l'impatto negativo dei pesticidi sulla salute delle api, mettendo in pericolo la sopravvivenza delle colonie.**

## *Aethina tumida*



- **Coleottero che infesta gli alveari, esotico nell'Unione europea, in grado di determinare **notevoli danni**, dalla distruzione dei favi alla fermentazione del miele e al collasso della colonia.**
- 11 settembre 2014 confermato **il primo accertamento in Italia** di *Aethina tumida* nel comune di Gioia Tauro, in **provincia di Reggio Calabria**
- 7 novembre 2014 confermato il primo caso di *Aethina tumida* **in Sicilia**, in provincia di Siracusa.
- 20 giugno 2019, quasi 5 anni dalla prima ed unica segnalazione della presenza di *Aethina tumida* nella regione Sicilia, un apiario è risultato positivo nel comune di Lentini, sempre in provincia di Siracusa

# Aethina tumida

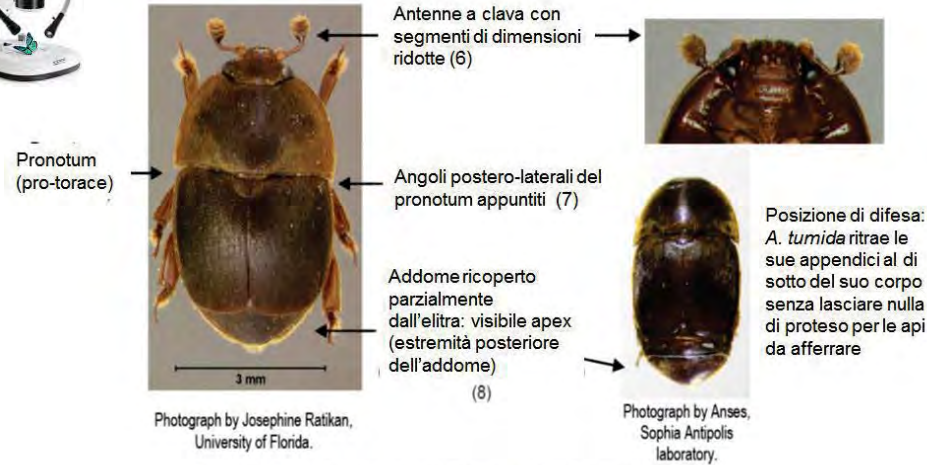


Figura 2. Piccolo coleottero dell'alveare, *Aethina tumida* Murray

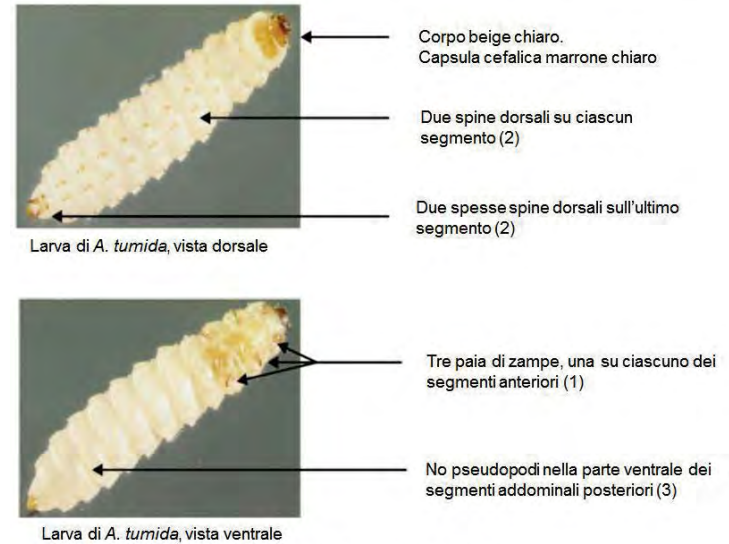


Figura 5. Larva di *Aethina tumida*  
Photographs by Josephine Ratikan, University of Florida.

## Analisi di conferma



## Analisi di conferma





## *Aethina tumida*

Quando l'applicazione della biologia molecolare nella diagnosi di *Aethina tumida*

- ✓ Confermare l'identificazione di specie
- ✓ Identificazione della specie a partire da campioni danneggiati, morfologicamente non classificabili, ecc.



...Ma anche per

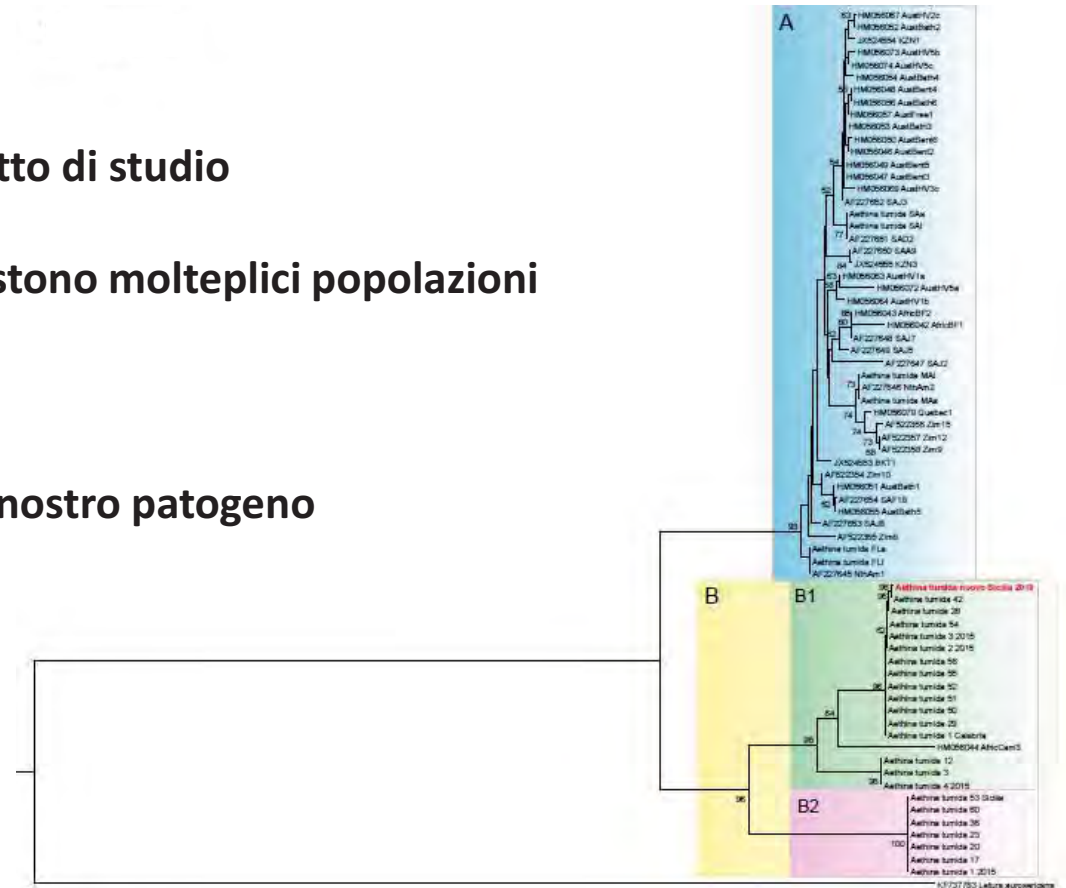
- ✓ Studi di filogenesi e di caratterizzazione genetica di una popolazione



# *Aethina tumida*

## Analisi filogenetica

- ✓ Qual è l'origine del patogeno oggetto di studio
- ✓ Se circola un unico patogeno o esistono molteplici popolazioni
- ✓ Come evolve il nostro patogeno
- ✓ Quali sono i parenti più stretti del nostro patogeno



# Aethina tumida

Apidologie (2017) 48:194–203  
 © INRA, DIB and Springer-Verlag France, 2016  
 DOI: 10.1007/s13592-016-0465-3

Original article

## Introduction of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) in the regions of Calabria and Sicily (southern Italy)

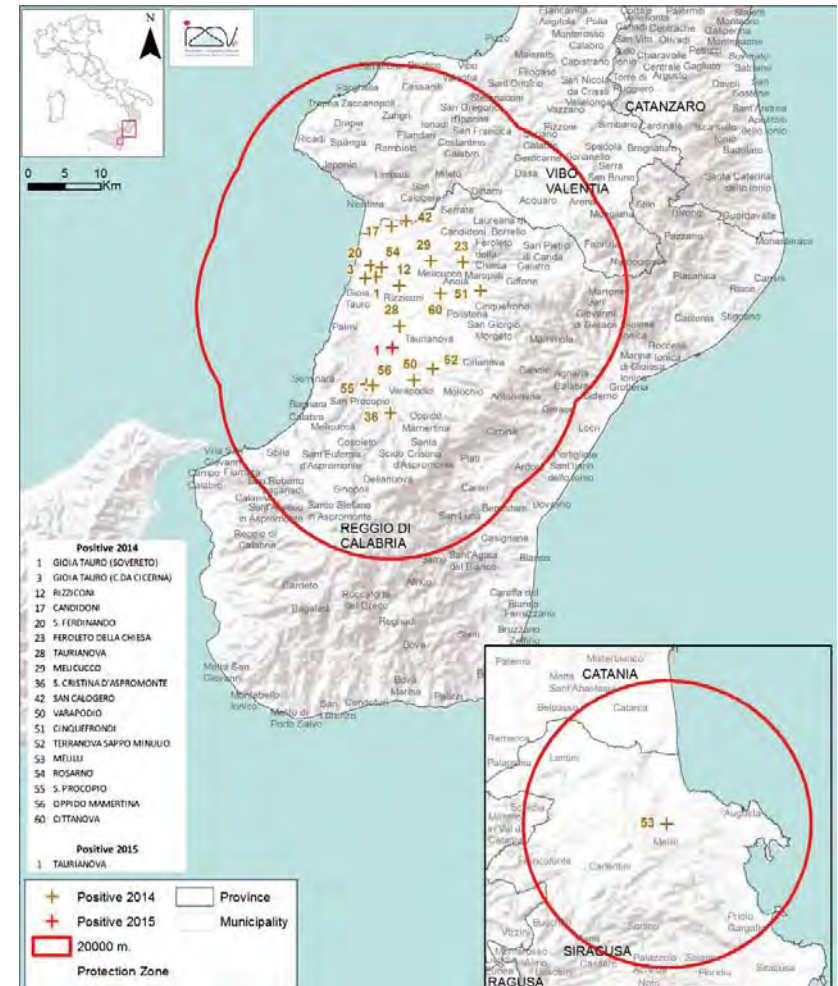
Anna GRANATO<sup>1</sup>, Bianca ZECCHIN<sup>1</sup>, Chiara BARATTO<sup>1</sup>, Véronique DUQUESNE<sup>2</sup>, Enrico NEGRISOLO<sup>3</sup>, Marie-Pierre CHAUZAT<sup>2,4</sup>, Magali RIBIÈRE-CHABERT<sup>2</sup>, Giovanni CATTOLI<sup>1</sup>, Franco MUTINELLI<sup>1</sup>

### 2014

18 adulti di *A. tumida* da 16 differenti siti della Calabria e 1 adulto dell'unico sito positivo della Sicilia

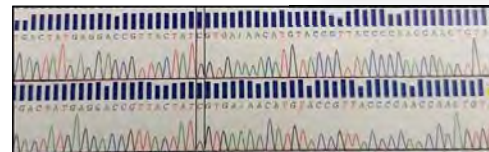
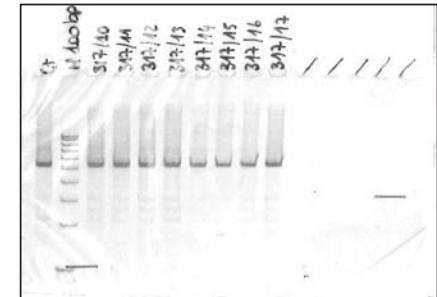
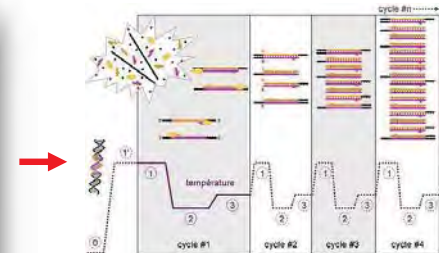
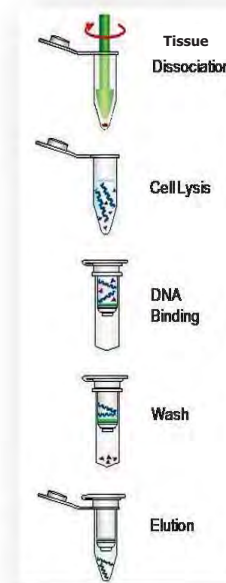
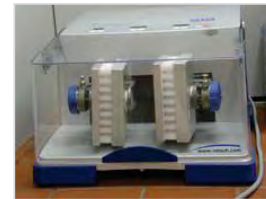
### 2015

1 larva e 3 adulti di *A. tumida* del primo rilevamento del 2015 in Calabria.



# *Aethina tumida*

- Campione: coleottero, larva, pupa
- Omogeneizzazione del campione
- Estrazione DNA
- Amplificazione
- Elettroforesi
- Sequenziamento



# Aethina tumida

- ✓ L'analisi filogenetica identifica due gruppi principali di *A. tumida*: A e B

Gruppo A: campioni dal Nord America, dall'Australia e Sud Africa

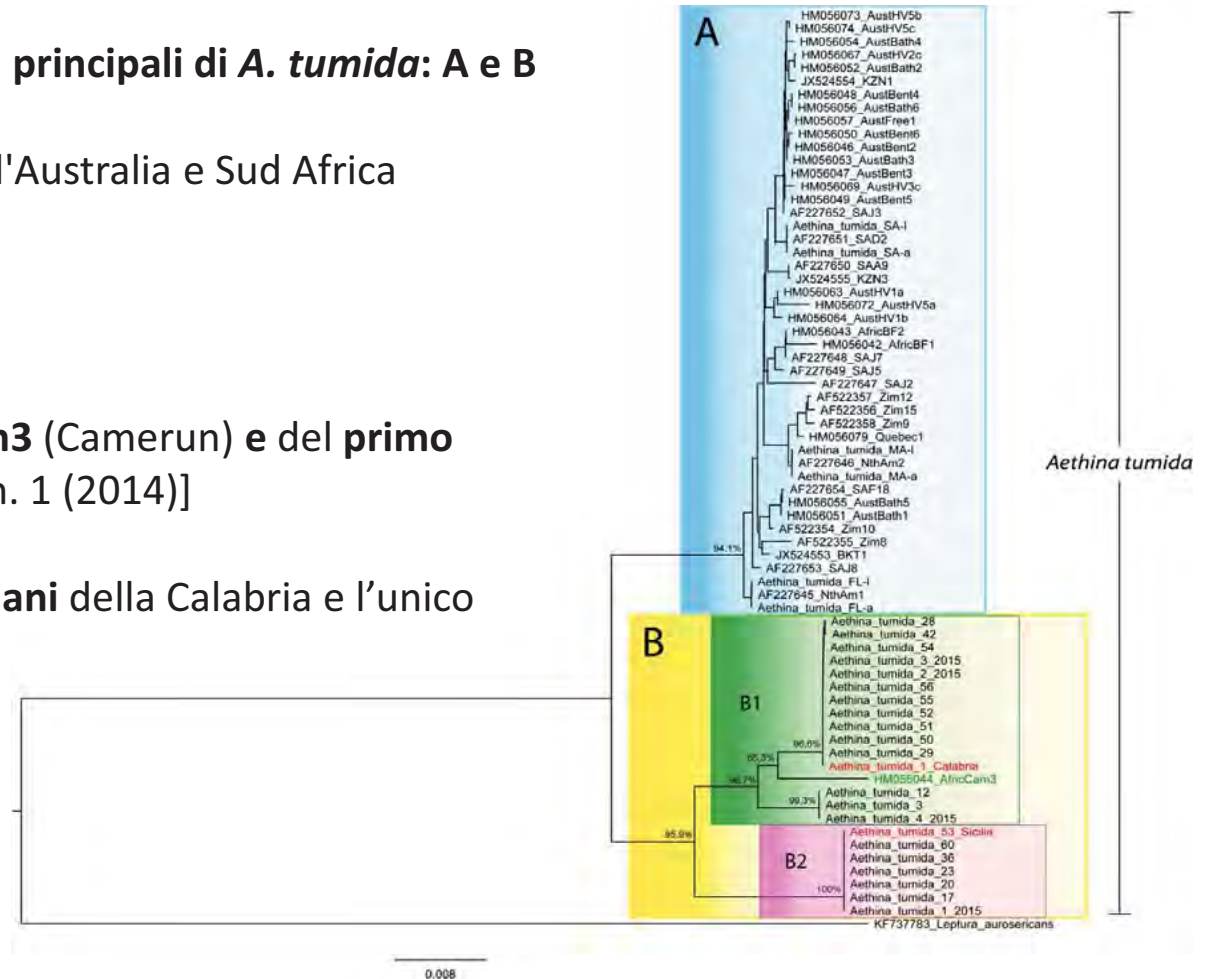
Gruppo B: tutti i campioni italiani

- ✓ Gruppo B: diviso in B1 e B2

Il gruppo **B1** contiene: **sequenza AfricCam3** (Camerun) e del **primo campione** identificato in **Italia** [Calabria, n. 1 (2014)]

Il gruppo **B2** comprende: **6 esemplari italiani** della Calabria e l'unico della Sicilia

**I campioni italiani di *A. tumida* sono originari del Camerun (Africa)**



## *Aethina tumida*

L'analisi filogenetica suggerisce una sola introduzione di AT nel sud Italia, ma la suddivisione dei campioni italiani in due diversi i cluster B1 e B2 potrebbe anche suggerire due introduzioni separate.

**1<sup>A</sup> ipotesi: primo rilevamento a seguito di una o due introduzioni separate (gruppi B1 e B2) nella stessa regione.** Arriva in Sicilia per trasferimento dell'apiario dalla zona infestata della Calabria nella sua zona d'origine

**2<sup>A</sup> ipotesi: due distinte introduzione di AT nelle regioni Calabria e la Sicilia seguite da un'ulteriore introduzione in Calabria**

**3<sup>A</sup> ipotesi: introduzioni indipendenti in entrambe le regioni**

**Introduzione in Calabria seguita dalla sua migrazione mediata dall'uomo in Sicilia, corroborata da mancanza di rilevamento di AT in Sicilia fino al Novembre 2014**

# Aethina tumida

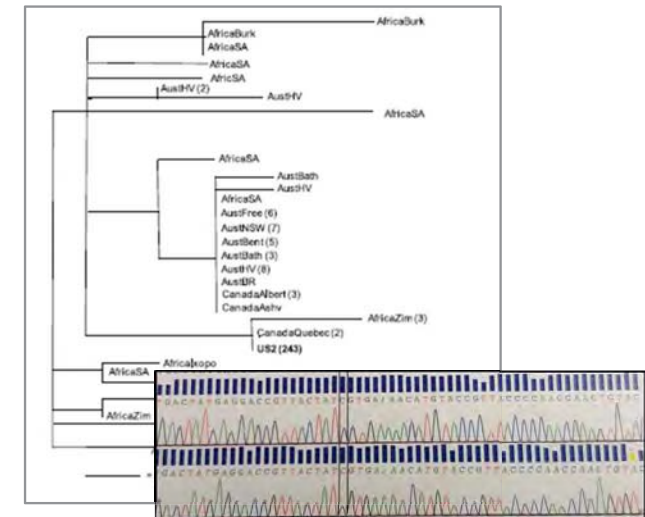
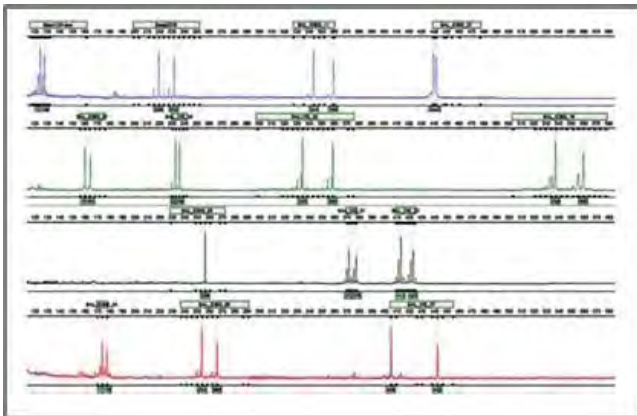
Characterization of microsatellite loci for the Italian small hive beetle, *Aethina tumida*

Analisi filogenetica di alcuni geni mitocondriali della popolazione italiana di *Aethina tumida*

138 campioni AT da 27 differenti siti della Calabria e 1 adulto dell'unico sito positivo della Sicilia (2014 – 2018)

17 campioni americani da 10 diversi siti tra Canada (Ontario), Stati Uniti (Massachusetts, Florida) e Messico

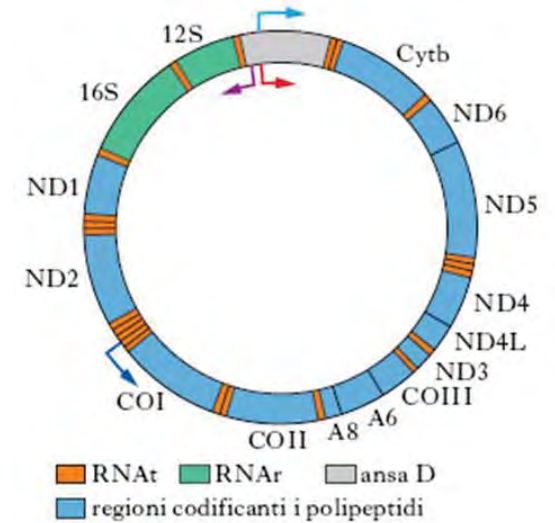
2 campioni del Sud-Africa



# Aethina tumida

Italy (n=117)						North America (n=19)					South Africa (n=2)				
Locus	Allele size (bp)	N <sub>A</sub>	H <sub>O</sub>	uH <sub>E</sub>	PIC	Allele size (bp)	N <sub>A</sub>	H <sub>O</sub>	uH <sub>E</sub>	PIC	Allele size (bp)	N <sub>A</sub>	H <sub>O</sub>	uH <sub>E</sub>	PIC
Atum 05	208	1	-	-	-	208	1	-	-	-	208	1	-	-	-
Atum 20	300-304	3	0.24	0.52	0.51	298-304	2	-	0.44	0.43	298-304	2	0.50	0.50	0.38
Atum B14	107-119	7	0.44	0.78	0.78	117-131	4	0.16	0.24	0.24	131-133	2	0.50	0.50	0.38
Atum B89	108-116	5	0.62	0.64	0.64	114-116	2	0.16	0.51	0.49	114	1	-	-	-
Atum B83	97	1	-	-	-	99	1	-	-	-	99	1	-	-	-
Atum 25	232	1	-	-	-	248-254	3	0.12	0.22	0.21	252-254	2	0.50	0.50	0.38
Atum B92	126-134	4	0.07	0.21	0.21	134	1	-	-	-	132	1	-	-	-
Atum B26	251-285	11	0.71	0.75	0.75	263-275	3	0.14	0.58	0.56	263-277	3	1.00	0.83	0.63
Atum 01	104-120	6	0.79	0.79	0.78	104-108	4	0.16	0.61	0.59	106-108	2	0.50	0.50	0.38
Atum B35	210-222	6	0.28	0.43	0.42	222-226	3	-	0.70	0.66	224	1	-	-	-
Atum 10	302-318	6	0.09	0.71	0.71	300-320	5	0.09	0.69	0.66	310-314	2	0.50	0.50	0.38
<b>Mean</b>		<b>4.6</b>	<b>0.29</b>	<b>0.44</b>			<b>2.6</b>	<b>0.08</b>	<b>0.36</b>			<b>1.6</b>	<b>0.32</b>	<b>0.30</b>	

- ✓ Locus Atum 05: non informativo
- ✓ Loci Atum B83 e Atum 25: no informativi per nella popolazione italiana, ma discriminate popolazioni
- ✓ la popolazione americana condivide molti alleli con campioni sudafricani
- ✓ Atum 20, Aum B14, Atum 25, Atum B92, Atum B35 utili per discriminare esemplari italiani da quelli sudafricani-americani





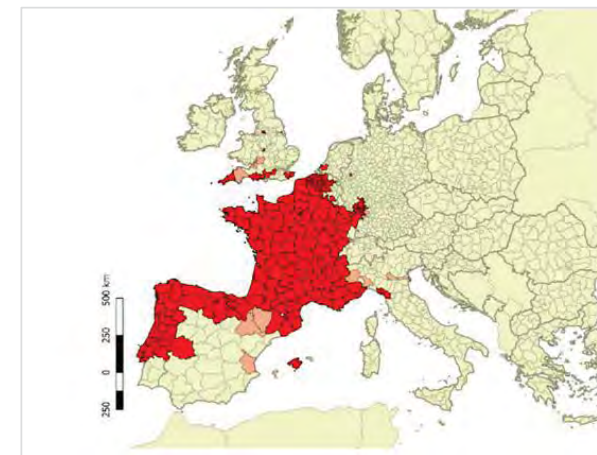
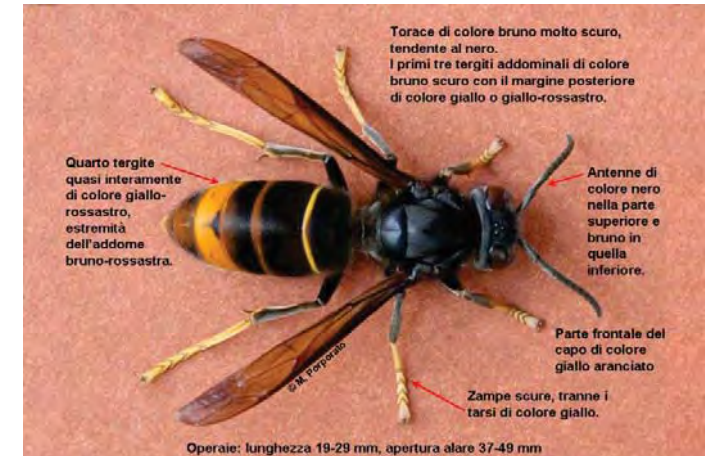
## *Vespa velutina*

*Vespa velutina* Lepeletier, 1836, detta anche calabrone asiatico, è una vespa predatrice originaria del sud-est asiatico

Segnalata per la prima volta in Europa nel 2004 ad Aquitania (Francia), introdotta con merci di origine cinese

Si è diffusa in pochi anni in tutta la Francia e in altri paesi europei

**La sua presenza in Italia è stata segnalata per la prima volta in Liguria nel 2013**



# *Vespa velutina*

Biol Invasions (2019) 21:2811–2817  
<https://doi.org/10.1007/s10530-019-02051-4>



## INVASION NOTE

### Recent confirmation of a single haplotype in the Italian population of *Vespa velutina*

Anna Granato · Enrico Negrisolò · Jessica Bonomi · Laura Zulian ·  
Federico Cappa · Laura Bortolotti · Franco Mutinelli

**33 campioni di *V. velutina*** raccolti in Italia nel **2012, 2016, 2017** e **2018**:

- **14** da cinque diversi siti della **Liguria** [San Romolo, Sanremo e Badalucco (IM), 2012; Imperia (IM); Ressora (SP) 2018]
- **3** dal **Piemonte** [Vicoforte (CN), 2016]
- **16** da un apiario e da un unico nido rilevato in **Veneto** [Bergantino (RO), 2016 e 2017]

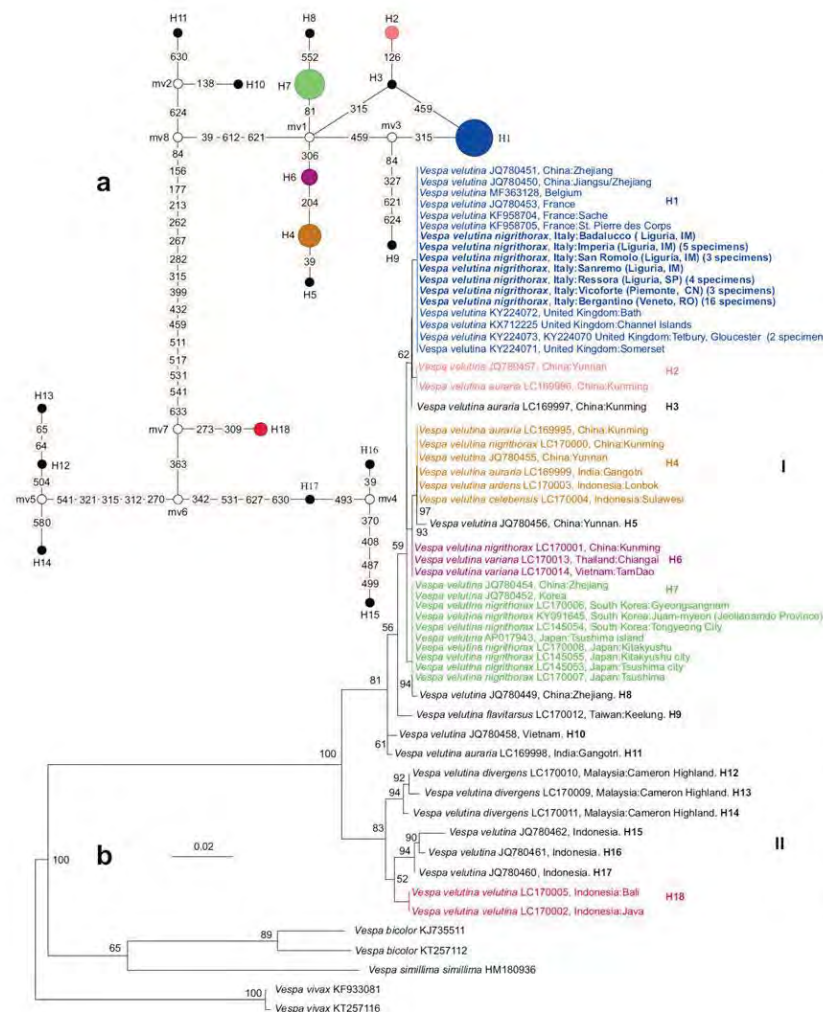
# Vespa velutina

I 33 esemplari italiani mostrano lo stesso aplotipo per *cox1*, identico agli altri esemplari europei finora sequenziati e ai campioni cinesi di Jiangsu e Zhejiang

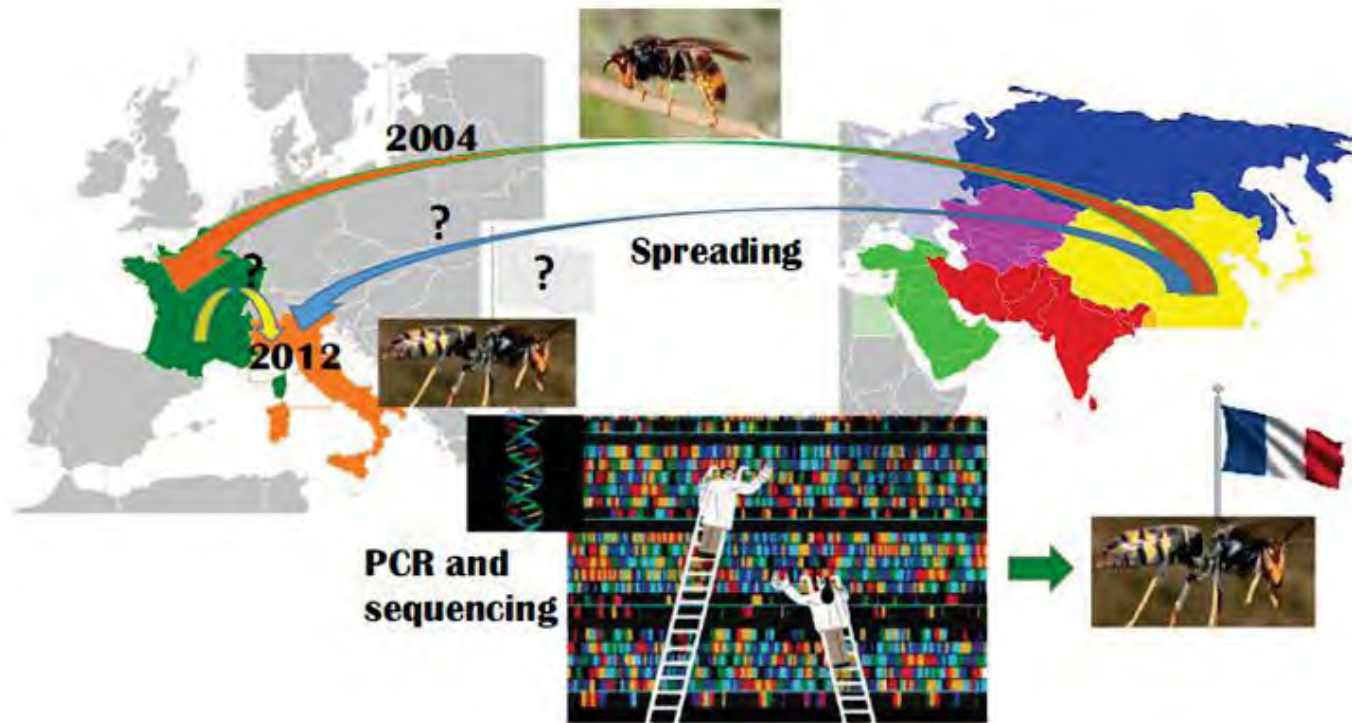
Nell'albero filogenetico, gli aplotipi di *V. velutina* si suddividono in due gruppi maggiori:

- il gruppo I contiene 11 aplotipi
- il gruppo II include i rimanenti 7 aplotipi

Più di 15 sostituzioni separano il gruppo I dal gruppo II



# *Vespa velutina*



I campioni italiani di *V. velutina* provengono dalla diffusione verso sud della popolazione di *V. velutina* inizialmente stabilitasi in Francia e, attualmente, questa stessa popolazione si sta muovendo verso il nord Europa (Belgio, Olanda, Germania e Regno Unito).

## Tripanosomatidi

- ✓ Protozoi parassiti, diffusi in tutto il mondo
- ✓ Sono in grado di infettare, oltre che l'uomo, animali, piante e insetti tra cui le api
- ✓ Nelle api sembrano avere un effetto negativo influenzandone il comportamento, il sistema immunitario e la longevità
- ✓ I tripansonomatidi delle api attualmente riconosciuti sono ***Lotmaria passim*** e ***Crithidia mellificae***
- ✓ *Lotmaria passim* è il più diffuso a livello mondiale in *Apis mellifera* e, in associazione a varroatosi e nosemiasi, sembra coinvolto nei fenomeni di spopolamento e morte degli alveari
- ✓ Ad oggi non sono disponibili dati sulla presenza e diffusione di *L. passim* e *C. mellificae* nella regione Veneto e più generale in Italia

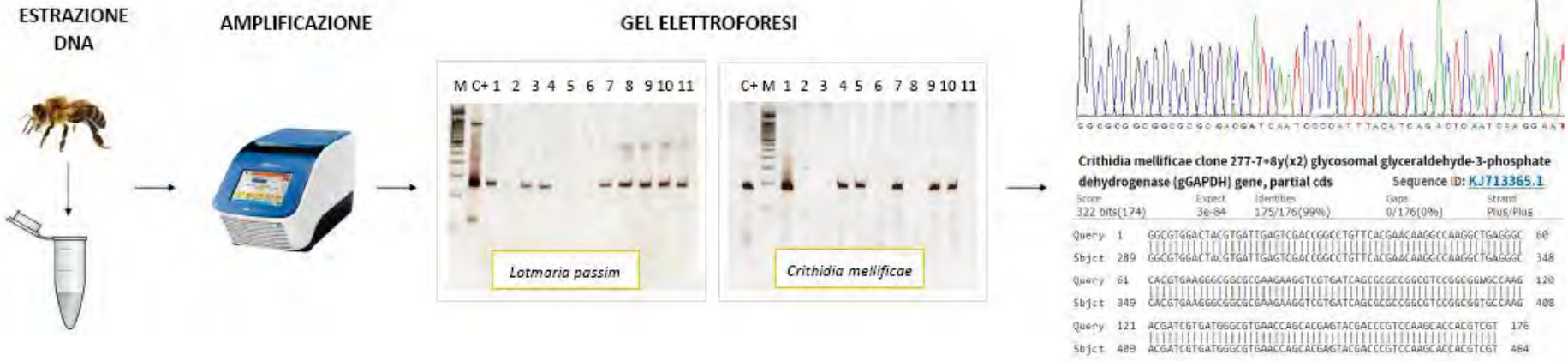


# Lotmaria passim and Crithidia mellifica



Presenza e diffusione di *Lotmaria passim* e *Crithidia mellifica*, nuovi patogeni emergenti delle api, in Italia: risultati di uno studio preliminare su campioni di archivio RC IZS LT 07/18

214 campioni di DNA d'archivio di campioni di api, conferiti all'IZSve dal 2013 al 2019, da 12 regioni italiane



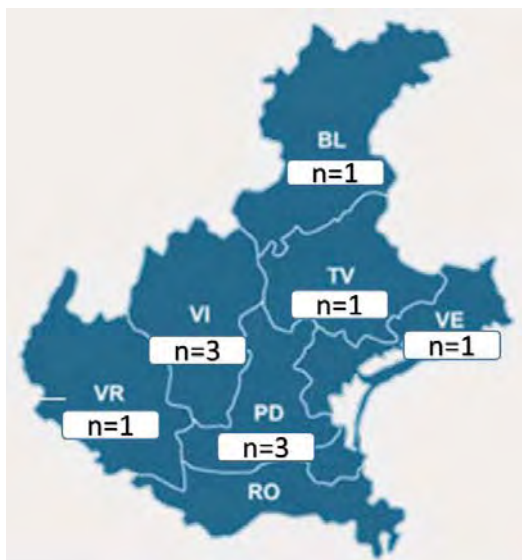
## Lotmaria passim e Crithidia mellificae

Regione	2013			2014			2015			2016			2017			2018			2019		
	n.	+Lp	+Cm	n.	+Lp	+Cm	n.	+Lp	+Cm	n.	+Lp	+Cm	n.	+Lp	+Cm	n.	+Lp	+Cm	n.	+Lp	+Cm
Veneto	11	1	0	12	11	0				6	6	6	1	1	0				1	1	0
Lombardia	10	3	0	11	5	0															
Trentino Alto Adige	1	1	0	2	2	0	2	1	1				17	12	7	29	6	0			
Sicilia																			5	2	0
Piemonte	10	6	0	13	12	0							5	3	3						
Friuli Venezia Giulia	4	2	0	2	1	0	1	1	1	7	3	6									
Liguria	6	4	0	9	5	1															
Abruzzo	6	0	0	2	1	0															
Toscana	12	3	0	13	6	1															
Lazio	6	3	0	8	7	1															
Campania																1	1	0			
Marche							1	0	1												
<b>Totale</b>	<b>66</b>	<b>23</b>	<b>0</b>	<b>72</b>	<b>50</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>13</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>23</b>	<b>16</b>	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>0</b>

- ✓ *L. passim* predominante (51.4%), da sola o in associazione a *C. mellificae* e rilevata in 11 delle 12 regioni
- ✓ Solo 13% positivi a *C. mellificae* e rilevata sempre in associazione con *L. passim*
- ✓ *L. passim* rilevato a partire dal 2013 (35%), mentre *C. mellificae* dal 2014 (4%)

# Studio della presenza di patogeni noti ed emergenti in apiari della regione del Veneto

Studio realizzato nell'ambito del Regolamento (UE) N. 1308/2013, azione F2 della regione del Veneto



APIARIO	N° acari Varroa	Api da	N° alveari	N° alveari positivi / N° totale alveari									
				<i>Nosema</i> spp.	Media n° spore <i>Nosema</i> spp./ape/alveare	<i>Crithidia mellificae</i>	<i>Lotmaria passim</i>	ABPV	CBPV	DWV-A	DWV-B		
A Montagna (BL)	1	NIDO	5	2/5	1,08x10 <sup>6</sup>	0/5	0/5						
		PREDELLINO	1	N.P.		N.P.	N.P.	0/1	0/1	0/1	0/1		
C Pianura (VI)	2	NIDO	10	10/10	3,66x10 <sup>6</sup>	1/10	10/10						
		PREDELLINO	10	10/10	5,71x10 <sup>6</sup>	0/10	3/10	10/10	10/10	4/5	1/5		
D Pianura (VE)	0	NIDO	10	0/10		0/10	7/10						
		PREDELLINO	9	5/9	5,45x10 <sup>5</sup>	0/9	2/9	3/9	9/9	0/5	5/5		
E Pianura (PD)	0	NIDO	10	0/10		0/10	9/10						
		PREDELLINO	10	0/10		0/10	9/10	1/10	10/10	10/10	0/10		
F Pianura (PD)	3	NIDO	10	4/10	8,77x10 <sup>5</sup>	0/10	7/10						
		PREDELLINO	10	9/10	9,33x10 <sup>5</sup>	0/10	10/10	1/10	10/10	1/2	1/2		
G Collina (VI)	0	NIDO	10	3/10	9,74x10 <sup>5</sup>	0/10	0/10						
		PREDELLINO	10	10/10	1,36x10 <sup>6</sup>	0/10	3/10	1/10	10/10	7/7	1/7		
H Pianura (PD)	0	NIDO	10	0/10		0/10	1/10						
		PREDELLINO	10	4/10	3,43x10 <sup>5</sup>	0/10	3/10	0/10	10/10	5/5	2/5		
I Collina (TV)	1	NIDO	10	3/10	2,07x10 <sup>6</sup>	0/10	3/10						
		PREDELLINO	10	4/10	9,39x10 <sup>5</sup>	0/10	4/10	0/10	10/10	4/4	4/4		
J Collina (VI)	10	NIDO	10	1/10	1,15x10 <sup>6</sup>	0/10	0/10						
		PREDELLINO	10	10/10	4,13x10 <sup>6</sup>	0/10	2/10	3/10	10/10	1/1	0/1		
K Montagna (VR)	28	NIDO	10	10/10	5,21x10 <sup>6</sup>	0/10	5/10						
		PREDELLINO	10	10/10	1,32x10 <sup>7</sup>	0/10	6/10	10/10	10/10	9/10	7/10		

APIARIO	Pool di varroa	
	DWV-A	DWV-B
F	NEG	POS*
J	NEG	POS
K	POS	POS

***Nosema ceranae* : 69.7% api da predellino**

**34.7% api da nido**

***Lotmaria passim* : 47.2% api da predellino**

**44.2% api da nido**

***Crithidia mellificae* : 1.1% api da nido**

**ABPV: 32.2%**

**CBPV: 100%**

**DWV-A: 34.4%**

**DWV-B: 8.9%**

**DWV-A + DWV-B: 12.2%**



# Conclusioni

La biologia molecolare in apicoltura consente di:

- rilevare la presenza di patogeni nuovi ed emergenti
- identificare la specie o la variante o il genotipo del patogeno
- effettuare studi filogenetici e di genetica di popolazione su parassiti delle api, con particolare riferimento a quelli di nuova/recente introduzione
- effettuare un costante monitoraggio dello stato di salute delle colonie