

Biologia molecolare in apicoltura

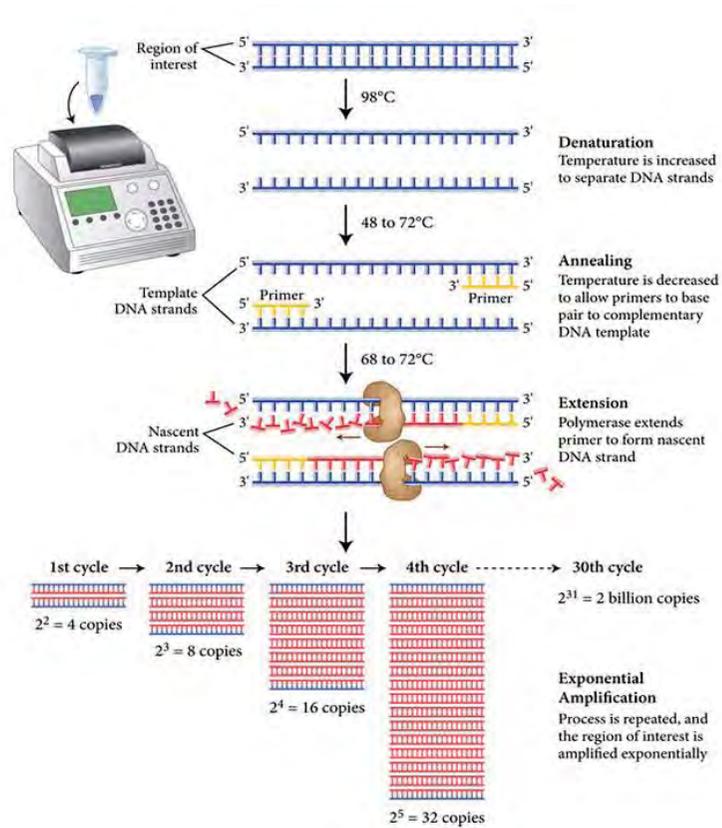
Anna Granato

SCS3 Diagnostica specialistica, istopatologia e parassitologia

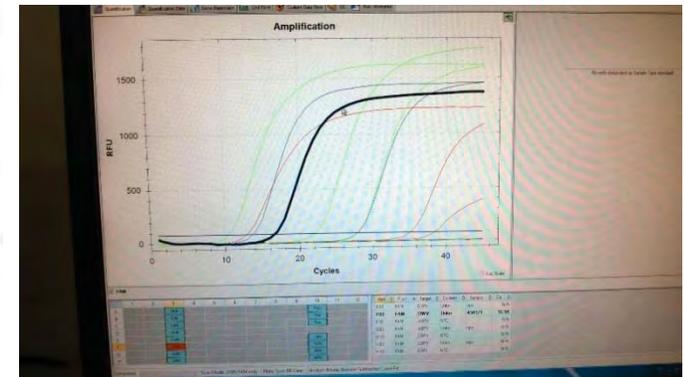
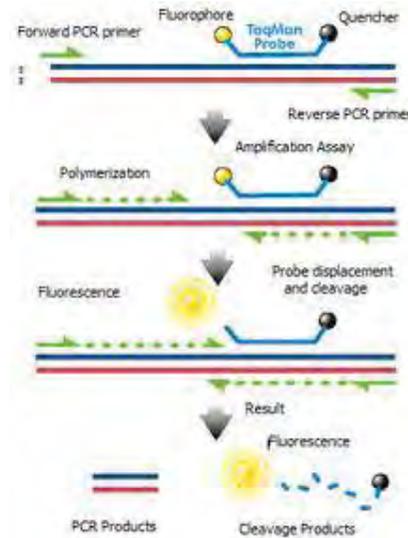
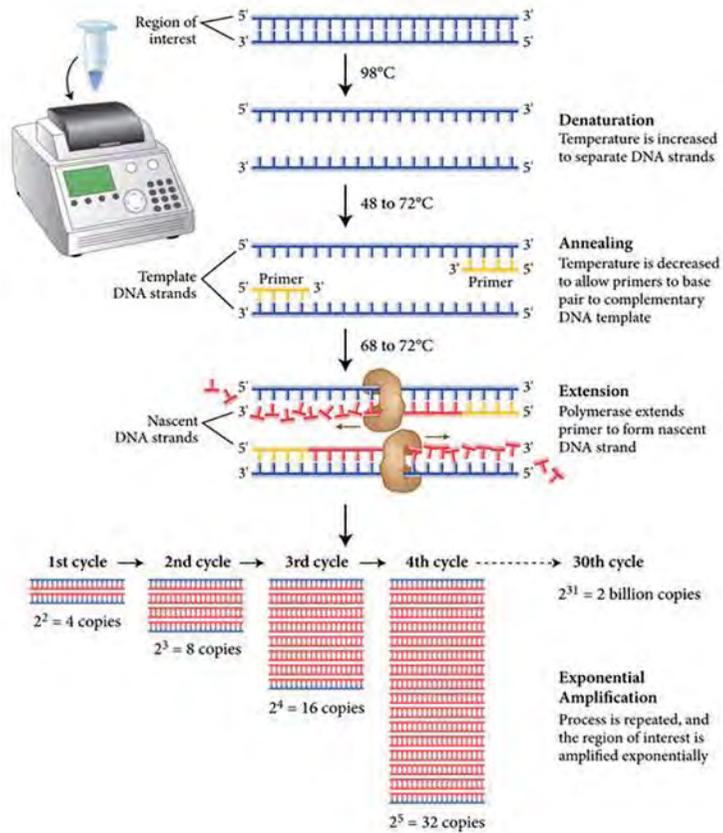
Biologia molecolare in apicoltura – Centro di referenza nazionale per l'Apicoltura



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

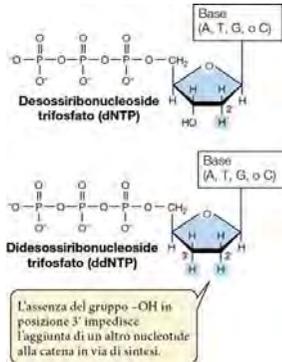
- Metodo tradizionale (Sanger)
- Next Generation Sequencing

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

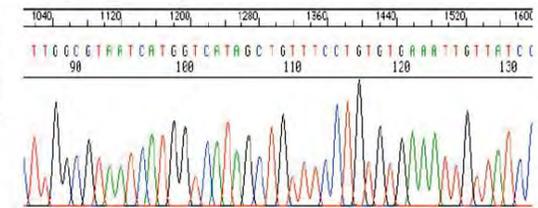
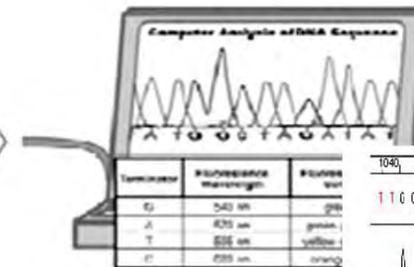
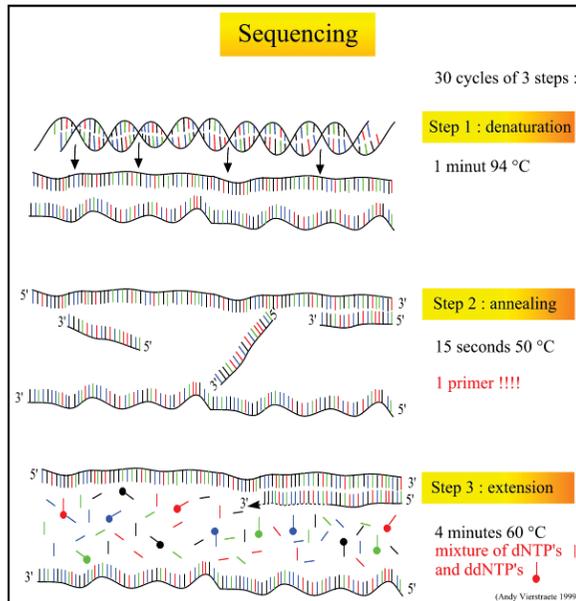
- comparare il genoma di diversi ceppi batterici/virali
- comprendere come un agente patogeno si espande
- identificare nuovi genotipi
- identificare nuovi patogeni

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)

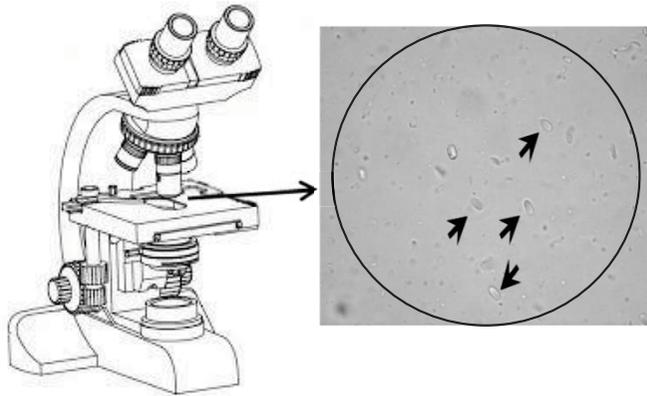
a cui seguono:

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

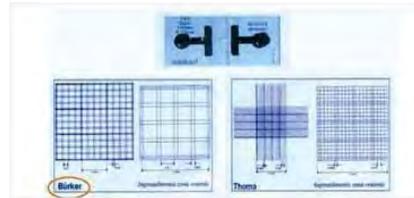
Batteri: *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*

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	?

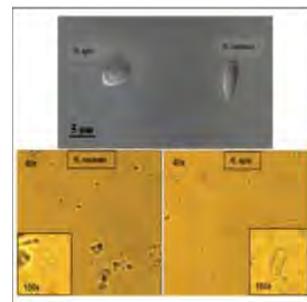
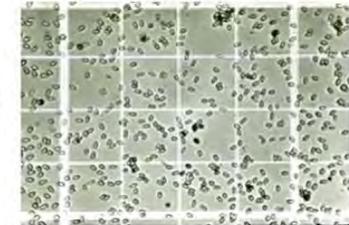
Nosemiasi – *Nosema apis*/*Nosema ceranae*



= presenza spore *Nosema* spp



= spore *Nosema* spp/ape

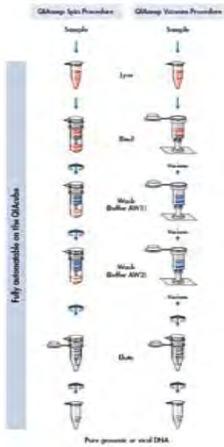


= PCR per identificazione specie
Nosema apis/*Nosema ceranae*

Nosema apis/Nosema ceranae

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

Estrazione del DNA



Quantificazione spettrofotometrica



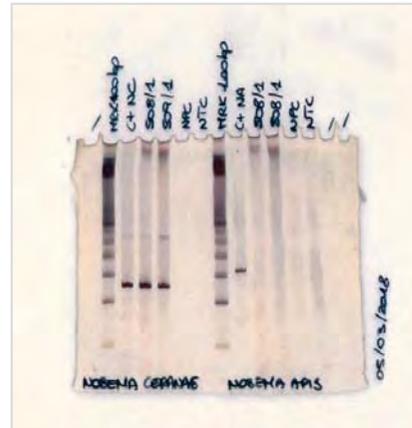
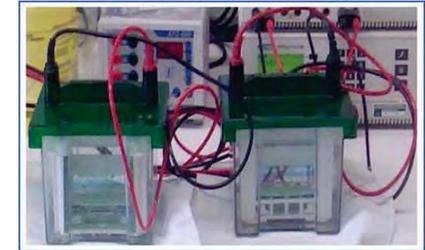
Preparazione master mix



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

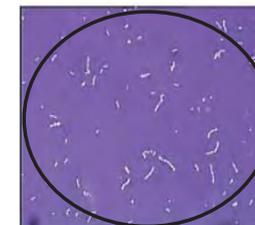
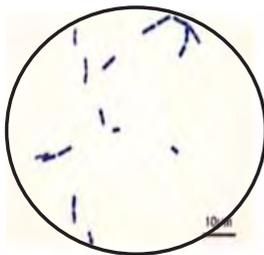
Melissococcus plutonius responsabile peste europea

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 B) and (b) Strain PL SAG m290 (ERIC B). Photos: A.M. Alippi



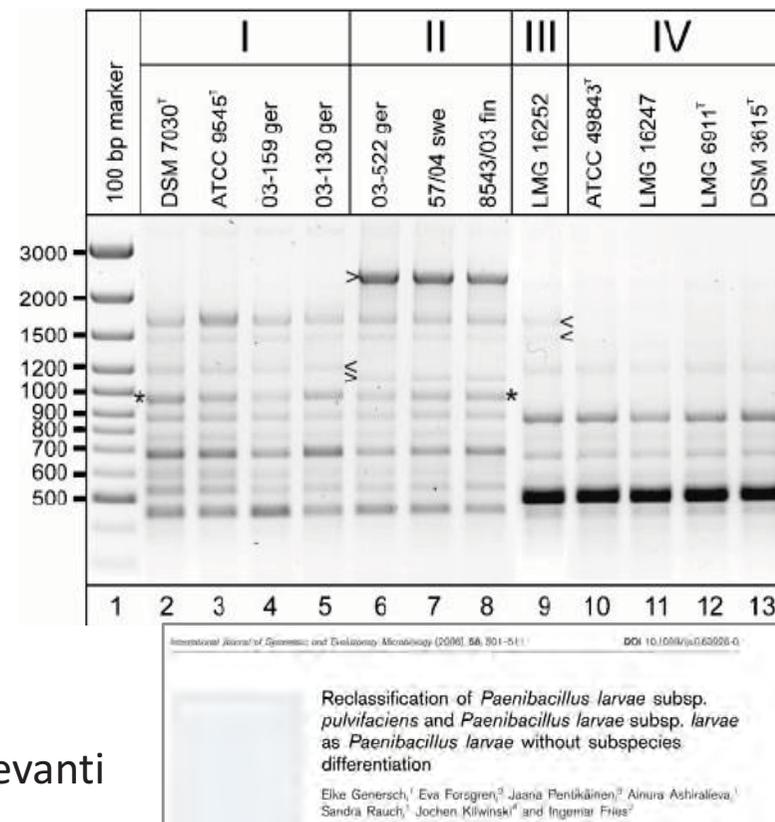
Genotipizzazione di *Paenibacillus larvae*

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*

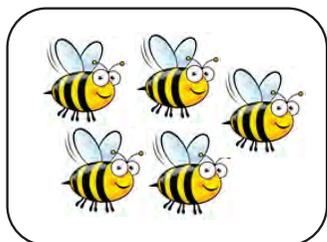
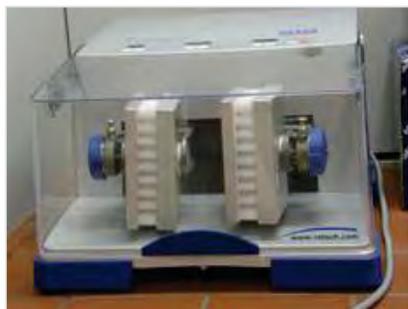
La possibilità di poter **discriminare** i diversi **ceppi di *Paenibacillus larvae*** è essenziale per lo **studio dell'epidemiologia** della peste americana

Consente di:

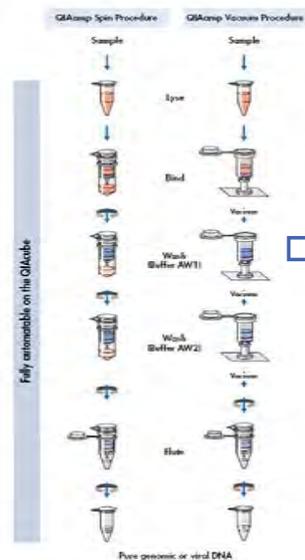
- identificare i focolai della malattia
- determinare la relazione tra focolai
- riconoscere ceppi più virulenti
- monitorare le strategie di prevenzione e trattamento

Virus delle api - DWV, ABPV e CBPV

Omogenizzazione



Estrazione dell'RNA



Quantificazione spettrofotometrica



Preparazione master mix



Amplificazione



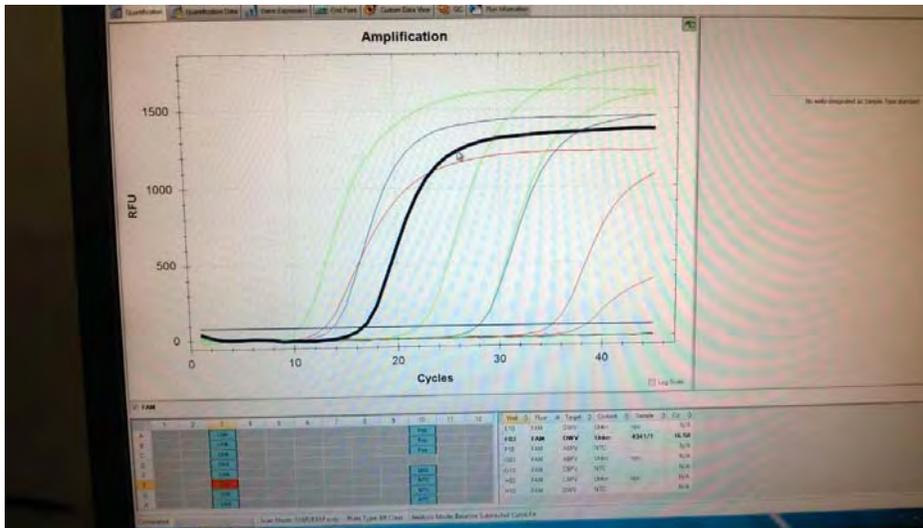
Virus delle api - DWV, ABPV e CBPV

GENE TARGET

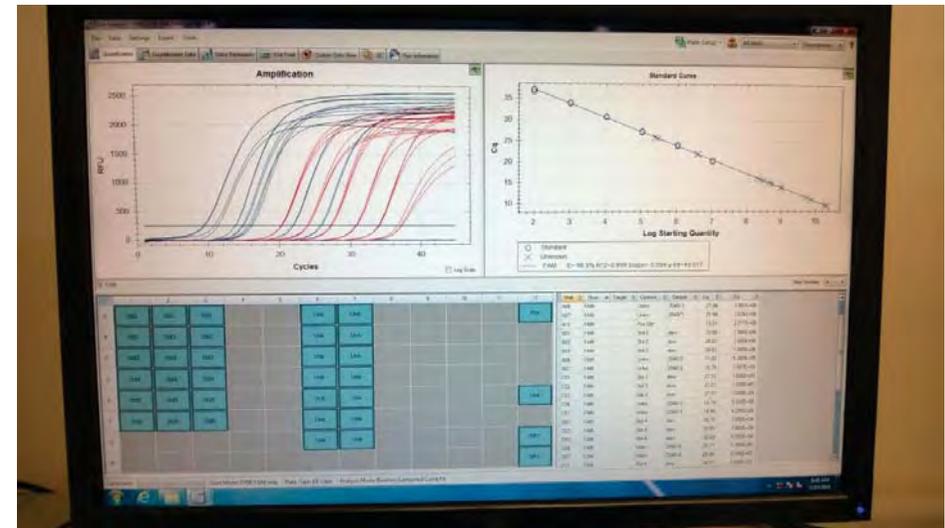
DWV: gene DWgp1 che codifica per una poliproteina.

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 ($> 10^7$)

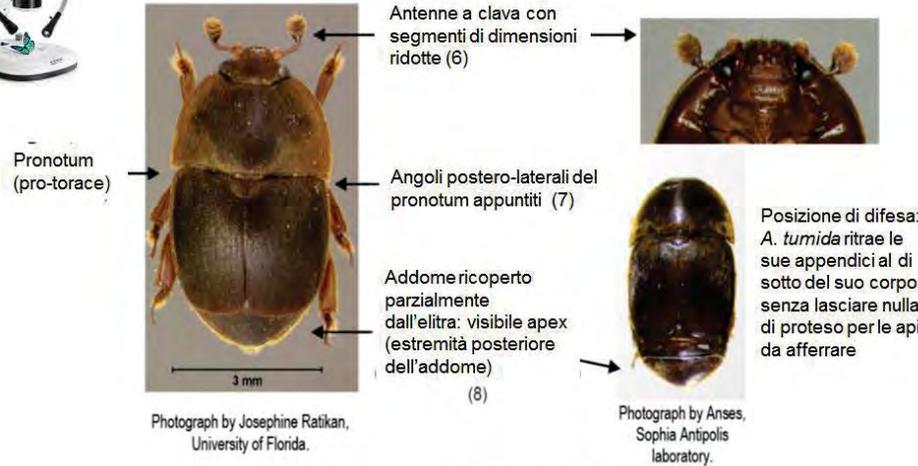
**Possibile relazione tra mortalità primaverile nelle api e trattamenti antiparassitari.
Virus potrebbero esacerbare in modo sinergico l'impatto negativo dei pesticidi sulla salute delle api,
mettendo in pericolo la sopravvivenza delle colonie.**

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



Photograph by Josephine Ratikan, University of Florida.

Photograph by Anses, Sophia Antipolis laboratory.

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

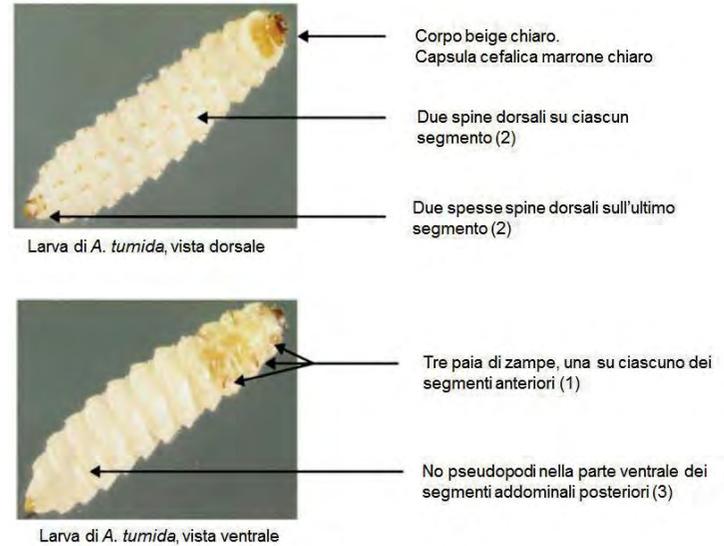


Figura 5. Larva di *Aethina tumida*
Photographs by Josephine Ratikan, University of Florida.

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

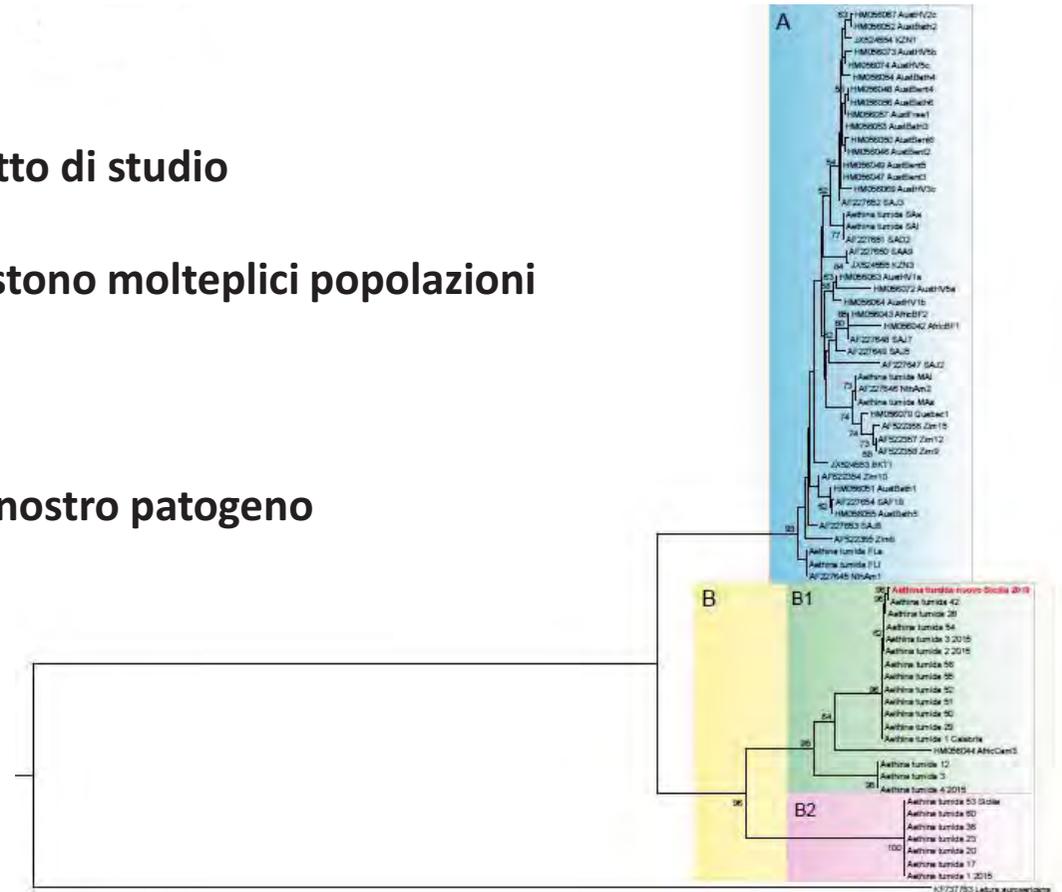
- ✓ Studi di filogenesi e di caratterizzazione genetica di una popolazione



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)

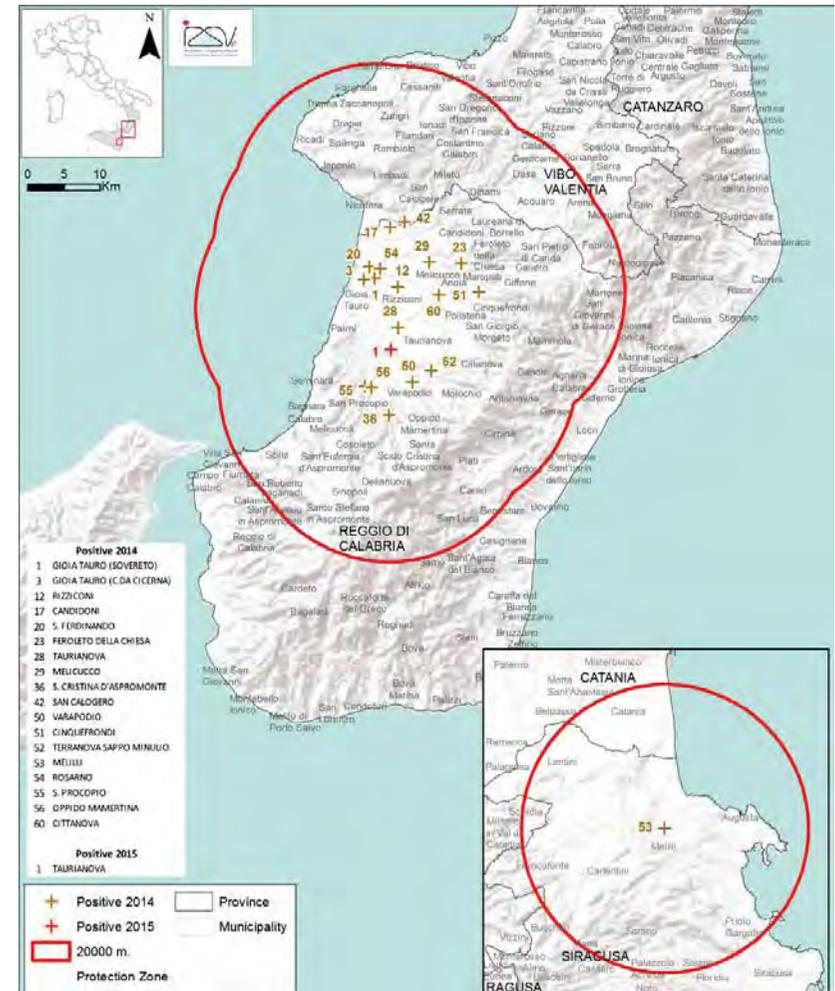
Anna GRANATO¹, Bianca ZECCHIN¹, Chiara BARATTO¹, Véronique DUQUESNE², Enrico NEGRISOLO³, Marie-Pierre CHAUZAT^{2,4}, Magali RIBIÈRE-CHABERT², Giovanni CATTOLI¹, Franco MUTINELLI¹

2014

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

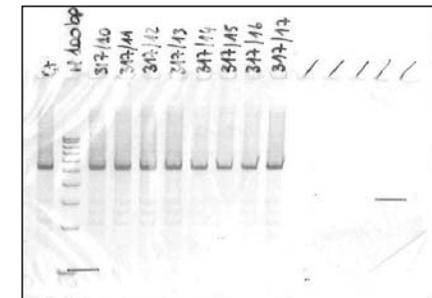
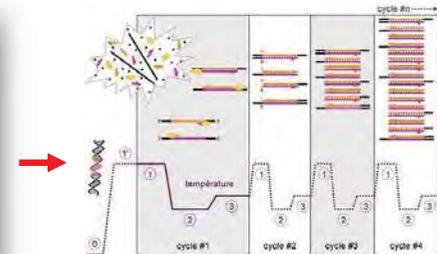
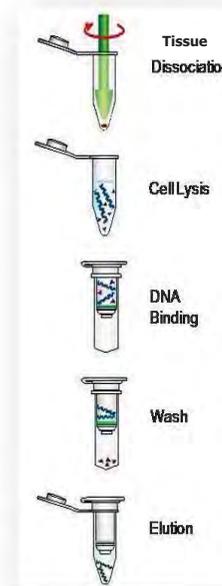
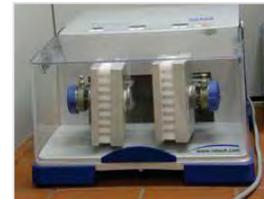
2015

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

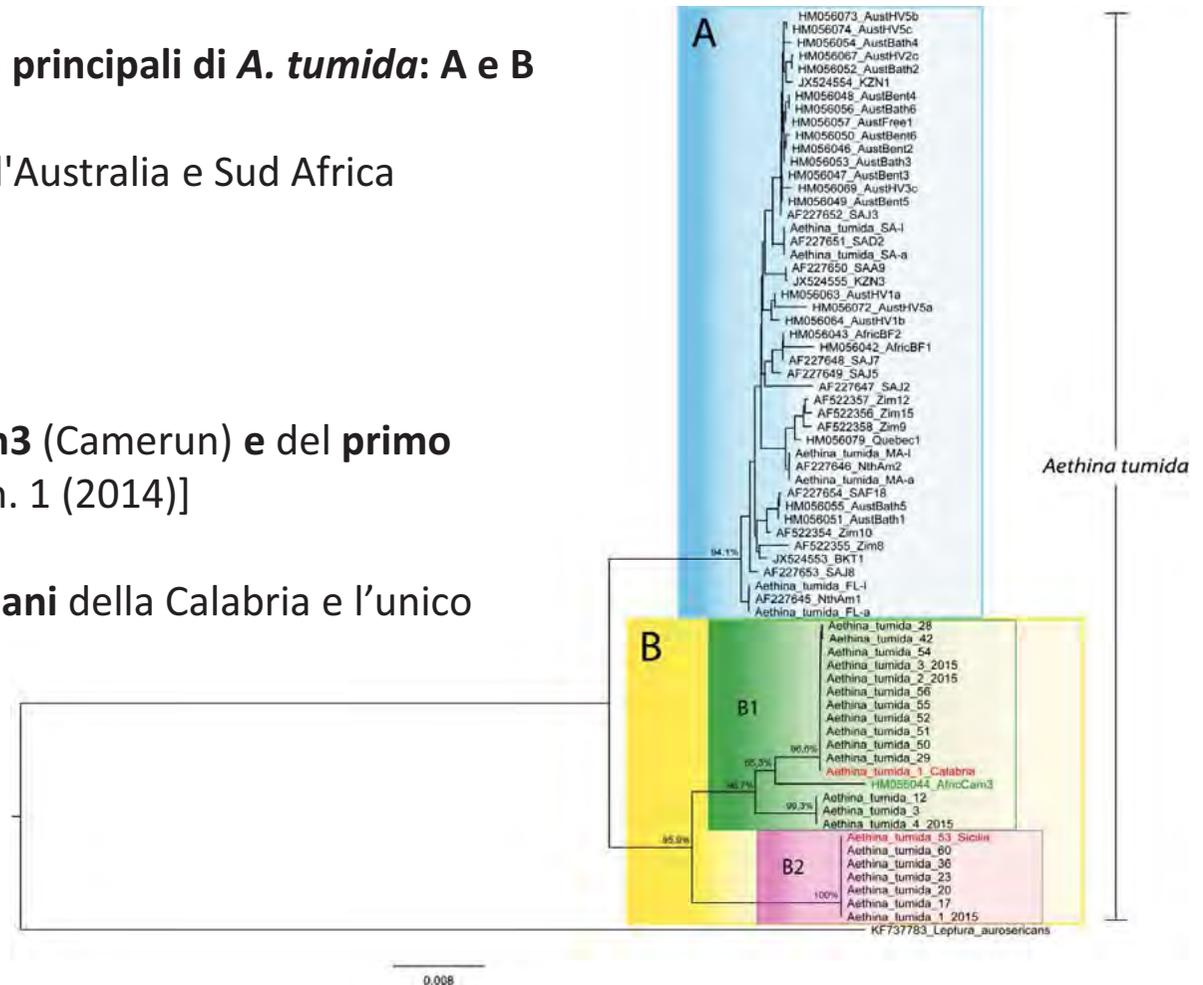
Gruppo B: tutti i campioni italiani

- ✓ 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^A 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^A ipotesi: due distinte introduzione di AT nelle regioni Calabria e la Sicilia seguite da un'ulteriore introduzione in Calabria

3^A 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

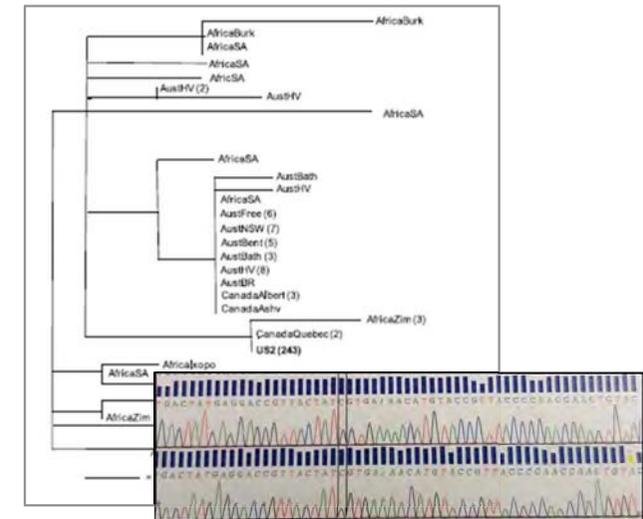
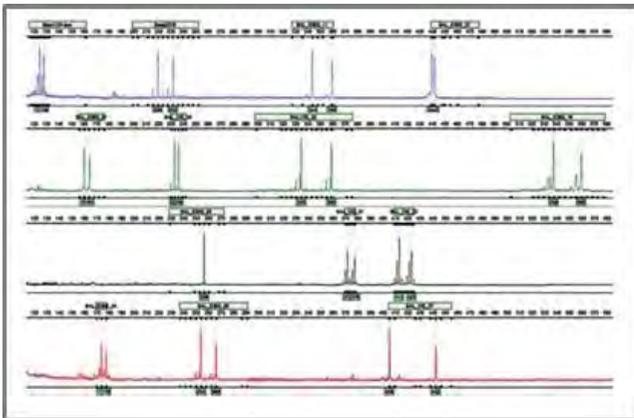
Characterization of microsatellite loci for the Italian small hive beetle, *Aethina tumida*

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

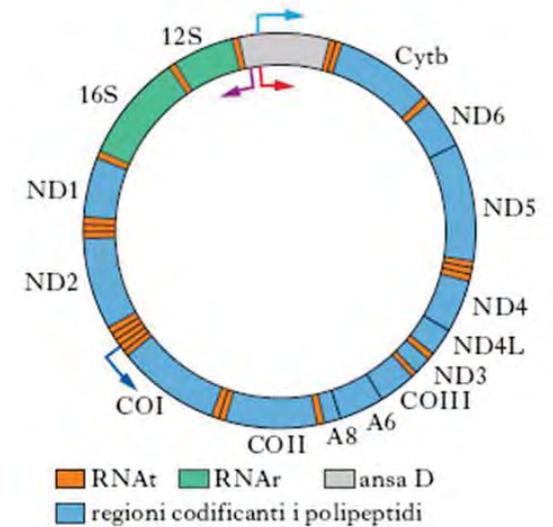
2 campioni del Sud-Africa



Aethina tumida

Italy (n=117)						North America (n=19)					South Africa (n=2)				
Locus	Allele size (bp)	N _A	H _O	uH _E	PIC	Allele size (bp)	N _A	H _O	uH _E	PIC	Allele size (bp)	N _A	H _O	uH _E	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
Mean		4.6	0.29	0.44			2.6	0.08	0.36			1.6	0.32	0.30	

- ✓ 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



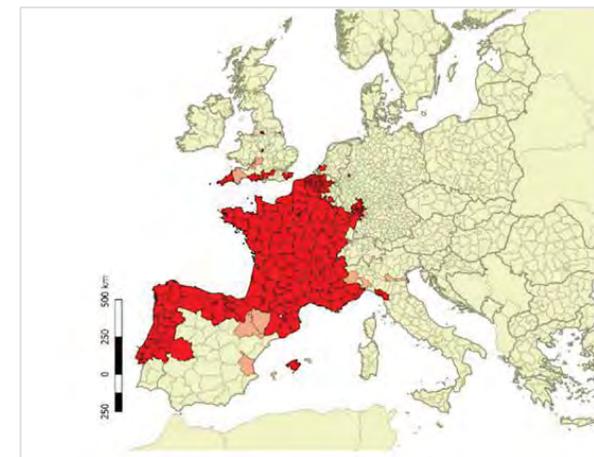
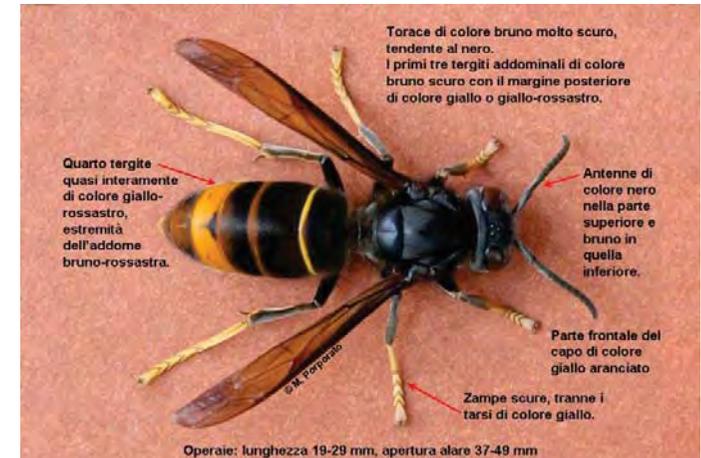
Vespa velutina

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]

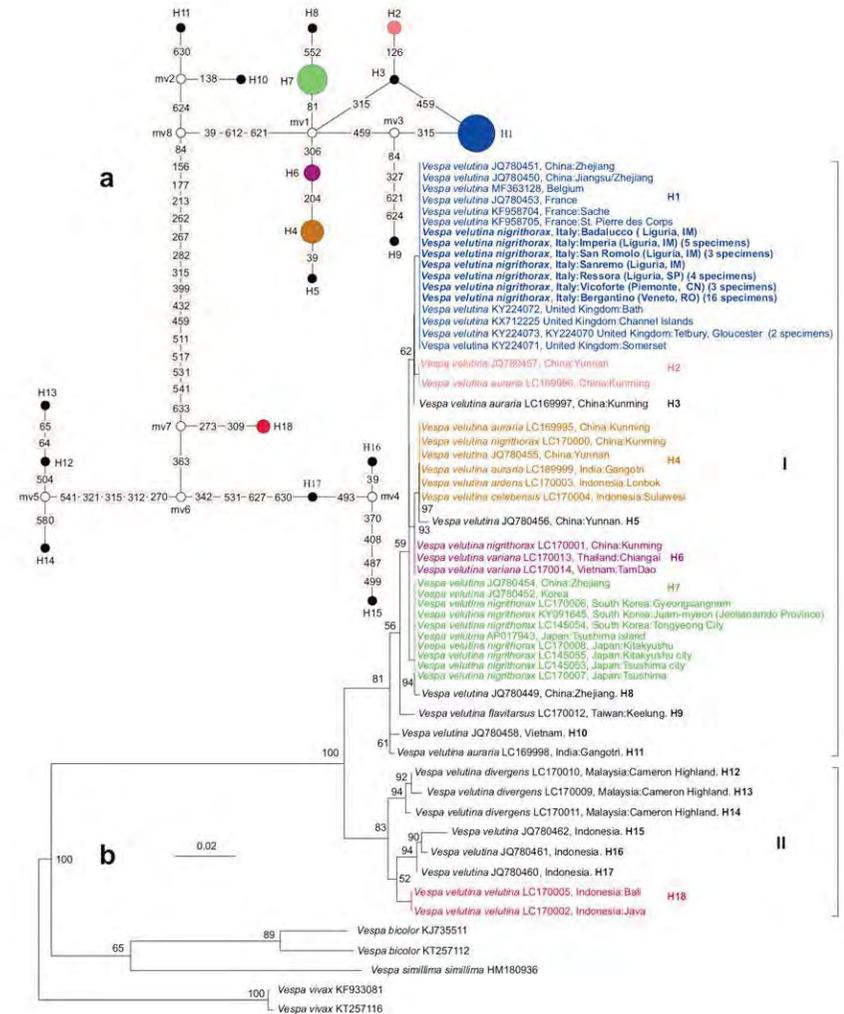
Vespa velutina

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



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



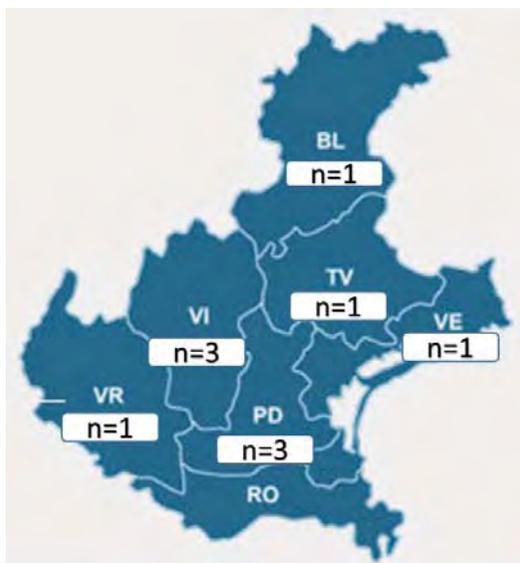
Lotmaria passim e Crithidia mellificae

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												
Totale	66	23	0	72	50	3	4	2	3	13	9	12	23	16	10	30	7	0	6	3	0

- ✓ *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 ⁶	0/5	0/5	N.A.			
		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 ⁶	1/10	10/10	N.A.			
		PREDELLINO	10	10/10	5,71x10 ⁶	0/10	3/10	10/10	10/10	4/5	1/5
D Pianura (VE)	0	NIDO	10	0/10		0/10	7/10	N.A.			
		PREDELLINO	9	5/9	5,45x10 ⁵	0/9	2/9	3/9	9/9	0/5	5/5
E Pianura (PD)	0	NIDO	10	0/10		0/10	9/10	N.A.			
		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 ⁵	0/10	7/10	N.A.			
		PREDELLINO	10	9/10	9,33x10 ⁵	0/10	10/10	1/10	10/10	1/2	1/2
G Collina (VI)	0	NIDO	10	3/10	9,74x10 ⁵	0/10	0/10	N.A.			
		PREDELLINO	10	10/10	1,36x10 ⁶	0/10	3/10	1/10	10/10	7/7	1/7
H Pianura (PD)	0	NIDO	10	0/10		0/10	1/10	N.A.			
		PREDELLINO	10	4/10	3,43x10 ⁵	0/10	3/10	0/10	10/10	5/5	2/5
I Collina (TV)	1	NIDO	10	3/10	2,07x10 ⁶	0/10	3/10	N.A.			
		PREDELLINO	10	4/10	9,39x10 ⁵	0/10	4/10	0/10	10/10	4/4	4/4
J Collina (VI)	10	NIDO	10	1/10	1,15x10 ⁶	0/10	0/10	N.A.			
		PREDELLINO	10	10/10	4,13x10 ⁶	0/10	2/10	3/10	10/10	1/1	0/1
K Montagna (VR)	28	NIDO	10	10/10	5,21x10 ⁶	0/10	5/10	N.A.			
		PREDELLINO	10	10/10	1,32x10 ⁷	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