

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”



SCUOLA POLITECNICA E DELLE SCIENZE DI BASE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE BIOLOGICHE

TESI DI LAUREA SPERIMENTALE IN  
TUTELA AMBIENTALE

*Variazioni del corpo grasso nelle api in relazione ai cambiamenti climatici: studio morfologico, morfometrico e biomolecolare.*

*Variations in the honey bees fat body in relation to climate changes: a morphological, morphometric and biomolecular study.*

Relatore

Ch.mo Prof.re

Angelo Genovese

Candidato

Maria Grazia Liguori

Matr: N99001924

Correlatrice

Ch.ma Prof.ssa

Paola Maiolino

Anno Accademico 2018/2019

*A mia madre,  
ti troverò nella forza che mi hai donato e in questa  
vita che mi parla solo di te, in quelle vecchie  
canzoni che cantavi mentre riempivi la casa con la  
tua presenza, in quei vecchi film che amavi tanto e  
che guardo ancora per sentirmi più vicina a te.*

*A mio padre,  
per tutti gli insegnamenti, per la pazienza e per i  
suoi occhi stanchi che ,mentre mi guardano,  
ritrovano il coraggio di sorridere ancora.*

*A Davide,  
per la tenerezza dei suoi abbracci e delle sue  
carezze, per i sorrisi e la spensieratezza, per esserci  
così come vorrei.*

*Grazie*

# Indice

<b>Capitolo 1</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Introduzione</b> .....	<b>3</b>
1.1 Apicoltura: Stato dell'arte.....	3
1.1.1 Consistenza del patrimonio apistico e produzione di miele in Italia.....	6
1.2 <i>Apis mellifera</i> .....	8
1.2.1 Organizzazione sociale .....	10
1.2.2 Superorganismo ape .....	17
1.2.3 <i>Apis mellifera</i> in pericolo: principali minacce .....	19
1.2.3.1 Infestazione da <i>varroa</i> .....	22
1.2.3.2 Patologie emergenti o riemergenti.....	25
1.2.3.3 Agrofarmaci e farmaci .....	29
1.2.3.4 Pratiche agricole errate.....	32
1.2.3.5 Pratiche apistiche errate .....	32
1.2.4 Cambiamenti climatici.....	37
1.2.5 Produzione di miele in Italia nel 2018/19 .....	42
1.2.5.1 Analisi di mercato e valutazioni dei danni economici per la campagna produttiva 2019 .....	43
1.3 Alimentazione delle api .....	47
1.4 Corpo grasso ( <i>Fat Body</i> ).....	52
<b>Capitolo 2</b> .....	<b>58</b>
<b>2.1 Scopo della tesi</b> .....	<b>58</b>
<b>2.2 Materiali e metodi</b> .....	<b>59</b>
2.2.1 Esame macroscopico e microscopico .....	59
2.2.2 Analisi morfometrica.....	60
2.2.3 Estrazione di RNA, retro-trascrizione (RT) e Real-time PCR quantitativa (qPCR) .....	60
<b>Capitolo 3</b> .....	<b>62</b>
<b>3.1 Risultati ed osservazioni preliminari</b> .....	<b>62</b>
3.1.1 Esame macroscopico e microscopico .....	62
3.1.1 Risultati morfometria.....	64

3.1.2 Risultati biologia molecolare .....	64
<b>Considerazioni e conclusioni .....</b>	<b>65</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>67</b>

# Capitolo 1

## 1. Introduzione

### 1.1 Apicoltura: Stato dell'arte

Le api, fin dalla comparsa dell'uomo sulla terra, hanno rivestito un ruolo di primaria importanza così come dimostrano antiche pitture rupestri, rinvenute nei pressi di Valencia in Spagna, e risalenti a più di 7000 anni fa.

Il genere "*Apis*" è datato 25 milioni di anni fa. La testimonianza più antica della sinergia tra uomo e ape e l'inizio del loro sfruttamento sistematico, risale all'età neolitica. Il comportamento dell'uomo verso l'ambiente si evolve gradualmente: l'uomo da "predatore di miele selvatico", si trasforma in "allevatore di api".

L'apicoltura ha radici molto antiche ed il modo in cui viene praticata non è cambiato molto con il passare del tempo. È un'attività che non è mai stata industrializzata e non potrà mai esserlo, perché nessuna macchina potrà sostituire il lavoro paziente e certosino dell'apicoltore.

Le api hanno da sempre affascinato il genere umano, che da secoli studia la loro incredibile organizzazione.

Le api sono insetti organizzati in complesse società nelle quali vi è una precisa divisione dei ruoli al punto che le colonie sono considerate dei "super organismi" in cui le operaie svolgono le funzioni degli organi di manutenzione e nutrimento, mentre la regina e i fuchi rappresentano gli organi di riproduzione.

Le api non si possono addomesticare, eppure da millenni vivono in simbiosi con gli apicoltori, producendo miele, pappa reale, cera, polline e propoli. Gli studi effettuati sulle caratteristiche chimico-fisiche e sulle proprietà di questi prodotti ne hanno esteso enormemente i settori d'impiego, spaziando da quello alimentare a quello cosmetico e farmaceutico.

Oltre ad essere, quindi, l'unico animale in grado di produrre miele, un alimento unico e insostituibile nella dieta dell'uomo, e avere, pertanto, un'importanza economica molto rilevante tanto da mettere l'apicoltura come terza in graduatoria dopo l'allevamento di bovini e suini, l'ape ha un'importanza ecologica fondamentale ed è quella di essere un insetto pronubo, ossia che favorisce l'impollinazione, trasferendo il polline da un fiore all'altro; questo servizio rappresenta il contributo più importante nella moderna agricoltura (Klein et al., 2007). Contribuisce inoltre alla salvaguardia e alla tutela della biodiversità. Il mantenimento della biodiversità vegetale è possibile solo se c'è una quantità elevata di insetti impollinatori (le api impollinano circa il 70% di tutte le piante al mondo).

Circa l'80 % dell'impollinazione è dovuto ai pronubi – garantendo una più efficace fecondazione e quindi una maggiore resa produttiva. Un'altra importante azione svolta dall'ape è quella ecologica, il fatto che in una giornata di lavoro, le api operaie che svolgono attività bottinatrice, escono dall'alveare ripetute volte, fa sì che l'ape sia in continuo contatto con l'ambiente circostante e con i suoi continui voli di esplorazione, diventa una vera sentinella ambientale sulla quale vengono poi effettuate le analisi strumentali per monitorare l'ambiente. Alcune sostanze inquinanti possono entrare in contatto con questo insetto attraverso il suolo, vegetazione, aria e acqua. C'è, quindi, uno stretto legame tra la numerosa presenza di insetti pronubi e lo stato di salute del territorio e ciò fa sì che qualsiasi problematica investa le api, così come gli impollinatori selvatici, desta forti preoccupazioni.

La diminuzione delle api è una minaccia per gli ecosistemi naturali in cui esse vivono. La FAO (*Food and Agriculture Organization*) ha informato la comunità internazionale dell'allarmante riduzione a livello mondiale di insetti impollinatori, tra cui *Apis mellifera*, l'ape da miele.

Nella sola Europa l'84% delle 264 principali colture dipendono direttamente dall'impollinazione entomofila e quella condotta dalle api garantisce la sopravvivenza di circa 4000 specie vegetali (Kluser e Peduzzi, 2007). Un team guidato da Rachael Winfree ha evidenziato come esistano differenti metodi per

attribuire un valore economico all'azione impollinatrice degli animali in campo agricolo.

Unendo i differenti metodi di analisi è stato sviluppato un accurato sistema che, ad esempio, ha stimato a 3 milioni di dollari il valore attribuibile all'azione impollinatrice delle api nella sola produzione di cocomeri in New Jersey e Pennsylvania (Winfree, 2011). Sebbene sia difficile quantificare in maniera precisa il ricavato economico collegato a questo servizio ecosistemico, secondo recenti studi nel 2009 negli USA esso è stato pari a 11,68 miliardi di dollari (Calderone, 2012), mentre a livello mondiale nel 2005 è stato stimato attorno ad un valore di 153 miliardi di euro corrispondente ad 1/10 del valore totale della produzione agricola mondiale (Gallai et al., 2009). Circa il 35% della produzione agricola globale, quindi, dipende dagli impollinatori (Klein et al., 2007).

Praticamente inestimabile è invece il valore del contributo dell'azione impollinatrice delle api nel mantenimento dell'ecosistema terrestre, visto il vitale ruolo svolto nel garantire la biodiversità delle specie vegetali (Potts et al., 2010).

Nel corso degli ultimi anni in Italia si sono registrate perdite di api tra cento e mille volte maggiori di quanto osservato normalmente (EFSA, 2008). La consistente perdita delle api mellifere, con conseguente spopolamento di interi alveari, sta provocando notevoli danni in particolare agli apicoltori, che si vedono sempre più ridotte le famiglie di api e calare la produzione, ma anche all'intero settore agricolo, che difficilmente riuscirebbe a sostituire la fondamentale funzione di impollinazione che svolgono questi insetti.

Nell'ultimo secolo, infatti, l'avanzare dell'industrializzazione, dovuto ad un aumento dell'urbanizzazione ed al bisogno irrefrenabile dell'uomo di controllare i processi della natura a proprio vantaggio, ha provocato un inevitabile stato di inquinamento generalizzato, e, di conseguenza, profonde alterazioni nell'equilibrio dell'ecosistema.

La moria delle api costituisce un problema sempre più grave in molte regioni italiane, a causa di una combinazione di fattori, tra i quali la maggiore vulnerabilità nei confronti di patogeni (virus, batteri, funghi e soprattutto

parassiti quali: *Varroa destructor*, *Aethina tumida*, *Vespa velutina* e altri artropodi, incluse altre specie alloctone), i cambiamenti climatici e la variazione della destinazione d'uso dei terreni. Infine, una progressiva diminuzione delle piante mellifere, l'uso massiccio di prodotti fitosanitari e di tecniche agricole poco sostenibili rappresentano ulteriori fattori responsabili della scomparsa delle api (Le Féon et al., 2010; Maini et al., 2010). La drammatica diminuzione delle api domestiche e selvatiche è, inoltre, una delle spie degli effetti negativi dei cambiamenti climatici e del riscaldamento globale. Dopo l'uso massiccio dei pesticidi, i cambiamenti climatici, infatti, rappresentano una delle maggiori minacce per gli impollinatori. Un primo segnale arriva dalla produzione di miele. Secondo i dati forniti dagli apicoltori italiani dell'Unaapi (Unione nazionale associazioni apicoltori italiani) la produzione di miele, a causa della siccità del 2017, è calata del 80%. Proprio per le conseguenze della siccità, infatti, i fiori non secernono più nettare e polline e le api, in sofferenza per il clima anomalo, non solo non producono miele, ma rischiano di non riuscire a fornire il loro determinante servizio di impollinazione alle colture agricole (WWF, 2018).

L'ape rappresenta, ad oggi, il più versatile tra gli insetti impollinatori, facile da allevare, trasportare ed economico. Essa è vista, non a caso, come uno dei più importanti impollinatori, capaci di generare un efficiente servizio ecosistemico che, tra l'altro, contribuisce a migliorare lo stato di salute e di benessere dell'uomo.

### **1.1.1 Consistenza del patrimonio apistico e produzione di miele in Italia**

L'Italia è il quarto paese dell'Unione Europea per numero di alveari (1,4 milioni), dopo Spagna (2,9 milioni di alveari), Romania e Polonia (rispettivamente 1,8 e 1,6 milioni di alveari). Il numero degli alveari registrati in Italia nel 2018 si è incrementato del 7% rispetto al 2017. La produzione italiana di miele rilevata dall'ISTAT è poco meno di 8 mila tonnellate per un valore di oltre 61 milioni di euro, ma va considerato che l'ISTAT prende in considerazione l'apicoltura unicamente in occasione dei censimenti generali

dell'agricoltura che, non essendo concepiti per stabilire la consistenza degli allevamenti apistici, rilevano esclusivamente parte degli allevamenti strutturati nel settore agricolo, laddove questi coincidano con la disponibilità di terreno. Rimangono pertanto esclusi i numerosi apicoltori, che a prescindere dalla loro connotazione professionale, non associano l'apicoltura ad un'attività agricola ma che pure, nel mantenere in vita l'ape, nei più disparati ambienti naturali o agricoli, assicurano di fatto una indispensabile e capillare impollinazione posizionando i propri alveari su terreni altrui. L'effettiva produzione italiana di miele, secondo le stime dell'*Osservatorio Nazionale sul miele*, si attesterebbe su oltre 23,3 mila tonnellate, circa tre volte quella stimata dall'ISTAT. La produzione è garantita da oltre 1,4 milioni di alveari, di cui circa 390 mila stanziali e 556 mila nomadi, i restanti sono invece alveari per produzione hobbistica e autoconsumo. A livello geografico la produzione è diffusa in tutte le regioni del Paese. La regione più produttiva è il Piemonte, con oltre 5 mila tonnellate stimate nel 2018, seguita da Toscana con oltre 3 mila tonnellate e da Emilia Romagna con oltre 2 mila tonnellate. Dai dati produttivi medi per regione è emersa una resa media per alveare, per le aziende professioniste che praticano nomadismo, di circa 33 kg/alveare per le regioni del Nord Ovest e Nord Est, 35 kg/alveare per le regioni del Centro e 22 kg/alveare per le regioni del Sud e delle Isole, da cui risulta una resa media a livello nazionale di circa 30 kg/alveare. Applicando alle rese medie per regione i correttivi che tengono conto della minore produttività dei professionisti stanziali e dei produttori in autoconsumo e moltiplicando per il numero di alveari, si è giunti ad una stima della produzione italiana di miele per l'annata apistica 2018 quantificabile in circa 23.000 tonnellate se rapportata al numero complessivo di alveari censiti e in circa 21.000 tonnellate se rapportata al numero di alveari supposti in produzione. I due valori evidenziano un *range* accettabile nel quale collocare la produzione nazionale 2018. L'introduzione della *Banca Dati Apistica*, alla quale tutti gli apicoltori devono essere obbligatoriamente registrati dichiarando gli alveari detenuti e la loro posizione geografica, ha consentito di validare le stime scaturite negli anni riguardo alla consistenza degli apicoltori e degli alveari italiani, evidenziando un elevato numero di apicoltori e alveari e un

numero di apicoltori con partita IVA più alta del previsto. Dai dati della BDA aggiornati al 1° giugno 2019, emerge che sono 51.578 gli apicoltori in Italia di cui 33.800 circa produce per autoconsumo (65%) e 17.767 sono apicoltori con partita iva che producono per il mercato (35%). La presenza di un numero così considerevole di apicoltori non professionisti costituisce allo stesso tempo una risorsa e un aspetto problematico (<https://www.informamiele.it/wp-content/uploads/2019/07/Report-ISMEA-mancata-produzione-2019.pdf>).

L'aspetto positivo riguarda soprattutto la funzione d'impollinazione per l'agricoltura e per l'ecosistema; gli aspetti critici riguardano, principalmente, l'influenza negativa sullo stato sanitario delle api, quando tali attività sono svolte senza rispettare le regole minime di gestione sanitaria.

Gli apicoltori italiani detengono, al 31 dicembre, in totale 1.473.665 alveari e 252.848 sciame.

Il 78% degli alveari totali (984.422), sono alveari gestiti da apicoltori commerciali che allevano le api per professione. La grande prevalenza di alveari detenuti da apicoltori con partita iva sottolinea l'elevata professionalità del settore e l'importanza del comparto nel contesto agro-economico. Nel 2018 sono oltre 173 mila gli alveari che producono miele biologico, mentre 1,3 milioni di alveari producono miele convenzionale.

Da qui si deduce che è un settore, a torto, ritenuto marginale e d'importanza secondaria, in grado di fornire redditi esclusivamente integrativi ma bensì un settore in grado di garantire uno sbocco professionale di un certo rilievo per tanti giovani.

## **1.2 *Apis mellifera***

*“L'ape non è un animale domestico e neppure selvatico, ma qualcosa di intermedio, una creatura capace di contrarre rapporti con l'uomo senza perdere la propria libertà; o comunque restando sempre in condizioni di riprendersela”.*  
(Plinio, *Historia naturalis*).

L'*Apis mellifera* è un insetto sociale, appartenente all'ordine degli Imenotteri, famiglia degli *Apidi* e al genere *Apis* al quale appartengono, inoltre, altre tre specie:

- *Apis dorsata* o ape gigante diffusa in India, Indocina e Indonesia vive nelle foreste e costruisce favi molto grandi sui rami degli alberi;
- *Apis florea* o ape nana di dimensioni inferiori alla mellifera è diffusa nelle stesse regioni della precedente e come lei costruisce i favi sugli alberi, ma di dimensioni più piccole;
- *Apis indica* o *Apis cerana*, simile alla mellifera, è diffusa in India e Cina, costruisce i favi dentro le anfrattuosità degli alberi.

Attualmente l'*Apis mellifera*, detta anche ape domestica (Fig. 1), è diffusa in tutto il mondo, occupa territori con caratteristiche geoclimatiche molto differenti, così che, sotto la diversa pressione selettiva, si sono formate varie razze suddivisibili, secondo il biologo austriaco F. Ruttner, in tre gruppi: europea, orientale, africana.

Alla razza europea appartengono l'*Apis mellifera ligustica* o ape italiana, l'*Apis mellifera mellifera*, l'*Apis mellifera carnica*, e l'*Apis mellifera caucasica*.

L'ape italiana è considerata l'ape industriale per eccellenza per le sue caratteristiche di elevata operosità, prolificità delle regine e bassa tendenza alla sciamatura; si distingue dalle altre razze europee per il colore giallo dei primi segmenti dell'addome.



**Fig. 1** - *Apis mellifera* o ape domestica

## 1.2.1 Organizzazione sociale

L'*Apis mellifera*, descritta per la prima volta da Linnaeus nel 1758, vive all'interno di colonie o famiglie costituite da numerosi individui nel quale generalmente possiamo riconoscere un'ape regina fertile, poche centinaia di maschi fertili, i fuchi, e migliaia di api operaie sterili (Winston, 1991); il loro numero varia da qualche migliaio nel periodo invernale a diverse decine di migliaia di individui nel periodo di massima espansione della famiglia (aprile/maggio) (Fig. 2 A, B, C). Ogni famiglia è costituita, quindi, da una società matriarcale, monoginica e pluriannuale, suddivisa in due caste:

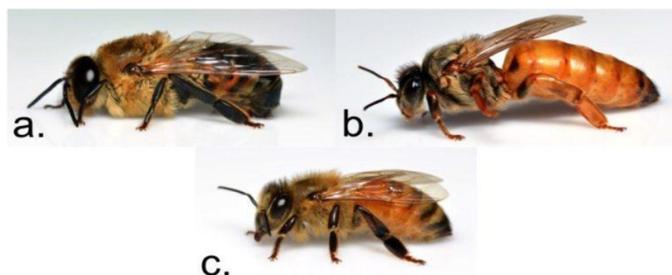
- Casta degli anfigonici di cui fa parte la regina e i fuchi;
- Casta delle operaie.

La definizione generale di eusocialità (Michener, 1969; Wilson, 1971) fu adottata per la prima volta da Batra (1966), viene considerata eusociale una colonia nella quale i singoli membri allevano in comune la prole, presentano una divisione del lavoro di tipo riproduttivo (con individui fertili ed altri sterili che aiutano i primi a riprodursi) con una sovrapposizione di generazioni (in poche parole i figli rimangono assieme ai genitori).

La determinazione del sesso nelle api segue il sistema aplodiploide, piuttosto comune negli insetti dell'ordine degli *Hymenoptera*, dove i maschi sono aploidi e le femmine diploidi (Heimpel and de Boer, 2008).

La differenziazione dei sessi è complessa ed è influenzata da alcuni fattori:

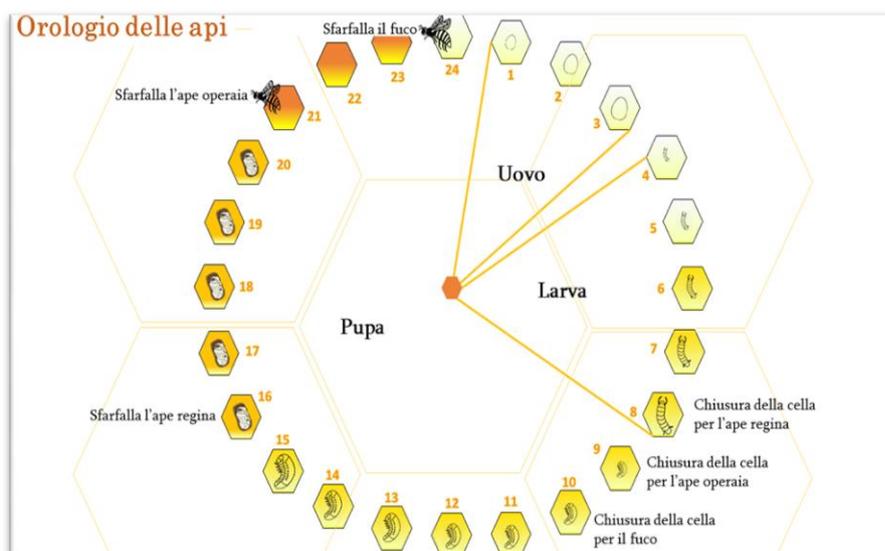
- Le api operaie (femmine) provengono da uova fecondate, deposte in celle piccole e alimentate con "gelatina operaia" o "latte d'ape" (miscela di polline, acqua e miele); in seguito alla schiusa, e solo nelle prime ore con gelatina reale;
- I fuchi (maschi) provengono da uova non fecondate, deposte in celle più grandi e alimentati con gelatina operaia;
- Le api regina nascono in celle grandi e allungate in senso verticale che assumono l'aspetto di una ghianda e dette, appunto, celle reali. La larva, nata da un uovo fecondato, viene nutrita con gelatina reale prodotta dalle ghiandole ipofaringee e mandibolari delle operaie.



**Fig. 2** - A- Fuco; B- Regina; C- Operaia

Tutte e tre le caste (regina, fuchi e operaie) attraversano quattro fasi di sviluppo: uovo, larva, pupa e adulto (Fig.3).

- **Uovo**, viene deposto sempre in una cella disopercolata e la cui forma è diversa per le tre caste.
- **Larva**, subisce 5 mute, di cui l'ultima solo dopo che la cella è stata opercolata, diventando una prepupa, caratterizzata dalla formazione di un bozzolo di seta in cui si avvolge e si immobilizza;
- **Pupa**, inizia la metamorfosi durante la quale il corpo acquista la forma definitiva e la pigmentazione, si distingue: pupa con occhi non pigmentati, pupa con occhi rossi e infine pupa con occhi scuri.
- **Ape adulta**, che dopo aver rosicchiato l'opercolo esce dalla cella e sfarfalla.



**Fig. 3** - Ciclo di sviluppo delle api

Le fasi di sviluppo hanno durata diversa per ogni casta, 16 giorni per la regina, 21 giorni per l'operaia e 24 giorni per il fucò.

**L'ape regina** è l'unica in grado di deporre uova fecondate poiché è l'unica che si accoppia con i fuchi in quello che viene definito il “volo di fecondazione” o “volo nuziale” (Fig. 4). Nel corso di detto volo l'ape regina si unisce con più fuchi ed è in grado di conservare lo sperma all'interno di un organo deputato a ciò, detto “spermateca”, per tutta la sua vita (che dura massimo 5 anni). In seguito all'accoppiamento, la regina rientra nell'alveare ed inizia la deposizione delle uova nei favi, formando, dal centro, la cosiddetta “rosa di covata”. La regina può deporre fino a 2000 uova al giorno.



**Fig. 4.** Ape regina e fucò nel volo nuziale

Ciascun uovo fecondato dà origine ad un'ape operaia mentre le uova non fecondate danno origine ai fuchi. La regina passa quindi tutta la sua vita all'interno dell'arnia, eccezion fatta per i giorni dell'accoppiamento. La sua unica, ma fondamentale per la vita, attività consiste nell'ovideposizione. Quest'attività la impegna a tempo pieno, tanto che essa non si nutre autonomamente ma viene nutrita dalle api operaie. La regina, a differenza delle operaie, mangia soltanto pappa reale, secreta per il 60-80% dalla ghiandola ipofaringea e circa il 20-40% da quella mandibolare, le larve delle api operaie ricevono tale alimento solo nei primi giorni di vita (Sammataro e Avitabile, 1998).

La regina vive molto più a lungo delle operaie (4-5 anni, contro i 35 giorni, massimo 6 mesi di vita delle operaie). Produce una serie di ferormoni (di aggregazione, di inibizione degli ovari delle operaie, etc.) essenziale per la vita dell'alveare; il pungiglione non ha funzione di offesa, a parte quando lo usa contro altre regine, possibili rivali.

Il suo ciclo di sviluppo dura 15 giorni ed inizia quando la regina depone un uovo in un abbozzo di cella reale, costruito dalle operaie spinte dalla mancanza o attenuazione di uno specifico ferormone prodotto dalla regina stessa. Questo può accadere quando la famiglia è numerosa ed il ferormone non riesce a raggiungere tutte le api attraverso la trofallassi (scambio di cibo tra le operaie); oppure perché la regina inizia ad invecchiare e a perdere la capacità di produrre i ferormoni in quantità sufficiente ad inibire la costruzione della cella reale.

La cella dalla quale nascerà la regina, diversamente dalle altre celle di covata, è molto più grande e ha una posizione verticale ed ha la forma di una "ghianda".

La regina è l'ape più grande e snella, ha un grande addome turgido e lucente che sporge abbondantemente dalle ali per la presenza di un apparato genitale molto sviluppato.

**I fuchi** sono presenti nella colonia soltanto nel periodo fertile della regina (primavera-estate), poiché la loro funzione è solo quella riproduttiva. Passata la stagione utile, la regina non depone più uova ed i fuchi rimasti vengono scacciati dall'alveare o uccisi dalle operaie. La loro dieta, soprattutto nei primi giorni di vita, è ricca di polline poiché devono raggiungere la maturità sessuale a 12 giorni dallo sfarfallamento. Durante questo periodo i fuchi iniziano i voli di orientamento e aiutano le operaie a mantenere la covata alla giusta temperatura (circa 35° C) grazie all'attività dei muscoli toracici molto sviluppati. La durata della vita del maschio è variabile: se si accoppia, muore perché avviene l'estroffessione e la rottura dell'organo genitale; se ciò non avviene, può vivere fino ai 40-50 giorni.

La covata maschile è facilmente riconoscibile; infatti le cellette sono più grandi e gli opercoli, con i quali le operaie le chiudono, sono convessi.

Il ciclo di sviluppo del fuco è simile a quello della regina, ma più lungo; dalla deposizione dell'uovo, che si schiude dopo tre giorni, allo sfarfallamento dell'adulto, passano 24 giorni.

Dopo nove giorni e mezzo, infatti, le operaie chiudono la celletta con l'opercolo che verrà, poi, forato dall'individuo formato, dopo altri 14 giorni e mezzo.

Il fuco ha una conformazione tozza, che fa trasparire la sua forte resistenza al volo; occhi grandi che gli permettono una visione a 360° fondamentale per localizzare in volo la regina, e potenti antenne che permettono di captare gli odori della regina anche sulle lunghe distanze.

**Le operaie** sono la casta più numerosa e quella che svolge la maggior mole di lavoro.

Il ciclo di sviluppo delle operaie è di 21 giorni di cui, 3 giorni per la schiusa dell'uovo, 6 per lo stadio di larva prima dell'opercolatura e altri 12 giorni prima che l'adulto fuoriesca dalla celletta. Nei 6 giorni in cui l'ape si trova allo stadio di larva, viene nutrita dalle proprie compagne: per i primi 2 giorni vengono nutrite con pappa reale, poi la dieta cambia. La durata della vita varia da 30-40 giorni nella stagione attiva fino a 6 mesi durante la stagione fredda. Hanno un corpo ricoperto da una fitta peluria, sono piccole rispetto alla regina e ai fuchi, ali lunghe quasi quanto il corpo.

La vita delle api operaie può essere suddivisa in epoche entro le quali eseguono determinati lavori: per i primi tre giorni, in attesa che le ghiandole ipofaringee entrino in funzione, puliscono le cellette e le rivestono di propoli in questo caso si chiamano *spazzine*. Dal quarto giorno passano alla nutrizione delle larve più mature attraverso miele e polline e per i successivi tre giorni; quando le ghiandole entrano in attività, iniziano a produrre pappa reale con la quale nutrono per circa 7 giorni le larve giovani e la regina. Questo tipo di ape viene definita *nutrice*.

Quando iniziano a funzionare le ghiandole ceripare, l'ape si dedicherà, per 5 giorni, alla costruzione dei favi, alla maturazione del nettare e allo stoccaggio del miele e del polline. Queste api vengono definite *architette*. Gli ultimi 3 giorni, quelli che precedono le prime uscite dall'alveare, le api operaie

puliscono l'arnia, in particolare il fondo, da possibili detriti e dai cadaveri delle compagne eventualmente presenti; ventilando per creare, all'interno dell'arnia, quelle correnti d'aria utili alla deumidificazione del miele. Queste prendono il nome di *ventilatrici*.

Dal diciannovesimo al ventiduesimo giorno le api assumono il compito di *guardiane*, proteggono l'alveare da eventuali intrusi.

Gli ultimi giorni della loro vita, le api li passano tra l'alveare e l'ambiente esterno dal quale prelevando le sostanze indispensabili alla loro vita e a quella della colonia, divenendo così *bottinatrici*.

Anche le operaie, come la regina, producono ferormoni.

I principali sono:

- Il ferormone prodotto dalle ghiandole di Nosonov, situate negli ultimi tergiti (anelli) dell'addome, anche conosciuto come feromone dell'aggregazione che serve per richiamare le compagne verso l'alveare oppure verso fonti di pascolo inodori (ad esempio l'acqua) e durante la sciamatura;
- Il ferormone prodotto dalle ghiandole mandibolari e dalle ghiandole situate in prossimità del pungiglione conosciuto anche come feromone d'allarme in quanto stimola l'aggressività (quando un'ape punge in vicinanza dell'alveare, altre sue compagne la seguono in questa fatale azione).

La puntura per l'ape è fatale perché, in seguito a questa, il pungiglione, che è dotato all'estremità di piccoli uncini, rimane nella ferita inducendo la lacerazione dell'apparato digerente e delle ghiandole velenifere dell'ape che tende di liberarsi.

Per tutte le caratteristiche sopracitate, l'ape è un ottimo oggetto di studio.

Non solo la regina vive più a lungo delle operaie, ma all'interno della casta delle operaie esiste una differenza importante tra le api dell'estate, la cui vita non supera il mese, e le api che passano l'inverno e che sopravvivono per circa 7-8 mesi.

Ci sono varie ipotesi al riguardo, la prima riguarda l'attività di *bottinamento* di cui sono private le api invernali. L'età di *bottinamento* e la morte sono

strettamente correlate: le api che intraprendono precocemente i voli, muoiono altrettanto precocemente; la durata di vita delle api è legata al periodo dei primi voli di raccolta (Neukirch, 1982). Questo studio ha analizzato il metabolismo degli zuccheri marcati con il C<sup>14</sup> nell'organismo delle bottinatrici di tutte le età. È stato osservato che l'organismo delle giovani bottinatrici utilizza lo zucchero per costituire delle riserve energetiche, sotto forma di glicogeno, a livello dei muscoli del volo. Comportamento, invece, molto ridotto nelle api vecchie che consumano le proprie risorse e quindi una volta esaurito il glicogeno, non riescono più a prendere il volo e muoiono.

La riserva energetica, però, non spiega tutto. Le api che diventano bottinatrici in tarda età vivono più a lungo di quelle che iniziano precocemente, indipendentemente dai voli effettuati.

Le api che si sviluppano più velocemente invecchiano altrettanto velocemente (Guzmán-Novoa 1994; Page & Peng, 2001). La durata della vita totale di un'ape è, quindi, collegata al periodo che trascorre nell'arnia. Un'ape nata in estate può vivere 130 giorni se si mantiene costantemente sui favi di una covata in un'arnia in cui viene prelevata, con costanza, la covata opercolata, evitando l'emergere di giovani api (Haydak, 1963; Amdam et al., 2004) e ritardando l'inizio di attività delle bottinatrici.

Anche in assenza dell'attività di *bottinamento*, le api invecchiano: diventano, con il tempo, meno resistenti ai diversi fattori di stress, come la temperatura troppo elevata, la fame o lo stress ossidativo (Remolina et al., 2007).

L'inizio del *bottinamento* segna un profondo cambiamento sia comportamentale che fisiologico. Uno degli ormoni fondamentali degli insetti, l'ormone giovanile (neotenina), viene debolmente prodotta nelle api che svolgono attività all'interno dell'arnia, ma la sua produzione aumenta nelle bottinatrici. Viene modificato anche il sistema immunitario; le giovani api, per lottare contro patogeni, dispongono di due strumenti che possiamo paragonare ai nostri globuli bianchi: proteine del sangue e cellule specializzate (ematociti). Quando l'ape diventa bottinatrice, queste cellule ematiche vengono distrutte rapidamente. Questo è un fenomeno naturale utile al risparmio delle riserve

naturali della colonia, evitando, nelle bottinatrici, un costoso mantenimento di questa forma di immunità (Amdam et al., 2005).

La nutrice consuma polline in abbondanza. L'assunzione di polline, però, non compensa il consumo che determina l'alimentazione degli altri membri della colonia (Crailsheim 1992). L'ape costruisce, quindi, durante i primi giorni successivi allo sfarfallamento, delle riserve che consuma a poco a poco nel corso del suo ruolo di nutrice.

### **1.2.2 Superorganismo ape**

L'ape mellifera è un insetto sociale e vive in colonie costituite da migliaia di individui (da 10.000 a 100.000) e il legame che unisce tra loro i vari individui di una colonia è talmente forte che questa può essere paragonata ad un singolo individuo, si parla infatti di “superorganismo ape”. I singoli individui non hanno una propria autonomia a tal punto che un'ape, isolata dalle sue sorelle anche in presenza di acqua e alimento muore in poco tempo. La famiglia di api è un sistema capace di autogestirsi e di adattarsi puntualmente all'ambiente che lo circonda, grazie all'efficace metodo di comunicazione esistente fra le sue componenti: le api stesse. In definitiva, è come se ciascuna ape rappresentasse una cellula di un organismo e le diverse caste i diversi organi e che al pari di questi esplicano funzioni differenti. Le “cellule” sono quindi libere di allontanarsi per la ricerca di cibo o per difendere l'alveare ma solo per poco tempo. Esemplicando, i fuchi e la regina (unici individui fertili) rappresentano le gonadi dell'organismo, mentre le altre attività fisiologiche e metaboliche sono esplicate dalle operaie delle varie classi di età che rivestono ruoli diversi all'interno della colonia: le api ventilatrici e le api acquaiole sovrintendono alla termoregolazione, le bottinatrici alla nutrizione e le nutrici alla secrezione; le spazzine e le necrofore alla escrezione, mentre le ceraiole, con la costruzione dei favi del nido, esplicano una sorta di funzione scheletrica. La covata rappresenta il momento della moltiplicazione cellulare, mentre la sciamatura è il vero e proprio momento di riproduzione moltiplicativa dell'intero organismo (Fig. 5).

È anche presente un vero e proprio sistema immunitario, per cui le api guardiane difendono l'organismo dai pericoli esterni, mentre le raccoglitrici di propoli, grazie alle proprietà antibatteriche di questa sostanza, salvaguardano dai più comuni agenti patogeni. Le note capacità di comunicazione (ferormoni, danze interne ed orientamento esterno) indicano infine l'esistenza di una sorta di sistema nervoso che mette la colonia in relazione con il mondo circostante indagato, valutato, memorizzato e descritto dalle esploratrici. Con queste semplificazioni si vuol far comprendere come la sopravvivenza ed il successo di una famiglia dipendano dal mantenimento di complessi equilibri, la cui rottura determina l'indebolimento, spesso irrimediabile, dell'intero organismo. Ad esempio, la morte della covata comporta un rapido invecchiamento della colonia in quanto blocca il processo di rinnovamento degli individui adulti; la perdita della regina ne impedisce lo sviluppo, mentre alla morte delle api adulte segue normalmente quella degli stadi immaturi per mancanza di nutrimento e crollo della termoregolazione.



**Fig. 5** - Superorganismo ape

### **1.2.3 *Apis mellifera* in pericolo: principali minacce**

*“Se le api scomparissero dalla faccia della terra, all’uomo non resterebbero che quattro anni di vita”.*

Questa frase attribuita ad Albert Einstein dice molto sull’importanza delle api. Questi piccoli insetti sono essenziali per mantenere inalterato l’equilibrio ambientale e per salvaguardare la biodiversità.

Alla luce dell’importante ruolo che le api svolgono nell’impollinazione e nell’alimentazione dell’uomo, si comprende l’enorme attenzione che nell’ultimo decennio la comunità scientifica, e non solo, ha rivolto nei confronti dei fenomeni d’improvvisa e massiccia perdita di colonie di api, registrate sia negli USA che in Europa (Neumann e Carreck, 2010). Ripercorrendo i registri storici si nota come perdite di questo tipo non siano fenomeni inusuali. Possiamo fare riferimento alla *“the great mortality of bees”* di cui soffrì l’Irlanda nel 950, nel 992 e nel 1443 (Flemming, 1871). Uno dei casi più famosi e meglio documentati è la cosiddetta *“Isle of Wight disease”* del 1906 (Rennie et al., 1921), quando gli apicoltori della piccola isola a sud delle coste inglesi denunciarono la morte misteriosa di numerose colonie di api, descrivendo insetti che, colpiti da una sorta di paralisi, erano incapaci di volare (Moritz et al., 2010). L’analisi dei registri storici suggerisce, inoltre, che durante il XX secolo, in alcuni Paesi europei, quali Regno Unito, Paesi Bassi e Belgio, vi sia stato un calo nella biodiversità dei bombi e delle altre api selvatiche, ma che questo calo sia diminuito dal 1990 (Carvalho et al., 2013). A partire dal 1940, negli Stati Uniti il numero di colonie si è ridotto del 61% (Ellis et al., 2010); (VanEngelsdorp e Meixner, 2010), così come in Europa si è osservato un decremento del numero di arnie, che tra il 1970 e il 2007 sono passate da 21 a 15,5 milioni (FAO 2009); (Aizen and Harder, 2009).

Nell’ultimo decennio abbiamo però assistito ad una preoccupante impennata di questo trend negativo che si prefigura come conseguenza di una profonda crisi ecologica globale.

A questo fenomeno, che è probabilmente imputabile a diversi fattori, è stato dato il nome di *Colony Collapse Disorder* (CCD) o Sindrome da Spopolamento degli Alveari (Fig. 6).

Questa condizione patologica ha assunto intensità particolarmente preoccupante fra il 2005 ed il 2008.

I sintomi che caratterizzano gli alveari colpiti da CCD comprendono (van der Zee et al., 2013):

- Rapida perdita delle api operaie;
- Presenza di covata opercolata all'interno delle colonie;
- Operaie molto giovani e presenza della regina;
- Assenza di operaie morte all'interno o in prossimità delle colonie prossime allo spopolamento, il che fa ipotizzare che la morte avvenga in campo;
- Abbondanza di scorte di miele e polline all'interno delle colonie spopolate non oggetto di saccheggio da parte delle colonie sane vicine;
- Tardiva invasione dell'alveare spopolato da parte di parassiti e altri intrusi (ad esempio *Aethina tumida* e *Galleria mellonella*);
- Livelli bassi e non dannosi di *Varroa* e/o di *Nosema*.

Molti apicoltori interessati dal fenomeno hanno riferito che, almeno due mesi prima della segnalazione della CCD, le loro colonie si trovavano in una condizione di stress, con api apparentemente disorientate e con difficoltà di coordinamento motorio (Schmuck et al., 2001); (Lucci S., 2008); (Kaplan , 2008).

Le attuali ipotesi sulle cause della CCD prendono in considerazione:

1. Infestazione da *varroa*;
2. Patologie emergenti o riemergenti come la Nosemiasi da *Nosema ceranae* (Higes et al., 2006) e le virosi (Cox-Foster et al., 2007);
3. Avvelenamenti da pesticidi, intesi sia come fitofarmaci che come farmaci utilizzati per il controllo dei patogeni nell'alveare;
4. Le pratiche apistiche errate;
5. Le pratiche agricole errate;
6. Fattori ambientali come i cambiamenti climatici;

7. Fattori nutrizionale quali la carenza o il basso valore nutrizionale del polline ma anche le radiazioni elettromagnetiche, i metalli pesanti, etc.

Sembra comunque che nessuna causa da sola sia in grado di indurre CCD ma che l'azione combinata di più cause sia responsabile di un effetto immunodepressivo e conseguente CCD. In Italia segnalazioni di perdita di colonie in primavera-estate sono state principalmente ascritte ad avvelenamento da pesticidi, mentre le morie invernali sono state ricondotte ad infestazioni elevate di *Varroa destructor* e forme virali ad essa associate (Mutinelli e coll., 2010).

A livello europeo, tra i fattori di rischio delle perdite invernali sono state riportate coinfezioni di *Varroa destructor*, Virus delle ali deformi o *Deformed Wing Virus* (DWV) (Genersch e coll., 2010; Dainat e coll., 2012;) e Virus della paralisi acuta o *Acute Bee Paralysis Virus* (ABPV) (Genersch e coll., 2010). A tutt'oggi si stanno indagando le possibili cause di perdita delle colonie.

Numerosi sono i virus responsabili di infezione nelle api mellifere e alcuni di essi (in particolare quello israeliano della paralisi acuta o *Israeli Acute Paralysis Virus* (IAPV) sono ritenuti coinvolti nei fenomeni di spopolamento degli alveari, che rientrano nella nota sindrome CCD.

L'acaro della *Varroa destructor* è oggi ritenuto responsabile dell'induzione e della trasmissione di infezioni virali in particolar modo del DWV. È stato infatti dimostrato che elevati livelli di infestazione da *varroa* determinano, oltre che danni diretti, effetti depressivi sulle difese immunitarie delle api, tali da facilitare lo sviluppo di infezioni virali che possono portare alla CCD (Di Prisco e coll., 2013). Anche il microsporidio di recente introduzione in Italia, *Nosema ceranae*, sembra avere notevole importanza nel fenomeno della CCD, soprattutto in rapporto alle eventuali sue interazioni (additive, antagonistiche, sinergiche) con altri patogeni, secondo un approccio innovativo rispetto a quello dell'equivalenza: un patogeno = una malattia.



**Fig. 6 - Colony Collapse Disorder (CCD)**

#### 1.2.3.1 Infestazione da *varroa*

Una delle più grandi minacce per l'apicoltura è rappresentata dall'acaro parassita *Varroa destructor* (Anderson e Trueman, 2000). I primi episodi verificatisi negli anni '80 hanno provocato grandi morie di api causate dalla *Varroa destructor* e dall'acaro della trachea *Acarapis woodi*, mentre le infestazioni dovute alla *Varroa*, segnalate a metà degli anni '90 negli Stati Uniti, hanno visto l'eliminazione della maggior parte delle api selvatiche nord americane (Johnson, 2010).

Il genere *Varroa* comprende 4 ectoparassiti obbligati: *V. jacobsoni* Oudemans che fu descritta per la prima volta in Indonesia come acaro parassita di *A. cerana* (Oudemans, 1904), *V. underwoodi* descritta come parassita di *A. cerana* in Nepal (Delfinado-Baker and Aggarwal, 1987), *V. rinderei* associata ad *A. koschevnikovi* in Borneo (De Guzman and Delfinado-Baker, 1996) e *V. destructor*, descritta per la prima volta sul suo ospite originale *A. cerana*, e in passato erroneamente classificata come *V. jacobsoni*, dalla quale è stata poi distinta sulla base di studi morfologici e analisi del DNA mitocondriale (Anderson and Trueman, 2000).

*V. destructor* non ha ricevuto una grande attenzione da parte del mondo scientifico fino a quando, in seguito all'introduzione dell'*A. mellifera* nell'Asia

sud-orientale a fini produttivi, si è verificato il passaggio del parassita sul suo nuovo ospite, con conseguente diffusione in quasi tutto il mondo (Boecking and Genersch, 2008).

Dal punto di vista morfologico, la *Varroa* presenta un marcato dimorfismo sessuale. La femmina adulta di colore rosso brunastro, ovale ed appiattita, ricca di peli e spinette, che le facilitano l'attacco al corpo dell'ape, è l'unico stadio libero di muoversi all'interno dell'alveare. Il maschio notevolmente più piccolo della femmina, rotondeggiante, di colore chiaro muore subito dopo l'accoppiamento. La femmina di *V. destructor* passa l'inverno sul corpo delle api, siano esse operaie o fuchi, alimentandosi dell'emolinfa. In primavera, con la ripresa dell'allevamento di covata, cerca una cella contenente una larva matura di ape prossima all'opercolatura, si fa chiudere con essa e inizia a deporre le uova. Se sono presenti celle prossime all'opercolatura, contenenti sia larve mature di operaie sia di fuco, l'acaro prediligerà queste ultime poiché, avendo una durata della fase opercolata maggiore, esse permettono a *V. destructor* di produrre una femmina feconda in più rispetto a quanto avverrebbe con una larva di sesso femminile (Fig. 7). La femmina di *V. destructor*, allorché viene chiusa all'interno della cella, continua a nutrirsi utilizzando inizialmente, i residui alimentari lasciati dalla larva e successivamente, l'emolinfa della stessa larva e della susseguente pupa, completando così la maturazione dell'uovo, con formazione della ninfa fino alla forma adulta. Le generazioni del parassita si susseguono fino a quando è presente la covata. Convenzionalmente, si suole distinguere i danni inferti direttamente da *V. destructor* al suo ospite da quelli provocati ma non causati direttamente dall'acaro; tuttavia, la distinzione fra danni diretti e danni indiretti non è sempre chiara. I danni che *V. destructor* arreca ad una famiglia di api sono: - fastidio, dovuto alla presenza di una o più *varroa* in movimento continuo sul corpo; - dolore, dovuto alle ferite praticate dall'acaro per la nutrizione; - diffusione di patologie veicolate dall'acaro proveniente da altri alveari affetti da gravi malattie; - ingresso di microrganismi dannosi quali Virus, Batteri e Miceti veicolati dal rostro durante la sua penetrazione.

A questo proposito, è necessario ricordare che la maggior parte delle api europee sono infettate dal DWV ed è stato altresì accertato che l'infestazione parassitaria da parte di *varroa* determina la proliferazione di virus presenti in forma latente, dando luogo a pericolose infezioni conclamate. Perciò, risulta alquanto labile il confine fra i danni inferti direttamente dalla *varroa* e indirettamente tramite i virus, che vengono attivati dalla parassitizzazione. In altre parole, risulta in molti casi impossibile discernere quali fra gli effetti negativi conseguenti alla parassitizzazione da *varroa* dipendano dall'attività trofica dell'acaro (danni diretti) e quali dipendano invece indirettamente dalla replicazione dei virus.



**Fig. 7 - Varroa su pupa**

Gli acari, succhiando l'emolinfa, determinano indebolimento, diminuzione di peso, deformità e riduzione della durata della vita delle api. L'indebolimento aumenta la sensibilità delle api alle infezioni fungine, batteriche e virali (Belletti P.A., 2008; Bignami L., 2008). La riduzione particolarmente significativa del peso corporeo indotta dalla *varroa* sembra dipendere dal numero di acari-madre e dalla consistenza numerica della prole, sebbene anche un singolo parassita determini un calo del peso dell'ape operaia di circa il 7% (De Jong et al., 1982). È stato osservato una riduzione del peso anche nei fuchi parassitati, i quali evidenziano, inoltre, una riduzione nelle loro prestazioni di

volò che è tanto maggiore quanto più numerosi sono gli acari che li parassitano (Duay et al., 2002).

Le api operaie che vengono parassitate durante il loro sviluppo passano precocemente da nutrici a bottinatrici in pratica presentano una riduzione della loro aspettativa di vita (De Jong et al., 1982; Amdam et al., 2004).

Le bottinatrici parassitate evidenziano anche una riduzione dell'apprendimento associativo (Kralj et al., 2007) e una minore capacità di ritornare all'alveare (Kralj e Fuchs, 2006).

### 1.2.3.2 Patologie emergenti o riemergenti

#### - *Nosemiasi*:

malattia infettiva altamente contagiosa che colpisce le api adulte (operaie, fuchi e regine), causata da due diverse specie di funghi unicellulari, parassiti endocellulari obbligati, sporigeni, appartenenti alla classe dei *Microsporidi*, famiglia *Nosematidi*, genere *Nosema*: *N. apis* e *N. ceranae* che vivono e si moltiplicano nelle cellule epiteliali del mesointestino delle api.

L'ape si infetta per via orale e l'agente infettivo è la spora. Una volta ingerita, la spora in breve tempo (dopo 10-15 minuti) giunge nel mesointestino; qui a contatto con i succhi gastrici, germina e grazie all'accumulo nella spora di una forte pressione si ha l'estroffessione dell'organo di attacco, il "filamento polare", che può raggiungere lunghezza di circa 100 volte superiore a quella della spora e che permette alla forma vegetativa di penetrare nelle cellule intestinali dell'ospite e di moltiplicarsi, alterandone così la funzionalità. Nella cellula si attiva la fase merogonica che dà origine ad una forma ameboide detta meronte. Questa nelle cellule epiteliali si riproduce fino a riempire l'intera cellula. I meronti si trasformano in merozoiti; dopodiché inizia la fase sporogonica con la trasformazione in sporonti, in sporoblasti ed infine in spore. Successivamente una parte delle spore infetta le altre cellule sane fino a compromettere l'intero mesointestino, mentre la rimanente parte continua a moltiplicarsi fino ad indurre la rottura delle cellule con conseguente liberazione delle spore nel lume intestinale e la successiva eliminazione di esse con le feci.

Esiste un dimorfismo nelle spore e cioè ci sono spore con parete più sottile, che germinano dentro la stessa cellula, e spore con parete più spessa, che vengono riversate nel lume intestinale e rappresentano le spore durevoli, responsabili della diffusione della malattia tra un individuo e l'altro. In condizioni di temperatura ottimali per lo sviluppo (30-35°C), il ciclo dall'ingestione della spora alla produzione di nuove spore durevoli può essere completato in 48-60 ore (Kellner N., 1980). Gli elementi infettanti sono rappresentati dalle spore, che vengono espulse dall'ape con le feci, e possono rimanere vitali nell'ambiente per oltre un anno. La via principale dell'infezione è dunque oro-fecale, anche se sembra che la trofallassi possa giocare un ruolo importante nella diffusione soprattutto per *Nosema ceranae*.

Tutte le api adulte sono suscettibili al *Nosema spp.*; tuttavia risultano infette con una maggiore frequenza le api operaie, probabilmente a causa dell'attività di pulizia dei favi e alla attività di *grooming* a cui sono addette e a cui la regina e i fuchi non partecipano (Bailey L., 1972). Le api neo sfarfallate non sono infette e probabilmente contraggono la malattia quando iniziano l'attività di nutrici e di spazzine. Sembra che le operaie infette nutrano la regina in misura minore rispetto alle sane, in modo da ridurre il rischio di infezione che potrebbe avvenire tramite l'apparato boccale contaminato delle api infette.

Se la regina si infetta, le sue ovaie vanno incontro a degenerazione con atrofizzazione degli oociti e conseguente riduzione della capacità di ovideposizione (Farrar CL., 1947).

Le regine che diventano infette durante la stagione riproduttiva vengono sostituite dalle api ed è probabile che buona parte dei casi di orfanità invernali sia dovuta a infezioni da *Nosema spp.* Le api nutrici altamente infette probabilmente muoiono rapidamente e prima di evidenziare i sintomi clinici della malattia a causa di una estesa necrosi dell'epitelio ventricolare responsabile di una intensa perdita di acqua e conseguente disidratazione (Maiolino et al., 2014). Le api infette hanno quindi una longevità ridotta e una funzionalità compromessa delle ghiandole ipofaringee che, essendo alterate, riducono la produzione di enzimi proteolitici, compromettendo così la capacità di digerire le fonti nutritive e soprattutto quella proteica. Si ha una riduzione

dell'accumulo di proteine nei corpi grassi cioè delle proteine di riserva a cui l'organismo attinge man mano ed in misura dei propri bisogni. Ma queste riserve hanno dei limiti e quando sono esaurite le api andrebbero incontro ad un invecchiamento precoce, che le porta ad iniziare precocemente l'attività di *bottinamento*. Questo potrebbe essere dovuto a un meccanismo di compensazione della colonia, che sopperirebbe alla perdita di bottinatrici con la riduzione dell'età delle api stesse (le nutrici diventano prima bottinatrici) oppure la ridotta capacità di digerire le proteine sarebbe la causa di un alterato sviluppo delle ghiandole ipofaringee che renderebbe l'ape incapace di diventare nutrice (riduzione del numero di nutrici e quindi un numero maggior di bottinatrici). L'infezione da *Nosema spp.* provoca anche riduzione della capacità di orientamento: è stato dimostrato che le api infette ritornano con minore frequenza all'alveare e hanno più difficoltà nel ritrovare il nido e Tutto ciò provocherebbe una maggiore perdita di api in volo e quindi un lento e progressivo spopolamento della colonia (Kralj J and Fuchs S.,2010).

In Italia, la Nosemiasi è ormai considerata una patologia endemica in quanto sembra essere presente allo stato latente in tutti gli alveari. Fattori che vanno ad alterare l'equilibrio della colonia come inverni lunghi e freddi che non permettono alle api di uscire, primavere fredde e piovose, estati umide con scarso raccolto, favoriscono lo sviluppo della malattia (Retschnig et al., 2017). È riportato inoltre che l'esposizione delle api a dosi sub-letali di pesticidi *fipronil* e *thiacloprid*, causa tassi di mortalità maggiori nelle colonie già affette da *Nosema ceranae* rispetto a quelle non infette. L'esposizione combinata delle api al pesticida *imidacloprid* e al parassita *Nosema*, determina indebolimento delle api con conseguente elevata mortalità ed elevata suscettibilità all'azione di altri patogeni (Cedric et al.,2010). A tale proposito è bene ricordare che l'incidenza del protozoo *Malpighamoeba mellificae* e del virus della cella reale nera (Black Queen Cell Virus – BQCV) è più alta in api infette da *N.apis* (Bailey L. and Fernando E.F.W., 1972) e che infezioni da *N. ceranae* possono promuovere nelle colonie lo sviluppo della covata calcificata e il virus della paralisi cronica (Hedtke et al.,2011). È possibile quindi che i pesticidi rendano le api più deboli e quindi più facilmente attaccabili da eventuali agenti

patogeni, così come è probabile che api colpite da patologie risultino più sensibili ai contaminanti ambientali (Vidau et al.,2011).

#### - **Virosi**

I virus rappresentano una delle principali minacce per la salute ed il benessere delle api. Questi attaccano le api in ogni fase dello sviluppo e senza distinzione di casta. Alcuni studi hanno dimostrato che in una singola ape possono essere presenti numerosi virus contemporaneamente, così come più virus possono essere ritrovati in più api di una stessa colonia (Chen et al., 2004; Baker e Schroeder, 2008). La prevalenza dei virus sembra essere temporale: la maggior parte delle infezioni si presentano nel periodo estivo (Runckel et al., 2011). La trasmissione avviene sia orizzontalmente, tra individui della stessa generazione, che verticalmente, dalla madre infetta alla prole (Chen et al., 2006).

I virus identificati ad oggi nelle api sono 21 (in Tab. 1 sono riportati i più comuni), tra questi “*Black Queen Virus*”, “*Deformed Wing Virus*” e “*Acute Bee Paralysis Virus*”, sono quelli più diffusi e capaci di indurre segni clinici evidenti.

**Tab. 1 - Virosi delle api**

<b>Virus</b>	<b>Abbreviazione</b>	<b>Sintomatologia</b>
<b>Paralisi acuta</b> <b>Paralisi lenta</b>	APV SPV	Morte delle api adulte e della covata, con conseguente spopolamento
<b>Arkansas</b>	ArkV	Morte delle api tra il 15° e 25° giorno
<b>Celle reali nere</b>	BQCV	Virus legato al nosema. Morte pupe reali, celle reali nere
<b>X</b>	BVX	Infezione intestinale, forte mortalità invernale
<b>Y</b>	BVY	Mortalità primaverile associate al Nosema
<b>Mal nero</b>	CBPV	Api nere senza villo
<b>Ali opache o deformi</b>	CWV DWV	Ali deformate e opache, muscoli rachitici. Si annida nelle trachee
<b>Egiziano</b>	EBV	Mortalità della covata allo stadio di ninfa
<b>Filamentoso</b>	FBV	Aspetto lattiginoso dell'emolinfa. Associato al Nosema
<b>Covata a sacco</b>	SBV	Colpisce la covata, lo scheletro diventa come un sacco nero
<b>Kakugo</b>	Kv	Colpisce le api operaie che si dimostrano molto aggressive

### 1.2.3.3 Agrofarmaci e farmaci

Tra i fattori esterni all'alveare, sono particolarmente critici e rilevanti i trattamenti fitosanitari, soprattutto quelli effettuati in primavera-estate nelle aree a coltivazione intensiva. La maggior parte delle sostanze attive utilizzate è altamente tossica per le api e gli effetti possono essere immediati e vistosi se le api vengono colpite e uccise direttamente (avvelenamento acuto) e vengono quindi rinvenute davanti all'arnia (Fig.8) più subdoli e difficili da collegare alla causa quando si tratta, di sostanze che non inducono morte rapida (avvelenamento cronico) in quanto agiscono come agenti di stress e/o agiscono in maniera sinergica contribuendo al declino della competenza immunitaria delle api. Le api in questo caso presenteranno alterazioni comportamentali con compromissione dello svolgimento delle funzioni quali disorientamento ed incapacità di ritornare al nido (spopolamento dell'alveare).



**Fig. 8** - Ape morta davanti all'arnia per avvelenamento acuto

Di questi fanno parte numerosi insetticidi di nuova generazione oggi oggetto di numerose ricerche quali: i neonicotinoidi, i cloroderivati, i carbammati, gli organofosforici e i piretroidi (Judy Y. Wu et al., 2011). I neonicotinoidi sono insetticidi sintetici utilizzati per proteggere le colture, in particolare il mais, dall'azione di parassiti quali gli afidi, i tisanotteri, alcuni micro-lepidotteri ed un certo numero di coleotteri (Jeschke et al., 2011).

Questi insetticidi furono messi in commercio agli inizi del 1990 e sono divenuti, in breve tempo, gli insetticidi più venduti al mondo (Jeschke et al., 2011) (Fig.8). Essi esplicano la loro funzione agendo come agonisti dei recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChR) in modo irreversibile portando gli organismi a paralisi e morte (Brown et al., 2006; Palmer et al., 2013).

A rendere difficoltosa la vita delle api non sono soltanto l'utilizzo dei fitofarmaci impiegati in agricoltura, ma anche e soprattutto il "fai da te" di troppi allevatori nell'utilizzare i farmaci, per lo più veterinari, per la cura delle più comuni malattie che colpiscono le api. Tra i farmaci più comunemente impiegati in apicoltura ci sono gli acaricidi e gli antibatterici in particolare gli antibiotici. L'impiego di acaricidi in apicoltura è diventata una pratica comune ed irrinunciabile da quando l'acaro *Varroa destructor* ha fatto la sua comparsa in Europa (anni 70). Considerata l'impossibilità di eradicare la varroasi, scopo degli interventi è quello di mantenere l'infestazione sotto controllo. I principi attivi maggiormente utilizzati sono gli acidi organici (acido formico, ossalico, lattico), i piretroidi (flumetrina, fluvalinate), gli organofosforici (coumafos), l'amitraz e gli oli essenziali (il timolo in particolare). Le modalità di applicazione degli acaricidi sono strettamente legate alle loro caratteristiche chimiche. L'impiego di supporti evaporanti è riservato agli oli essenziali e all'acido formico che esplicano un'azione acaricida in funzione della concentrazione che i loro vapori raggiungono all'interno dell'arnia. Soluzioni acquose con aggiunta di zucchero sono utilizzate per l'acido ossalico, mentre soluzioni acquose con o senza aggiunta di zucchero sono utilizzate per organofosforici e cimiazolo (strutturalmente affine all'amitraz).

L'applicazione di piretroidi e amitraz avviene mediante strisce in PVC impregnate del farmaco, che viene progressivamente rimosso dal contatto con le api.

I principi di buona pratica apistica e le istruzioni per l'uso dei diversi prodotti anti *varroa* raccomandano che qualsiasi trattamento sia eseguito in assenza di melario, cioè in condizioni tali da prevenire l'accumulo di residui di eventuali trattamenti nel miele, indipendentemente dal principio attivo, dalla modalità di applicazione, dal tempo di sospensione e dall'esistenza di un limite

massimo residuale (LMR). Sebbene l'uso di farmaci ad attività antibatterica non sia autorizzato in apicoltura, il ricorso a sulfamidici ed antibiotici è una pratica frequente e strettamente legata al controllo di malattie batteriche come la peste europea e la peste americana, nonché della nosemiasi. Le formulazioni e i dosaggi di tali sostanze sono spesso empirici, basati sull'esperienza e non sempre rispettosi dell'attività produttiva delle api e dei principi di sicurezza alimentare. Infatti, i trattamenti coincidono con i periodi di bottinatura e quindi di produzione del miele, con il conseguente rischio di determinare la presenza di residui in tale alimento. I principi attivi maggiormente utilizzati e oggetto di non conformità sono attualmente vari sulfamidici (sulfadiazina, sulfametazina, sulfatiazolo, sulfametossazolo, sulfadossina, sulfadimetossina), tetracicline (ossitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina) ed altre molecole come streptomina, tilosina e cloramfenicolo.

A parte quindi l'efficacia di tanti preparati illeciti, che potrebbe essere scarsa o quantomeno uguale a prodotti simili notevolmente più economici (come, ad esempio, la validissima e sicura soluzione zuccherina di acido ossalico di facilissima preparazione, ormai largamente usata per il trattamento invernale della varroa e che non dà problemi di resistenza), non si conoscono gli impatti negativi sulle api, sul miele e sulla cera, sia per quanto riguarda le concentrazioni e i dosaggi, sia per il contenuto di sostanze estranee o sconosciute e comunque di possibile nocività (diluenti, solventi, acidi vari ecc.).

L'Apicoltore, manca, in genere, di razionalità ed è portato a non applicare i programmi d'intervento coi prodotti registrati e consigliati e, soprattutto, di non rispettare i tempi e i dosaggi previsti, non soltanto danneggiando se stesso ma anche gli altri. L'Apicoltore, inoltre, molto spesso è portato a modificare anche ciò che non dovrebbe, come, ad esempio, l'errata o ripetuta applicazione di medicinali a volte impropri o sconsigliati per ragioni di resistenza o di stagionalità; i dosaggi e le modalità di somministrazione consigliate; la realizzazione di veri e propri mix tra prodotti autorizzati e non ai fini di un rinforzo del risultato atteso nella lotta ad alcune patologie delle api.

#### 1.2.3.4 Pratiche agricole errate

Altro fattore che sembra contribuire all'indebolimento delle colonie ed è quindi corresponsabile dei fenomeni di CCD è la sempre più diffusa presenza di terreni monocolturali e le pratiche indotte da questi quali l'utilizzo di grandi quantità di pesticidi. Le monocolture infatti, limitano necessariamente la disponibilità di fonti alimentari per le api, causandone la malnutrizione e quindi indebolimento. Le monocolture, come ad esempio i cereali, sono scarse di polline e di nettare e la scomparsa delle piante spontanee, come il trifoglio bianco, ha sottratto alle api una fonte sicura di nutrimento. Rispettare le api non significa solo non arrecare danni al settore apistico, ma significa anche salvaguardare la loro azione pronuba, sia nei confronti delle piante agrarie (soprattutto quelle sementiere e ortofrutticole) incrementando le produzioni, sia nei confronti delle piante spontanee, importanti per la difesa del suolo e dell'ambiente.

#### 1.2.3.5 Pratiche apistiche errate

Nel rispetto del proverbio che recita: "la prevenzione è la miglior cura", le buone prassi di allevamento in apiario (BPA) implicano una corretta gestione igienico-sanitaria degli alveari; realizzando in tal modo una prevenzione delle malattie delle api. Al tempo stesso, l'applicazione delle buone pratiche apistiche permettono anche di ottenere prodotti dell'alveare di qualità, nel rispetto della salute del consumatore. L'applicazione delle buone prassi di allevamento in apiario, anche se non comporterà una assenza totale delle malattie, ne diminuirà certamente l'incidenza, comportando una diminuzione dei costi necessari al rimpiazzo delle arnie morte, un aumento delle produzioni dal punto di vista quali-quantitativo ed un costante miglioramento del patrimonio genetico delle api possedute.

Tra le cause responsabili di CCD meritano di essere menzionati anche:

- **Campi elettromagnetici:** Secondo una preliminare ipotesi formulata dai ricercatori dell'Istituto di Scienze Naturali dell'Università Landau, le

radiazioni emesse dai cellulari potrebbero essere responsabili della CCD (Stever et al., 2006). L'ipotesi è che le radiazioni possano interferire con il sistema d'orientamento degli insetti, impedendo loro di rintracciare la via dell'arniae di morire altrove (Korall, 1987). Recenti indagini (Kimmel et al. 2007) condotte utilizzando stazioni base per telefoni cellulari di recente generazione hanno mostrato una differenza significativa nella capacità di ritorno all'alveare tra le api esposte e il controllo non esposto. Al di là di qualsiasi effetto, è stato comunque dimostrato che le api sono perfettamente in grado di discriminare anche tra diversi campi magnetici (Walker e Bitterman, 1985) e quindi possiamo supporre che variazioni dovute ad interferenze di origine antropica possano confonderle fino ad impedir loro di rientrare al nido generando conseguenze simili a quelle descritte per il CCD. Tuttavia, le indagini statistiche finora effettuate sono lontane dall'avere dato una risposta definitiva al problema.

- **Metalli pesanti.** A differenza dei fitofarmaci il tasso di mortalità delle api, non può essere impiegato per monitorare i livelli di inquinamento da tali sostanze perché le api, non vengono uccise né dal piombo, né dagli altri metalli, almeno a concentrazioni già preoccupanti dal punto di vista ecologico-ambientale. Le ricerche effettuate a tutt'oggi non hanno evidenziato una contaminazione ambientale da cadmio e cromo significativa, mentre la contaminazione da piombo si è manifestata a bassi livelli di concentrazione. Nonostante ciò la presenza di metalli tossici sulle api e nei prodotti dell'alveare e soprattutto nel miele si sta dimostrando un indicatore sensibile della presenza di tali sostanze nell'ambiente, nonché il più facilmente reperibile. Questo permette di usare le api e i loro prodotti come biondicatori. L'utilizzo di organismi animali come sistema di allerta per rilevare il rischio di contaminazione ambientale sulla salute umana è noto sin dal secolo scorso, infatti nel 1997 il professore Stahl introdusse il concetto di "animale sentinella" ovvero animali che, quando sono esposti ai contaminanti ambientali, forniscono dati, i cosiddetti frammenti di informazione, che vengono analizzati per identificare e/o monitorare

inquinanti ambientali pericolosi per la salute umana, per le diverse specie animali e per gli ecosistemi.

Negli ultimi anni sono stati compiuti particolari sforzi nel tentativo di porre rimedio a queste inspiegabili morie avvenute con crescente frequenza nell'area geografica del Nord ed il bacino padano, mentre il problema sembra relativamente trascurabile o in parte più contenuto nelle Regioni del Sud dell'Italia e nelle isole maggiori. Un quadro ancora incerto emerge per le Regioni centrali dove tuttavia non mancano segnalazioni di cospicue perdite di colonie. È interessante citare l'attività dell'Osservatorio Nazionale della Produzione del Mercato e del Miele che in due successivi *Reports* resi noti nel periodo primaverile del 2008 ha cercato di quantificare le dimensioni del fenomeno segnalando tra l'altro il coinvolgimento del Sud dell'Italia ed evidenziando andamenti particolarmente sfavorevoli nel bacino padano. Secondo quanto informa l'Osservatorio “gli apicoltori hanno riferito di aver trovato famiglie non sviluppate, deboli o in ritardo nello sviluppo della covata. La stessa informativa segnala una buona ripresa delle condizioni delle api soprattutto al centro e al sud, anche se nell'interno delle regioni centro-meridionali le cattive condizioni meteorologiche del mese di marzo ne hanno rallentato lo sviluppo. La ripresa primaverile sembra comunque molto ritardata, con il rischio, per molti apicoltori di avere le api sulle prime fioriture non pronte per il raccolto”.

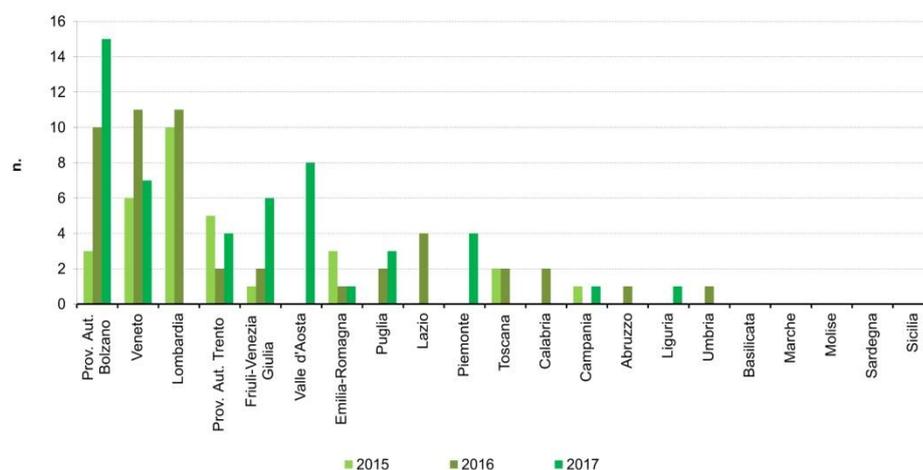
Dati interessanti sulle recenti morie riguardanti il nostro paese, provengono dall'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA).

L'ISPRA nel 2011, infatti, ha partecipato, e lo fa tutt'ora, ad attività di ricerca mirate a stabilire i possibili fattori di mortalità delle colonie di api, anche a seguito delle diverse pratiche fitoiatriche implementate nelle aree naturali e ad interesse agricolo (Bellucci et al., 2010).

I dati raccolti nel 2015 e nel 2016 hanno permesso di evidenziare un effettivo aumento dei casi di moria di api. Nel corso del 2016 sono state registrate 49 segnalazioni di mortalità o spopolamenti di alveari, mentre per l'anno precedente 2015 le morie di api registrate sono state 31. Queste

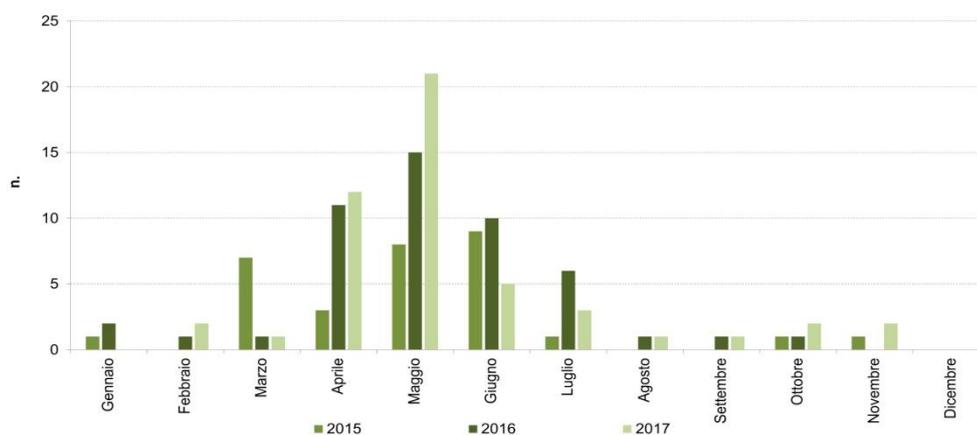
segnalazioni sono suddivise per regione (Fig. 9). Le regioni e le province nelle quali si è registrato il maggior numero di segnalazioni di morie e spopolamenti di alveari sono state nel 2016 il Veneto e la Lombardia, entrambi con 11 casi osservati, seguito da 10 casi registrati nella provincia autonoma di Bolzano. Nel 2015 invece la regione con maggior numero di episodi (10 casi) è stata Lombardia, seguita dal Veneto e da Trento con rispettivamente 6 e 5 casi. Nel 2017 invece, la maggioranza dei casi osservati si evidenzia nella provincia autonoma di Bolzano (15), seguita da Valle d'Aosta (8) e Veneto (7).

Anche nel 2017, quindi, si conferma l'incremento dei casi di moria registrati. Quanto osservato non è solo imputabile all'accresciuta esposizione ai prodotti fitosanitari, ma anche all'aumento della sensibilità nella rilevazione da parte di apicoltori e organi di controllo preposti. Nel corso del 2016, come anche nel 2017, il numero di casi di morie di api presenta un aumento, raggiungendo rispettivamente i 49 e 50 casi. L'istituzione di un'attività di monitoraggio sistematica sugli avvelenamenti delle api, attivata nel luglio 2014 dal Ministero della salute, ha consentito, a partire dal 2015, di rilevare in modo ufficiale i casi di avvelenamento, evidenziando un costante incremento dei casi di morie delle api denunciati, indicando anche i possibili impatti sull'ambiente correlati all'impiego di prodotti fitosanitari.



**Fig. 9** - Casi di morie di api registrati per regione dal 2015 al 2017 (ISPRA)

Infine dall'analisi del trend annuale di morie si evince che i mesi con maggior numero di casi di morie sono aprile, maggio e giugno, coincidenti con le fioriture primaverili (Fig. 10). In tali periodi, nei quali è vietato effettuare trattamenti fitosanitari, le api svolgono un'intensa attività di *bottinamento* che le rende maggiormente vulnerabili alla presenza di inquinanti diffusi presenti nell'ambiente, come i fitosanitari nelle aree agricole dopo i trattamenti (<http://www.isprambiente.gov.it/it>).



**Fig. 10** - Casi di morie di api registrati nel corso dei diversi mesi dal 2015 al 2017 (ISPRA).

## 1.2.4 Cambiamenti climatici

Fra i fattori responsabili di CCD o dei casi di morie delle api riscontrati negli ultimi anni (2018-2019) nel nostro paese particolare attenzione meritano i cambiamenti climatici. E' stato ormai ampiamente dimostrato che il clima ha subito una progressiva fase di riscaldamento a partire dal 1880 al 2008.

Questo periodo di quasi 130 anni può essere microscopicamente suddiviso in tre stadi progressivi di sviluppo (Fig. 11):

1. Primo periodo di riscaldamento dal 1910 e fino al 1945;
2. Fase di parziale raffreddamento (periodo fresco) che va dall'immediato periodo del secondo dopoguerra fino alla fine degli anni ottanta;
3. Ultima fase, quella attuale, caratterizzata da una più intensa ripresa del *global warming*.

Possiamo indicare tra le cause di questi sconvolgimenti climatici anche il fattore antropico che ha assunto crescente importanza a partire dal 1850. Vengono chiamati in causa diversi aspetti tra questi, principalmente, la crescente importanza delle emissioni antropogeniche di gas-serra (principalmente CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>) in associazione ad altri determinanti di origine naturale per le quali permangono incertezze e connessioni non facilmente quantificabili.

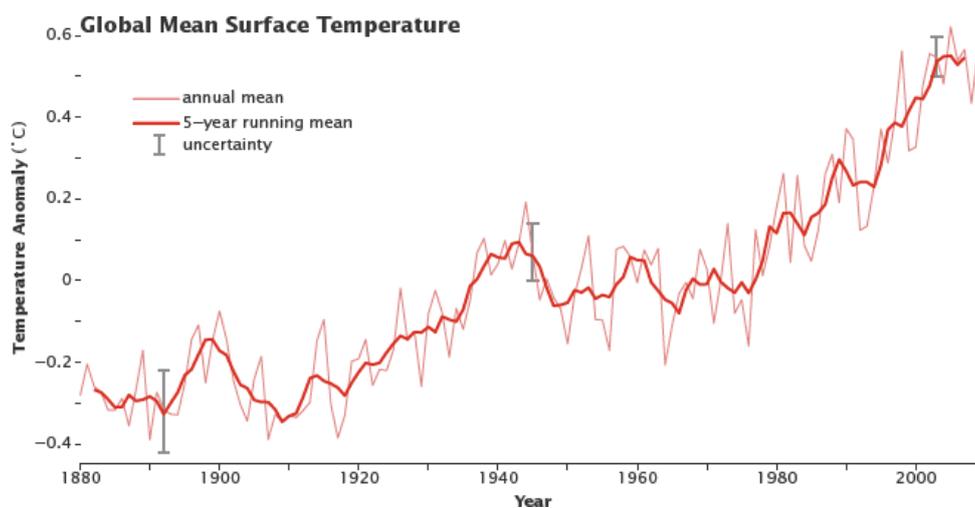
I cambiamenti climatici quali l'innalzamento delle temperature, la variazione delle stagioni e il riscaldamento globale, rappresentano oggi uno dei maggiori pericoli per la sopravvivenza delle api e degli altri impollinatori e di conseguenza per il mantenimento della biodiversità.

La relazione tra il cambiamento climatico e il rischio di vita per api e impollinatori è stata analizzata dal Centro Ricerche di Bioclimatologia dell'Università di Milano, in una "Ricerca sulle possibili influenze dei fenomeni climatici e ambientali quali fattori determinanti l'assottigliamento delle popolazioni apistiche mondiali", che ha analizzato le osservazioni meteorologiche dal 1880 e le osservazioni satellitari dal 1978 confermando l'impatto dei cambiamenti climatici sulle popolazioni di api domestiche e selvatiche.

I risultati della ricerca coincidono con le conclusioni riportate nel 2011 dalla rivista “*Good*” ovvero che l’aumento della temperatura del pianeta incide negativamente sulla salute delle api e quindi sul servizio ecosistemico dell’impollinazione. A rischio però sarebbe anche la produzione di miele, che secondo i ricercatori dell’Università di Milano rischia di scomparire da qui a 100 anni. A livello internazionale l’IPBES (*Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services*, costituito da un team di scienziati di 124 paesi che studia la perdita della biodiversità e dei servizi ecosistemici a livello globale ha prodotto, nel 2016, un primo rapporto sulla perdita della biodiversità degli impollinatori. Da questo risulta che il 16% degli insetti impollinatori selvatici a livello mondiale è a serio rischio di estinzione, in particolare il 40% delle specie di api selvatiche e farfalle risultano essere a rischio).

Il clima ha subito nel corso della storia notevoli cambiamenti oscillando tra fasi glaciali e interglaciali ed alternando periodi estremamente freddi seguiti e/o preceduti da periodi caratterizzati da profili termici molto alti, i cosiddetti “*optimum climatici*”.

L’attuale tendenza all’incremento termico delle temperature su scala globale ha avuto inizio dal 1850, ritenuto il discriminante fra il precedente periodo climatico e quello successivo che perdura fino ai giorni nostri.



**Fig. 11** Progressiva fase di riscaldamento a partire dal 1880

Questo quadro è scientificamente ben sostenuto dai *Reports* IPCC (Gruppo intergovernativo sul cambiamento climatico) che si sono succeduti nell'ultimo decennio. Il più recente *Report* IPCC (*Forth Assessment Report*, 2007) rappresenta un approfondimento dei processi di cambiamento climatico in generale e dei singoli inducenti che lo hanno caratterizzato e lo caratterizzano come fattore sfavorevole nella determinazione e/o co-determinazione di fenomeni epidemiologici generalizzati che riguardano il patrimonio apistico mondiale.

Si è quasi certi che il recente riscaldamento stia fortemente influenzando i sistemi biologici terrestri, inclusi cambiamenti come:

- Anticipo degli eventi primaverili, come la fioritura, la migrazione degli uccelli e la deposizione delle uova;
- Spostamenti verso il polo e verso le alte latitudini delle specie vegetali e animali.

Gli effetti dell'aumento della temperatura sono:

- Effetti sulla gestione dell'agricoltura e delle foreste alle alte latitudini dell'emisfero nord, come l'anticipo primaverile della semina delle colture e l'alterazione nei regimi di disturbo delle foreste a causa di incendi e aridità (Fig.12);
- Effetti sulla salute umana, come la mortalità dovuta ad onde di calore in Europa Occidentale, vettori di malattie infettive in alcune aree ed il polline allergenico alle alte e medie latitudini dell'emisfero nord.



**Fig. 12** Effetti dei cambiamenti climatici

La minore durata della stagione invernale, con temperature medie sempre più alte e con picchi decisamente anomali, ha innescato un probabile allungarsi della finestra di attività delle api, ipotizzabile in 20-30 giorni di lavoro in più l'anno. L'inverno più corto e più caldo determinerebbe uno stress aggiuntivo per le api e comprometterebbe il loro stato di salute. La sincronicità tra la fase della fioritura e la ripresa delle attività di volo delle api dopo l'inverno potrebbe aver subito importanti discrepanze.

Le api raccolgono, per lo svolgimento del loro ciclo biologico, tre elementi: acqua, nettare e polline. La mancanza di uno o più di questi elementi può portare ad una diminuzione della popolosità delle colonie, a una minor longevità delle api, a una maggior sensibilità nei confronti delle malattie.

Le condizioni climatiche avverse non permettono alle api una ottimale raccolta di nettare e polline e possono essere causa di carenze e stress nutrizionali con conseguente debilitazione delle colonie.

La siccità, soprattutto quella estiva, si rende responsabile di estese morie, in quanto senza fonti idriche le api non riescono a termoregolare adeguatamente le larve e la covata, i fiori producono meno nettare e meno polline e quindi le api riescono a nutrirsi ma non riescono a fare scorte di miele.

Le ondate di gelo fuori periodo, compromettono le fioriture ovvero le fonti di nettare e di polline con conseguenze dirette sulla famiglia e sulla covata appena nata. All'arrivo del gelo le poche scorte rimaste potrebbero risultare insufficienti a nutrire la covata appena nata che potrebbe così morire di fame. Se il freddo si protrae, le api per mantenere il giusto clima nell'alveare e quindi mantenere al caldo la covata, sprecherebbero le proprie energie attraverso lo sbattere delle ali questo comporterebbe un consumo maggiore di miele da parte delle api adulte, minore nutrizione della covata e quindi minore scorte di miele.

Se il clima è troppo umido il miele non raggiunge la maturazione giusta ed inoltre nell'alveare si vengono a creare le condizioni ideali allo sviluppo di funghi.

In un recente studio dell'*Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments* (AFSSA) è stato dedicato spazio ai cambiamenti climatici come aspetto da valutare attentamente in un'ottica multifattoriale.

Temperature con valore di 12°C senza precipitazioni e 16°C con associate piogge ad esempio, inibirebbero l'attività di volo delle api (Dustmann J. H. e Von Der Ohe W., 1988); mentre con temperature di oltre 34,5 °C sono stati osservati deficit nei processi di apprendimento e memorizzazione (Jones et al., 2004). Le condizioni termiche non ottimali determinano nelle api operaie perdita del senso di orientamento (Tautz et al., 2003).

Con concentrazioni pari all'1,5% di CO<sub>2</sub> e temperature > 35°C all'interno dell'arnia le api tendono ad avere un'aspettativa di vita molto più breve rispetto alla media (Bühler et al., 1983).

L'innalzamento delle temperature potrebbe, inoltre, comportare una perdita dell'habitat naturale in quanto le api tenderebbero a migrare verso latitudini più fresche e stabilirvi nuovi alveari (Solimene U. e Condemi V., 2009).

Le perturbazioni climatiche e/o atmosferiche indurrebbero anomalie di comportamento per alcune specializzazioni all'interno della colonia (Crailsheim et al., 1999).

Uno studio di particolare interesse scientifico è stato condotto in 21 Paesi su 542 specie vegetali e 19 specie animali constatando nel 78% dei casi quanto il *global warming* abbia influito, in vari modi, inducendo modificazioni comportamentali nelle specie analizzate. Secondo questo studio, l'aspetto predominante del problema deve essere focalizzato negli anticipi/posticipi stagionali soprattutto nel passaggio *winter/spring* ed in secondo luogo nel passaggio *autumn/winter* (Menzel A. et Fabian P., 1999).

### **1.2.5 Produzione di miele in Italia nel 2018/19**

Il 2019 dell'apicoltura in Italia è un anno particolarmente difficile. Il clima del nostro paese, quest'anno, è infatti stato caratterizzato da un inverno particolarmente mite seguito da una primavera molto piovosa e da un'estate partita a rilento e caratterizzata da eventi climatici estremi, frutto del riscaldamento globale. Il risultato è stato che, per il 2019, l'Italia ha visto praticamente dimezzata la produzione di miele. La Coldiretti, basandosi su dati ISTAT ha affermato che: "La sola produzione nazionale di miele di acacia e agrumi ha fatto registrare una contrazione del 41% rispetto alle attese". Per questo, la produzione annuale nazionale risulterà ben al di sotto degli oltre 23,3 milioni di chili del 2018. ISMEA, l'Istituto di Servizi per il Mercato Agricolo e Alimentare ha pubblicato un report sulla mancata produzione di miele nella primavera 2019. ISMEA stima questo calo produttivo in oltre 73 milioni di euro di danni considerando solo la produzione dei mieli di acacia e di agrumi.

L'Italia produce soprattutto due tipi di miele: quello di acacia, tipico delle regioni del nord, e miele di agrumi, nelle regioni del sud. Piemonte, Lombardia ed Emilia Romagna sono le regioni italiane più produttive.

Tra gli effetti dei cambiamenti legati al clima c'è anche una crescente difficoltà nella produzione del miele. E quest'anno in Italia la raccolta di miele ha risentito in modo estremamente pesante degli effetti dell'andamento climatico anomalo e proprio per questo la Coldiretti lancia l'allarme: «nel 2019 è praticamente dimezzata la raccolta di miele». Finora il 2019 è stato segnato da 1.126 eventi meteo estremi come grandinate, trombe d'aria, tempeste d'acqua e vento e ondate di calore. Eventi che non hanno risparmiato gli alveari e hanno fatto soffrire le api, sentinelle dell'equilibrio naturale globale e della biodiversità. Dopo i primi mesi primaverili eccezionalmente caldi e siccitosi, le precipitazioni abbondanti e il calo termico registrato durante buona parte del mese di maggio hanno avuto conseguenze negative sulle fioriture. Anche durante l'estate bollente che ci siamo lasciati alle spalle non sono mancate violente ondate di maltempo. Queste condizioni hanno fatto sì che le api non avessero la possibilità di raccogliere il nettare e il poco miele che sono

riuscite a produrre lo hanno mangiato per sopravvivere. La Coldiretti osserva, inoltre, che quest'anno la produzione nazionale risulterà ben al di sotto delle oltre 23,3 milioni di chili del 2018, mentre le importazioni sono risultate pari a 9,7 milioni di chili nei primi cinque mesi del 2019.

Del miele importato circa la metà arriva dall'Ungheria e quasi il 10% dalla Cina.

### **1.2.5.1 Analisi di mercato e valutazioni dei danni economici per la campagna produttiva 2019**

Le condizioni meteorologiche particolarmente avverse nella prima parte dell'anno con eventi estremi molto intensi e frequenti si sono rivelati particolarmente dannosi per l'apicoltura determinando perdite molto alte della produzione.

Per eventi estremi si intendono sia i prolungati periodi di siccità, sia le prolungate precipitazioni che danneggiano o annullano le fioriture, sia le basse temperature e il vento, due fattori che impediscono alle api di uscire dall'alveare per bottinare. Nel 2019, la perdita produttiva stimata di miele di acacia e di agrumi è di oltre 10 mila tonnellate, pari a oltre il 40% della produzione media annua attesa in condizioni normali. Dal punto di vista economico, il calo produttivo registrato implica una riduzione dei ricavi pari ad almeno 73 milioni di euro cui, sul fronte di costi, dovrebbero aggiungersi anche le spese rese necessarie, soprattutto al Nord, per nutrire le api.

Le temperature invernali al di sopra della media hanno portato a un buono sviluppo delle famiglie, che all'uscita dell'inverno si presentavano ben popolate, ma con poche scorte a causa della scarsa importazione nettarifera dovuta al clima siccitoso e ventoso di fine inverno. L'abbassamento della temperatura nella primavera 2019 e il perdurante maltempo ha causato consistenti perdite di produzione e frequentissimi episodi di sciamatura, complicando ulteriormente la situazione.

Non sono mancati episodi, anche gravi, di spopolamento delle famiglie a causa di avvelenamenti da fitofarmaci, sia al Nord sia, in forma ancor più grave, al Sud.

Diverse Associazioni regionali di apicoltori hanno segnalato la gravità della situazione che, peraltro, si è protratta per tutto il mese di maggio e ha colpito tutto il territorio nazionale con diversa intensità.

A fine maggio in Valle d'Aosta, ad esempio, la produzione è risultata nulla.

Anche in Piemonte la situazione è pessima, la produzione nella primavera 2019 è sostanzialmente azzerata. Alla scarsa resa delle prime fioriture primaverili è seguita la perdita totale del raccolto di robinia. La poca acacia raccolta nei rari giorni di bel tempo è stata consumata dalle api. Innumerevoli le colonie morte per fame nel mese di maggio e comunque straziante la situazione presente negli apiari costretti a sopravvivere grazie alla nutrizione artificiale. In alcune zone si sono verificate cospicue sciamature.

In Emilia Romagna nelle zone collinari è stato necessario nutrire artificialmente le colonie anche durante la fioritura dell'acacia. Le rese stimate nel piacentino per il miele di acacia sono di 0-5 kg/alveare.

La situazione è molto critica in Campania con produzioni completamente azzerate o insignificanti. Nelle province di Avellino e Benevento le piogge costanti per tutto il mese e le basse temperature non hanno consentito né di produrre il millefiori primaverile né l'acacia. Il raccolto di miele di sulla è in corso ma le stime a raccolto quasi concluso sono di appena 5 kg/alveare. Alcune zone sono state anche colpite da grandinate che hanno distrutto ogni fioritura. Situazione analoga si è verificata in provincia di Napoli e Caserta con rese stimate in media di 3-5 kg/alveare di miele di acacia, 3 kg/alveare di miele millefiori che non è stato neanche raccolto. Lo scenario generale è estremamente negativo.

Il maltempo registrato nel mese di maggio oltre ad azzerare la produzione di miele ha causato problemi alle famiglie che in questo periodo sono alla massima espansione e dovrebbero essere nel picco produttivo. Al contrario, in tutto il territorio nazionale le api hanno consumato le scorte costringendo gli apicoltori ad intervenire con costose nutrizioni zuccherine sia pure con l'acacia

in fiore per salvare le famiglie dalla morte per fame. A complicare ulteriormente il lavoro dell'apicoltore, in molte zone si è verificata una fortissima febbre sciamatoria con sciamature ripetute e numericamente consistenti. A causa delle condizioni meteo avverse si segnalano inoltre problemi dovuti alla irregolare attività di deposizione delle regine con il conseguente stentato sviluppo delle famiglie e problemi sanitari generali della covata (peste europea, virosi, covata calcificata) a carico delle famiglie indebolite e fortemente stressate.

Anche gli allevatori di api regine da più zone d'Italia hanno segnalato difficoltà in allevamento con percentuali di fecondazioni molto basse dovute sia al maltempo che ai Gruccioni, uccelli che si nutrono di api e in particolare di api regine, la cui presenza in alcuni areali è diventata una vera e propria emergenza.

Per la stima del danno economico sulla mancata produzione del miele di acacia e di agrumi nel 2019 sono state prese come riferimento la produzione attesa, ovvero il quantitativo di produzione ad alveare normalmente raggiungibile in annate di media produttività (media 2014-2018), con la produzione attuale, anch'essa espressa in quantità per alveare, stimata per il 2019 in base ai dati raccolti con l'attività di monitoraggio dell'Osservatorio Nazionale Miele.

La mancata produzione, ottenuta per differenza tra le due grandezze, è stata poi valorizzata al prezzo medio di mercato atteso per il 2019 e moltiplicata per il 50% degli alveari detenuti da apicoltori possessori di partita iva sul territorio nazionale. L'analisi si è concentrata sulle due principali produzioni del settore, quali Miele di acacia e Miele di agrumi, la prima caratterizzata da una forte specializzazione produttiva nelle regioni del settentrione d'Italia, la seconda in quelle localizzate al sud del Paese.

La ragione per la quale il danno sia stato stimato con riferimento ad una quota degli alveari detenuti da apicoltori con partita iva (p.i.) è da collegare alle tipologie di prodotto considerate (Miele di acacia, Miele di agrumi), rispetto alle quali, in base alle informazioni provenienti dall'Osservatorio Nazionale Miele, l'entità di coloro che risultano esposti ai danni da avverse condizioni

climatiche è pari al 50% degli alveari destinati ad attività imprenditoriale per le regioni considerate (censimento Nov. - Dic. 2018 - Banca Dati Nazionale Apistica). L'analisi in questione si è limitata a considerare i soli danni economici derivanti dalle perdite da produzione, escludendo altre grandezze che comunque stanno gravando sul bilancio degli apicoltori quali, ad esempio, i maggiori costi che gli stessi stanno sostenendo per l'acquisto e la distribuzione dei prodotti per la nutrizione delle famiglie di api per poterne garantire la sopravvivenza nel periodo di mancato raccolto.

Il miele di acacia risulta essere la tipologia produttiva più esposta sul fronte dei danni economici. Infatti, le valutazioni che provengono dal mondo produttivo indicano una produzione totalmente azzerata per il 2019. A fronte di un tale quadro, ipotizzando una valorizzazione a 8 euro/kg e una resa, per alveare esposto alla crisi, di 25 kg, si genererebbe una perdita di ricavo per alveare di circa 200 euro che, riferito all'intera produzione delle regioni considerate, risulta pari a 55,4 mln di euro. Data la forte specializzazione di tale produzione al Nord del paese, sono le regioni del settentrione ad essere maggiormente penalizzate, con il Piemonte la cui stima dei danni ammonta a circa 16,4 mln di euro, seguita dall'Emilia Romagna (11,4 mln di euro), la Lombardia (10,2 mln di euro) e la Toscana (10 mln di euro). Per Toscana e Friuli V.G. l'entità dei danni si attesta attorno, rispettivamente, 5 mln e 2 mln di euro ([www.ismea.it](http://www.ismea.it) - [www.ismeamercati.it](http://www.ismeamercati.it)).

Il mercato del miele, quindi, è sostanzialmente fermo.

### 1.3 Alimentazione delle api

Notevole importanza e strettamente collegata ai cambiamenti climatici è l'alimentazione delle api. Per una corretta crescita e sviluppo della colonia, le api hanno bisogno di una dieta bilanciata contenente carboidrati, proteine, lipidi, vitamine e acqua. Quest'ultima serve alle api per reintegrare i liquidi corporei, per confezionare il cibo per le giovani larve, per la termoregolazione interna dell'alveare e per l'umidificazione del microclima. L'acqua importata non è conservata nelle cellette, ma viene usata subito.

La quantità e la qualità del cibo varia a seconda della casta e dello stadio di sviluppo. In particolare, per lo sviluppo da larva ad ape operaia, sono richiesti circa 59,4 mg di carboidrati (Rortais et al., 2005).

La fonte naturale di carboidrati per le api è il nettare che raccolto dalle bottinatrici viene trasportato all'alveare, trasformato in miele ed immagazzinato nelle cellette opercolate. La trasformazione da nettare a miele è graduale e comincia già durante il volo di ritorno (Nicolson e Human, 2008). All'interno dell'alveare il contenuto di acqua del miele è ridotto al 16-20% e vengono aggiunti enzimi, quali invertasi, diastasi e glucosio ossidasi, che spiegano la composizione di carboidrati del miele: che mediamente è del 38% di fruttosio, 31% di glucosio e il restante di altri trisaccaridi (Doner, 1977).

Per quanto riguarda gli aminoacidi, quelli fondamentali per la salute delle api sono essenzialmente dieci e sono: metionina, triptofano, arginina, lisina, istidina, fenilalanina, isoleucina, treonina, leucina e valina (De Groot, 1953).

Eventuali carenze di questi possono limitare lo sviluppo, la produttività e il mantenimento della colonia (Brodschneider e Crailsheim, 2010). L'unica fonte naturale di proteine per le api è il polline. Le colonie raccolgono dai 10 ai 26 kg di polline all'anno (Wille et al., 1985) (Fig. 13). A differenza del miele, solo una piccola quantità di polline viene immagazzinato nell'alveare per lunghi tempi e le scorte diminuiscono rapidamente durante i periodi di non foraggiamento (Schmickl e Crailsheim, 2002). All'interno dell'alveare le api mescolano il polline con il nettare rigurgitato, il miele e le secrezioni ghiandolari per produrre il cosiddetto "pane d'api", che differisce dal polline

appena raccolto per il più basso pH e la minore quantità di amido (Ellis e Hayes, 2009). Il polline funge anche da fonte di lipidi, importanti non solo per lo sviluppo della covata ma anche come fonte di steroli per la produzione e la regolazione degli ormoni della crescita nell'ape adulta (Huang, 2010).



**Fig. 13** - Bottinatrice con un carico di polline

Il polline è un elemento chiave per la salute sia della singola ape che dell'intera colonia. Possiamo affermare ciò perché esso è capace di incidere sia sulla crescita che sulla aspettativa di vita, così come sull'immunocompetenza della colonia nel suo insieme. Mentre le bottinatrici consumano abbondanti quantità di nettare e miele per poter sostenere l'attività di foraggiamento e di volo, che comportano grande consumo di carboidrati, le nutrici sono la sottocasta che consuma le maggiori quantità di polline per poter sostenere l'attività delle ghiandole ipofaringee e lo sviluppo della covata. Il polline viene somministrato alle larve tal quale o sotto forma di "pappa" preparata dalle api nutrici. La qualità di queste ultime dipende da ciò che hanno mangiato nella loro infanzia e precisamente da quando l'uovo si schiude. A seconda dell'alimentazione ricevuta da larve saranno nutrici più o meno valide e vivranno di più. L'attività di nutrice è molto logorante e quindi la durata della vita dipende dalla quantità di covata presente e dalla quantità di lavoro svolto. A sua volta la quantità e la qualità della covata dipende dalla quantità e dalla qualità delle nutrici. Le nutrici richiedono polline in base alla richiesta da parte

della covata (attraverso i feromoni della covata). L'indisponibilità di polline non lascia alle api altra scelta che quella di ridurre la quantità di covata attraverso il "cannibalismo" (Dustmann and von der Ohe, 1988) altrimenti si assiste alla nascita di api piccole, con basso livello di proteine quindi con scarse difese immunitarie e dalla vita più breve. Le api da miele sono poliletiche, ovvero bottinano su specie botaniche diverse e di diverse famiglie, ma quando trovano un pascolo caratterizzato da una grande varietà di fonti polliniche e nettariifere, tendono a concentrare le attività di *bottinamento* solo su alcune specie botaniche, rivelando un comportamento di foraggiamento selettivo. Una delle ragioni alla base di questo comportamento potrebbe essere legata alla maggiore capacità nutrizionale di una certa specie botanica. Tuttavia, contrariamente a quanto avviene per i bombi, non è del tutto chiaro se le api mellifere scelgano i pollini rispetto al loro valore nutrizionale. Anzi, è stato osservato che le api da miele raccolgono pollini di qualità nutrizionale inferiore, rispetto ai bombi che bottinano nella medesima area, suggerendo che le api non possiedano la stessa capacità dei bombi di valutare la qualità del polline (Ruedenauer FA. et al., 2018).

Le nutrici sono la sotto-casta più sensibile alle carenze di polline all'interno dell'alveare e sembra siano in grado di comunicare questa carenza alle bottinatrici, incaricate di soddisfare e provvedere ai bisogni nutrizionali della colonia. La comunicazione avverrebbe attraverso il contatto e/o la trofallassi. Questa comunicazione nutrice-bottinatrice potrebbe stimolare l'attività di *bottinamento*.

Le attuali e intensive pratiche agricole associate alla scomparsa delle zone selvatiche o semi-selvatiche rischiano di lasciare, non solo, le colonie di api a corto di risorse alimentari durante i periodi di penuria ma, a causa della mancanza della biodiversità naturale, di alterare la composizione della loro dieta (Kremen et al., 2002). Questi stress nutrizionali caratterizzati da periodi di fame, variazione del rapporto tra carboidrati e proteine nella dieta o mancanza di alcuni degli aminoacidi essenziali, possono avere conseguenze serie sulla salute delle api e contribuire alla perdita delle colonie. Alcuni studi hanno dimostrato che, nonostante le api possono sopravvivere con una dieta

contenente solo carboidrati, l'aggiunta di proteine ne garantisce un aumento della longevità (Manning et al., 2007). L'aggiunta di polline nella dieta è fondamentale, anche, per il corretto sviluppo dell'organismo, poiché le proteine costituiscono circa il 66-74% della massa corporea di un'ape neo-sfarfallata (Brodschneider e Cailsheim, 2010).

Una dieta contenente una corretta percentuale di proteine permette un corretto sviluppo delle ghiandole ipofaringee e delle ovaie, favorisce la maturazione dei muscoli del volo nelle giovani api neo-sfarfallate (Hoover et al., 2006).

Una dieta povera di proteine, invece, riduce l'attività metabolica degli emociti ma ne aumenta la concentrazione, probabilmente come meccanismo compensatorio (Szymas e Jedruszuk, 2003; Alaux et al., 2010), riduce l'attività della glucosio ossidasi e della massa del corpo grasso in pratica induce una diminuzione della risposta immunitaria individuale e sociale. L'aggiunta di polline nella dieta determina, inoltre, lo sviluppo di api con titoli più bassi per il virus delle ali deformi o DWV (*Deformed Wing Virus*) rispetto a quelle nutrite con solo zucchero, confermando il ruolo vitale delle proteine nella risposta immunitaria (Degrandi-Hoffman et al., 2010). Il rapporto tra metabolismo e sistema immunitario diventa ancor più complesso quando si considera l'azione dannosa svolta dalla *Varroa*. Nelle api infestate da *Varroa* si osserva una diminuzione nel metabolismo delle proteine, l'inibizione di alcuni geni dell'immunità e l'aumento dei livelli di virus, in particolare del DWV. Api operaie parassitate durante lo sviluppo, presentano livelli inferiori di proteine che non aumentano con l'alimentazione, anche quando l'ape dispone di quantità sufficienti di polline (Van Dooremalen et al., 2013). Analogamente pupe infestate da *Varroa* presenteranno un peso minore rispetto a quelle non infestate, così come un contenuto di proteine corporee significativamente più basso ed elevati livelli di aminoacidi liberi, suggerendo, quindi, che la sintesi proteica e la crescita, vengono inibite (Aronstein et al., 2012), anche se il probabile ruolo di infezioni virali associate non può essere assolutamente escluso e sembra essere predominante, almeno in termini di compromissione

della risposta immunitaria (Nazzi et al., 2012; Nazzi e Pennacchio 2014; Di Prisco et al., 2016).

Recenti studi di nutrigenomica hanno inoltre evidenziato gli effetti che particolari fonti di carboidrati e proteine possono avere sul profilo trascrizionale di api adulte. Molecole presenti nel miele, ma non in altre fonti alimentari, regolano positivamente alcuni pathway di disintossicazione dell'intestino e l'espressione di geni associati al metabolismo delle proteine e alle reazioni di ossido-riduzione (Mao et al., 2013); (Wheeler e Robinson, 2014). Il polline influenza l'espressione di geni che condizionano la longevità, la funzione immunitaria, la produzione di alcuni AMP e i processi di disintossicazione da pesticidi (Alaux et al., 2011; Schmehl et al., 2014).

## 1.4 Corpo grasso (*Fat Body*)

L'alimentazione proteica (costituita dal polline) è per le api fondamentale per lo sviluppo e la corretta funzionalità delle ghiandole ipofaringee (preposte alla produzione di gelatina reale), per l'allevamento della giovane covata ma anche per la formazione del cosiddetto corpo grasso.

Il corpo grasso è un tessuto di riserva, che permette di immagazzinare sostanze nutritive elaborate, rendendole disponibili all'organismo nei momenti di difficoltà (come le avversità climatiche e, soprattutto l'inverno), garantendo così all'ape un buono stato di salute e di vivere più a lungo. Questo meccanismo risulta di particolare importanza durante la fase larvale: una larva sottoalimentata, non può dare origine ad un'ape adulta, sana ed efficiente. La funzione di riserva del corpo grasso è fondamentale nella vita degli insetti olometaboli (cioè che presentano metamorfosi completa).

Le larve devono infatti accumulare una quantità di sostanze nutritive sufficienti per sopravvivere durante la metamorfosi (Mirth and Riddiford, 2007) e per la durata della vita da adulta (le api adulte non si alimentano ma utilizzano le riserve stoccate nel corpo grasso).

Il corpo grasso o "*fat body*" ha origine mesodermica e si forma durante l'embriogenesi a partire dalle pareti della cavità celomatica (Gillot, 1995). Macroscopicamente (allo stereomicroscopio) si presenta come un tessuto molliccio, bianco giallognolo che avvolge interamente gli organi. E' quindi distribuito in tutto il corpo dell'insetto dove risulta suddiviso in uno strato periviscerale, che avvolge gli organi, e uno strato parietale, localizzato subito al di sotto della cute (Chapman, 1998).

Microscopicamente appare scarsamente colorato e organizzato a formare aggregati di cellule, più o meno compatte, oppure file composte da uno o due strati di cellule.

Le cellule che lo compongono sono in lieve contatto fra loro (sono tenute insieme dalle tracheole che sono anche responsabili della consistenza del tessuto) ma in stretto contatto con l'emolinfa in modo che gli scambi tra i 2 tessuti avvengono facilmente e velocemente ogni volta che ci sono

cambiamenti nel metabolismo. Oltre alla funzione di riserva dei lipidi, il corpo grasso è anche considerato la principale sorgente di proteine e di carboidrati. Essendo comparato al fegato dei vertebrati, avrebbe inoltre un ruolo di rilievo nella conservazione e nella neutralizzazione delle sostanze non utilizzate dall'insetto, e quindi presenti in eccesso nell'emolinfa al fine di utilizzarle quando ce n'è bisogno (Chapman, 1998).

Le cellule che lo compongono sono principalmente i trofociti anche detti adipociti, impropriamente in quanto non stoccano solo lipidi. Le altre cellule, ad eccezione degli enociti, che hanno un'origine ectodermica, derivano dai trofociti come risultato di una specializzazione funzionale e sono detti urociti o cellule urate. Gli urociti, presenti esclusivamente nella larva e nella pupa, sono cellule escretorie specializzate nella produzione di urati, derivati dalla degradazione delle proteine assorbite dalla emolinfa e che, nelle api, sembrano sostituire i tubuli di Malpighi durante la metamorfosi. Gli enociti, sono cellule, come precedentemente detto, di origine ectodermica, associate al corpo grasso, localizzate tra i trofociti, e perciò distribuite in tutto il corpo. Hanno forma sferica o ovale, nucleo centrale e citoplasma acidofilo. La loro funzione non è ben conosciuta si pensa siano capaci di sintetizzare lipidi o complessi lipoproteici che sono depositati nella epicuticola per formare una superficie impermeabile (Lockey, 1988).

I trofociti hanno generalmente una forma poligonale o rotondeggiante, un nucleo grande e irregolare, posto alla periferia della cellula, numerosi nucleoli e un citoplasma ampio contenente numerosi vacuoli, otticamente vuoti, in quanto contenenti grassi (Chapman, 1998). I trigliceridi sono la componente principale (70% del peso del tessuto) e alla fine del periodo di alimentazione questi occupano la maggior parte dello spazio intracellulare insieme ai granuli di glicogeno e alle proteine (Dean et al., 1985).

Le api immagazzinano le riserve di energia sotto forma di glicogeno e di trigliceridi nei trofociti e questi possono immagazzinare una grande quantità di riserve lipidiche. Il metabolismo dei lipidi è essenziale per la crescita e la riproduzione e fornisce l'energia necessaria durante i periodi di assenza di alimentazione prolungata. La morfologia dei trofociti varia continuamente in

base alla funzione che stanno svolgendo, con la fase di sviluppo dell'insetto e nelle diverse caste (Loke and Collins, 1968; Locke et al., 1982; Dean et al., 1985). Tale variazione nei maschi è scarsa in quanto il loro ruolo principale è la sintesi delle proteine. Nelle femmine le variazioni sono più evidenti e frequenti in quanto legate non solo alla sintesi delle proteine ma soprattutto al loro stoccaggio (in particolare della vitellogenina) ed alla loro mobilitazione e utilizzazione (Locke, 1984). La sintesi proteica nei trofociti avviene esclusivamente durante la fase larvale continua per un breve periodo per diminuire durante la fase pre-pupale e poi cessare nella pupa e nell'insetto adulto. Durante queste ultime fasi prevale la mobilitazione delle sostanze stoccate dal corpo grasso e il loro utilizzo. Alla luce di quanto detto si deduce che la dimensione delle cellule del corpo grasso aumentano durante la fase larvale diventando le cellule più grandi del corpo dell'insetto e diminuiscono durante la fase pupale in quanto l'insetto utilizza le sostanze stoccate per la metamorfosi. Nella fase adulta la dimensione del corpo grasso diminuisce quando l'ape passa dallo stadio di nutrice a quello di bottinatrice e quando c'è una carenza di alimentazione proteica (polline), in quanto le nutrici sono costrette, per alimentare la covata, a dover utilizzare le sostanze nutritive stoccate nel corpo grasso. La formazione di un corpo grasso ottimale è necessario per poter superare l'inverno nelle zone molto fredde, dove le api per produrre calore a partire dall'alimento zuccherino utilizzano sostanze catalizzatrici, quali vitamine e oligoelementi, se queste non sono contenute nel cibo, le api sono obbligate ad attingere dalle proprie riserve, contenute nel corpo grasso, influenzando in maniera negativa la durata della loro vita. Le api svernanti, quindi, devono aver avuto la possibilità di formare, durante l'estate, un corpo grasso completo, così da poter garantire alla famiglia le forze necessarie per svernare.

Il corpo grasso degli insetti è quindi il deposito centrale per le sostanze nutritive in eccesso ma è anche un organo di grande attività biosintetica e metabolica (Law and Wells, 1989). Le cellule del corpo grasso non controllano solo la sintesi e l'utilizzo di grassi e glicogeno, ma sintetizzano anche la maggior parte delle proteine dell'emolinfa e dei metaboliti circolanti. Grandi

quantità di proteine di stoccaggio utilizzate come serbatoio di aminoacidi per la morfogenesi, le lipoforine, responsabili del trasporto lipidico in circolazione, o la vitellogenina, per la maturazione delle uova, sono secrete dal corpo grasso (Keeley, 1985). La vitellogenina è una proteina di riserva indispensabile per la crescita e lo sviluppo delle api che viene sintetizzata ed accumulata nei corpi grassi, e alla quale l'organismo attinge in misura dei propri bisogni. È stata dimostrato, che questa lipoproteina non è usata solo per la formazione delle uova ma anche la sintesi della pappa reale (Amdam et al., 2003) infatti è presente nelle ghiandole ipofaringee delle api nutrici e svernanti, (in cui queste ghiandole sono ipertrofiche) ed è abbondante nell'emolinfa di cui rappresenta dal 30 al 50% delle proteine totali (Amdam et al., 2003). Le bottinatrici, invece, ne sono sprovviste, in quanto i loro bisogni proteici sono garantiti dalle nutrici che le alimentano a pappa reale (Crailsheim 1992).

Le larve ne sono le prime beneficiarie, ma non sono le sole. Le api nutrici possono immagazzinare una quantità notevole di vitellogenina nei corpi grassi ma queste riserve, naturalmente, hanno dei limiti. Quando le nutrici esauriscono le riserve, diventano bottinatrici. La vitellogenina ha, in questo fenomeno, un ruolo principale, perché è proprio quando le riserve di vitellogenina finiscono che l'ape abbandona il suo ruolo di nutrice e diventa bottinatrice. Questa lipoproteina rappresenta una fonte di giovinezza, ma quando il suo livello cala ha inizio il processo di invecchiamento. La vitellogenina ha un ruolo centrale anche per la sopravvivenza delle api e in particolare di quelle invernali. Quando la deposizione della regina si interrompe per il sopraggiungere della stagione fredda, le giovani nutrici avranno sempre meno api da nutrire fino a non averne più, per cui accumulano vitellogenina, così da avere le riserve necessarie alla colonia per il superamento dell'inverno (Amdam et al., 2003).

Un'altra funzione della vitellogenina è quella di legare lo zinco, un metallo pesante che rappresenta, nelle api, uno dei principali agenti di contrasto allo stress ossidativo: gli atomi di zinco catturano i radicali liberi, opponendosi all'invecchiamento dei tessuti. La vitellogenina contribuisce anche al buon funzionamento del sistema immunitario dell'ape. Questo è un altro effetto del

suo ruolo di trasportatore dello zinco, in quanto, quest'ultimo è fondamentale per la produzione di cellule immunitarie nell'emolinfa. Il numero di queste cellule, pertanto, è elevato nelle nutrici e nullo o quasi assente nelle bottinatrici.

La vitellogenina sembra avere anche un ruolo nel superare gli effetti tossici conseguenti all'esposizione ai pesticidi (Seehus et al., 2006).

Per eseguire molteplici funzioni metaboliche per soddisfare le mutevoli esigenze fisiologiche dell'insetto durante lo sviluppo, il corpo grasso deve essere in grado di integrare i segnali provenienti da altri organi. Molte di queste funzioni sono regolate dagli ormoni, e quindi è, anche, l'organo bersaglio di diversi ormoni (Gade G., 2004). Allo stesso tempo, il corpo grasso risponde alle esigenze metaboliche dell'organo stesso. Pertanto i diversi processi metabolici che avvengono in questo tessuto sono strettamente accoppiati a una serie di vie metaboliche.

Sistemi fisiologici per rilevare le riserve di nutrienti sono presenti in tutti gli organismi, negli insetti il sistema di rilevamento dei nutrienti sembra essere una funzione del corpo grasso (Mirth and Riddiford., 2007). Oltre al suo ruolo legato allo stoccaggio e all'utilizzo di sostanze nutritive, il corpo grasso è quindi un organo endocrino (Hoshizaki, 2005), produce diversi peptidi antimicrobici (Ferrandon et al., 2007), e partecipa alla disintossicazione del metabolismo dell'azoto (Keeley, 1985).

Questo fondamentale tessuto, già dallo stadio larvale, acquista, un ruolo chiave nella difesa immunitaria. Il corpo grasso è, infatti, il principale sito di produzione dei peptidi antimicrobici (AMP) (Fehlbaum et al., 1994) che rappresentano i principali responsabili della risposta immunitaria umorale. Gli AMP sono peptidi, generalmente cationici, che nell'emolinfa possono raggiungere concentrazioni molto elevate, fino a 300  $\mu$ M (Meister et al., 2000).

Nella produzione di suddetti peptidi sono coinvolte anche altre cellule quali gli emociti (Boman, 1991), le cellule dell'epitelio cuticolare (Brey et al., 1993) e dal tratto riproduttivo (Rosetto et al., 1996), le ghiandole salivari e cellule del tratto digerente (Kylsten et al., 1992).

Una carenza nello stato nutrizionale e in particolare di quello proteico può compromettere, dunque, il normale sviluppo dei meccanismi di difesa ed aumentare così la sua suscettibilità alle malattie. L'ape, per questo, rappresenta un prezioso modello di studio per determinare, ad esempio, come l'abbondanza e la diversità delle risorse ambientali possano influenzare lo sviluppo del sistema immunitario di un organismo e quindi lo stato di salute ma anche la durata della sua vita.

## Capitolo 2

### 2.1 Scopo della tesi

L'anno 2019 è risultato essere l'anno peggiore per la produzione di miele in Italia e la causa sembra sia da imputare ai cambiamenti climatici verificatisi durante tutto l'anno e precisamente all'alternanza di periodi di siccità a periodi di piogge intense, caldo torrido a freddo intenso con forti nevicate. I cambiamenti climatici sembrano essere stati responsabili della indisponibilità o della scarsa disponibilità di cibo (nettare e polline) e quindi del consumo da parte delle api nutrici di tutto il miele conservato nell'arnia al solo scopo di garantire la loro sopravvivenza e quella dell'alveare. I cambiamenti climatici sembrano essere stati anche responsabili dei fenomeni di spopolamento, sciamatura ed elevata mortalità riscontrati durante tale periodo negli stessi apiari. È noto che nell'ape adulta la dimensione del corpo grasso diminuisce quando l'ape passa dallo stadio di nutrice a quello di bottinatrice e quando c'è una carenza di alimentazione proteica (polline), in quanto le nutrici sono costrette, per alimentare la regina, la covata e le sorelle bottinatrici, a dover utilizzare le sostanze proteiche stoccate nel corpo grasso e quelle stoccate nell'arnia (pane d'api e miele), influenzando in maniera negativa la durata della loro vita e dell'intero alveare. Da ciò si deduce che la quantità di corpo grasso, e quindi le dimensioni dei trofociti, varia con il variare della quantità di proteine (vitellogenina) presenti in essi e che quindi il corpo grasso diminuisce man mano che diminuisce la disponibilità di polline nell'ambiente. Alla luce di tale osservazione abbiamo ritenuto opportuno studiare le caratteristiche morfologiche e morfometriche delle cellule del corpo grasso nelle api nutrici e bottinatrici normalmente e scarsamente alimentate e di correlare i risultati ottenuti con la quantità di vitellogenina presente in esse.

## **2.2 Materiali e metodi**

Campioni di api, 8 nutrici e 8 bottinatrici (4/alveare), sono stati prelevati da due alveari di uno stesso apiario (Azienda La Vega, Napoli), tra Giugno e Luglio 2018, anno in cui non ci sono stati particolari problemi in campo apistico e quindi le api, come riportato dagli apicoltori, risultavano essere sane e normalmente alimentate. Altrettante api, nutrici e bottinatrici, sono state prelevate, sempre da due alveari dello stesso apiario, tra Giugno e Luglio 2019, anno in cui i cambiamenti climatici hanno creato problemi nella disponibilità di polline e gli apicoltori riportavano mancata o ridotta produzione di miele per spopolamento, sciamatura o moria. Metà campioni di api è stata posta in contenitore adatto e successivamente trasportata al laboratorio e congelata a -20°C per gli esami molecolari, l'altra metà è stata posta nelle Eppendorf contenenti formalina al 10% per la fissazione e quindi processate per l'esame anatomo-istopatologico secondo le metodiche routinarie.

### **2.2.1 Esame macroscopico e microscopico**

I campioni di api fissati in formalina al 10% sono stati osservati allo stereomicroscopio (Axioskop HBO50, Zeiss, Milano) per l'evidenziazione di eventuali alterazioni anatomiche. Sono stati poi tagliati sagittalmente in due metà speculari e disposti nelle cellette in posizione dorsale e ventrale.

I campioni così ottenuti sono stati inclusi in paraffina, tagliati a 4 µm e successivamente colorati con Ematossilina-Eosina (EE) colorazione di base nello studio microscopico dei tessuti animali, con l'ausilio della coloratrice automatica (Leica auto stainer XL) Per alcuni campioni sono state effettuate delle colorazioni elettive Periodic Acid Schiff (PAS) e PAS- Alcian blue per l'evidenziazione del glicogeno e delle mucine.

### **2.2.2 Analisi morfometrica**

Per la valutazione del corpo grasso, 10 campi per ogni campione sono stati selezionati al microscopio ottico in maniera del tutto casuale ad un ingrandimento di 40X. Le immagini sono state acquisite con una videocamera, salvate su una memoria digitale e visualizzate su un monitor. I trofociti presenti nei 10 campi/campione sono stati circoscritti manualmente e successivamente analizzati con l'utilizzo del software di analisi di immagini "Image J". Tale software ci ha permesso di misurarne l'area e di ottenerne la media (M) e la deviazione standard ( $\pm DS$ ). Il numero scarso di campioni non ci ha permesso di fare un'analisi statistica.

### **2.2.3 Estrazione di RNA, retro-trascrizione (RT) e Real-time PCR quantitativa (qPCR)**

I campioni sono stati posti in tubi sterili e immediatamente conservati a -80°C per preservare l'integrità degli acidi nucleici. Mediante lame sterili monouso, per ciascun campione sono stati separati testa e addome, i quali successivamente sono stati sminuzzati per favorire l'omogenizzazione.

L'RNA totale è stato estratto utilizzando l'RNeasy Mini Kit Plus (Qiagen) seguendo il protocollo indicato dal produttore con l'ausilio dell'omogenizzatore meccanico TissueLyser (Qiagen). I campioni di RNA estratto sono stati quantizzati mediante lettura spettrofotometrica.

La RT è stata eseguita su 250 ng di RNA utilizzando il kit commerciale iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories). Per ciascun campione, 12.5 ng di cDNA sono stati sottoposti a qPCR mediante l'impiego del kit iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) secondo le indicazioni del produttore.

Per amplificare un segmento di trascritto della vitellogenina (VG), è stato utilizzato un set di primers descritti in letteratura (Corona et al., 2007, Tab.2). È stata effettuata anche l'amplificazione della  $\beta$ -actina (Act $\beta$ ) in parallelo al fine di permettere la normalizzazione dei risultati, impiegando i primers

descritti precedentemente (Purac et al., 2016, Tab.2). Il protocollo termico di qPCR prevedeva le seguenti fasi: 95°C per 3 min (denaturazione), 45 cicli di amplificazione a 95°C per 15 sec (denaturazione) e 60.2 °C per 30 sec (annealing ed extension), seguiti da una fase di 10 sec a 95°C, 5 sec a 65 °C con incrementi successivi di 0.5 °C fino a 95°C, al fine di ottenere una curva di melting e valutare la sensibilità e la specificità della reazione.

I dati di espressione genica sono stati ottenuti sulla base del metodo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  utilizzando il software Bio-Rad CFX Manager. Gli esperimenti sono stati ripetuti in triplicato tecnico.

Sequenza primers 5' → 3'	N° acc. GenBank	Prodotto (bp)
<b>Vitellogenina</b> VG-F (5-AGTTCCGACCGACGACG -3) VG-R (5- TTCCCTCCCACGGAGTCC -3)	MH755738.1	63
<b>β-actina</b> Actβ -F (5- ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG -3) Actβ -R (5- GACCCACCAATCCATACGGA -3)	AB023025/ GB44311	151

**Tab. 2** - Primers utilizzati per l'esecuzione degli esperimenti di RT-PCR. Per ogni coppia di primers sono indicate le sequenze nucleotidiche, il numero di accesso della sequenza su GeBank (N° acc. GenBank) e la lunghezza del prodotto in paia di basi (bp).

## Capitolo 3

### 3.1 Risultati ed osservazioni preliminari

#### 3.1.1 Esame macroscopico e microscopico

All'esame macroscopico con lo stereomicroscopio tutte le nutrici e tutte le bottinatrici, sia quelle normalmente alimentate che quelle scarsamente alimentate, non evidenziavano alcuna alterazione anatomica.

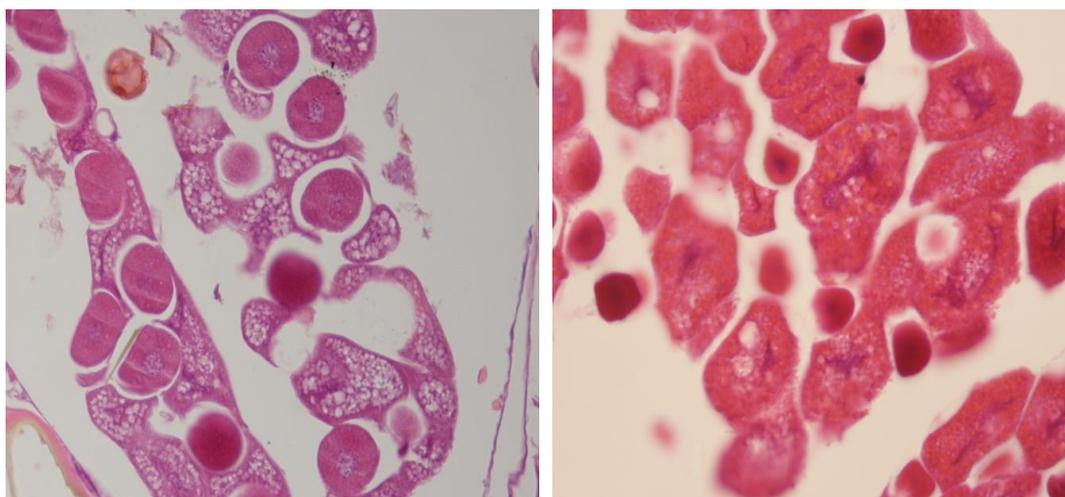
All'esame al microscopio ottico le cellule del corpo grasso, sia periviscerale che sottocutaneo, si organizzavano a formare aggregati più o meno voluminosi ed erano disposte in una o due file di cellule.

Nelle nutrici normalmente alimentate gli aggregati erano voluminosi e le cellule erano disposte in file doppie e lunghe; nelle nutrici scarsamente alimentate e nelle bottinatrici, normalmente alimentate e scarsamente alimentate, erano più piccoli e le cellule erano disposte in una o due file di lunghezza variabile.

Nelle nutrici i vacuoli "otticamente vuoti" (lipidi), che caratterizzavano i trofociti, variavano notevolmente di dimensione, da piccoli e numerosi, a grandi e pochi e che talvolta arrivavano a fondersi formando un unico grosso vacuolo, e ad assumere quello che nell'uomo e nei vertebrati è conosciuto, come "aspetto di cellula ad anello con castone".

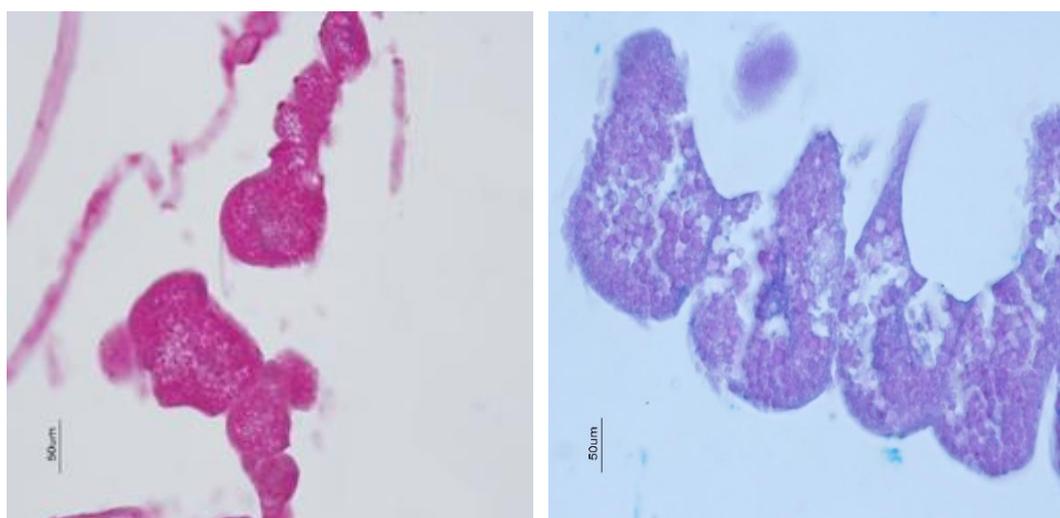
Nelle bottinatrici i vacuoli erano scarsi o del tutto assenti e la maggior parte dei trofociti, in evidente stato di degenerazione (in alcuni non era possibile evidenziarne più il nucleo) avevano il citoplasma ripieno di numerosi granuli eosinofili rapportabili a granuli proteici.

Un numero variabile, ma più numeroso nelle bottinatrici che nelle nutrici, di cellule di forma sferica o ovale, con nucleo centrale e citoplasma acidofilo rapportabili agli enociti si intervallavano più o meno costantemente con i trofociti (Figs. 14 e 15).



**Figs. 14 e 15** – Trofociti ed enociti in ape nutrice e bottinatrice. Sezione istologica colorata con E-E – 20X

Le colorazioni elettive PAS e BA evidenziavano la presenza di glicogeno talvolta frammisto a proteoglicani. Le colorazioni elettive PAS e BA nella maggior parte delle nutrici normalmente e scarsamente alimentate erano risultate negative ad indicare la presenza nei trofociti esclusivamente di sostanze lipidiche. Al contrario la forte e prevalente positività evidenziata dalla PAS nei trofociti delle bottinatrici normalmente alimentate e la positività evidenziata per la BA in quelle scarsamente alimentate era indicativo, a nostro avviso, della prevalenza di glicogeno nelle prime e di sostanze simil-proteiche frammiste a piccole quantità di glicogeno nelle seconde (Figs. 16 e 17).



**Figs. 16 e 17** - Ape: Trofociti in api bottinatrici - Colorazioni istochimiche: PAS e BA positive 40X

### 3.1.1 Risultati morfometria

I risultati morfometrici confermavano quanto osservato e descritto con l'esame istologico. Il corpo grasso risultava sempre più abbondante nelle nutrici e nelle bottinatrici normalmente alimentate rispetto a quelle scarsamente alimentate con valori medi dell'area ( $\mu\text{m}^2$ ) e della deviazione standard (DS) che andavano da  $0.486 \pm 0.26$  a  $0.696 \pm 0.17$  e da  $0.278 \pm 0.10$  a  $0.293 \pm 0.08$  nelle nutrici normalmente alimentate e in quelle scarsamente alimentate, con valori medi dell' area ( $\mu\text{m}^2$ ) e della deviazione standard (DS) che andavano da  $0.354 \pm 0.14$  a  $0.575 \pm 0.32$  e da  $0.232 \pm 0.06$  a  $0.279 \pm 0.10$  e nelle bottinatrici normalmente alimentate e in quelle scarsamente alimentate (Tab. 3).

### 3.1.2 Risultati biologia molecolare

La quantità di vitellogenina evidenziata con la RT- PCR andava da 6.77 a 7.12 N.G.E. e da 0.10 a 1.43 N.G.E. nelle nutrici normalmente alimentate e in quelle scarsamente alimentate e da 0.14 a 1.77 N.G.E. e da 0.06 a 0.11 N.G.E nelle bottinatrici normalmente alimentate e in quelle scarsamente alimentate, confermando i risultati morfologici e morfometrici ottenuti. La quantità di vitellogenina contenuta nei trofociti risultava essere maggiore nelle api nutrici e bottinatrici normalmente alimentate rispetto alle api nutrici e bottinatrici scarsamente alimentate dove sembrava essere presente in quantità piccolissime (Tab. 3).

**Tab. 3** - Risultati morfometrici e della RT-PCR del corpo grasso nelle api nutrici e bottinatrici campionate

CAMPIONE	TROFOCITI AREA MEDIA ( $\mu\text{m}^2$ ) e DS		TROFOCITI VT (N.G.E.)	
	da	a	da	a
NUTRICI (N.A.)	$0.486 \pm 0.26$	$0.696 \pm 0.17$	6.77	7.12
NUTRICI (S.A.)	$0.278 \pm 0.10$	$0.293 \pm 0.08$	0.10	1.43
BOTTINATRICI (N.A.)	$0.354 \pm 0.14$	$0.575 \pm 0.32$	0.14	1.77
BOTTINATRICI (S.A.)	$0.232 \pm 0.06$	$0.279 \pm 0.10$	0.06	0.11

Note:

\*(N.A.): NORMALMENTE ALIMENTATE

\*(S.A.): SCARSAMENTE ALIMENTATE

\*N.G.E. : *Normalize Gene Expression*

## Considerazioni e conclusioni

Negli ultimi cinque anni sono scomparsi 10 milioni di alveari nel mondo, quasi 2 milioni l'anno, oltre 200.000 solo in Italia.

Questi fenomeni di mortalità e di perdita di intere colonie d'api rappresentano un problema che ha impatto non solo sul settore apistico ma, più in generale, sull'agricoltura e sull'ambiente.

Tra tutti i possibili agenti causali biotici e abiotici, i cambiamenti climatici sembrano giocare un ruolo particolarmente importante, anche gli stress nutrizionali, legati soprattutto alla perdita degli habitat naturali e al diffondersi delle monoculture, giocano un ruolo non secondario nell'indebolire le famiglie d'api.

Confermato ormai è anche l'effetto deleterio del cambiamento climatico sulle fioriture: sono state eseguite numerose ricerche a riguardo, da cui è emerso che il tasso di umidità-siccità influenza non solo la quantità di nettare e polline prodotta dalle piante, ma sarebbe in grado di influire negativamente anche sulla qualità degli stessi.

Un aumento delle temperature, per esempio, indurrebbe alcune specie ad anticipare la fioritura con conseguente diminuzione del numero di fiori maturi. Qualora il cambiamento climatico fosse troppo repentino rispetto alla velocità di adattamento delle specie, allora si potrebbe ipotizzare uno scenario in cui le stesse specie potrebbero produrre fiori sterili e quindi dovrebbero sopravvivere senza riprodursi sessualmente ma affidando la perpetuazione della specie alla sola riproduzione agamica ovvero alla creazione di cloni tutti uguali a se stessi e dunque poco adattabili ai cambiamenti.

I cambiamenti climatici porterebbero dunque all'inevitabile perdita delle piante meno flessibili dal punto di vista adattativo e di quelle meno resistenti al caldo torrido e probabilmente ad un aumento delle specie abituate a climi caldi con probabile invasione di specie "aliene" le quali potrebbero prendere il sopravvento sulle specie autoctone.

In accordo a quanto riportato in letteratura, i risultati del nostro studio, sebbene effettuati su un numero scarso di campioni, sembrano confermare che le variazioni di dimensioni del corpo grasso nelle api sono strettamente correlate alla quantità di vitellogenina presente in essi e quindi alla disponibilità di polline presente nell'ambiente e che in condizioni di alimentazione normale, il corpo grasso delle bottinatrici risulta contenere sostanze di riserva diverse da quelle lipidiche e in particolare glicogeno, probabilmente per la sua azione energetica elevata e perché rapidamente utilizzabile per lo svolgimento della loro intensa attività di volo.

Dal momento che la disponibilità di polline è strettamente correlata al clima (fioriture) possiamo affermare con certezza che i cambiamenti climatici verificatisi nel 2019 e precisamente l'alternanza di periodi di siccità a periodi di piogge intense, il caldo torrido alternato al freddo intenso con forti neviccate, sono stati responsabili o corresponsabili (insieme all'utilizzo dei pesticidi) dei fenomeni, quali spopolamento, sciamatura ed elevata mortalità, verificatisi negli apiari e della conseguente mancata o scarsa produzione di miele.

La nutrizione è fondamentale per la difesa immunitaria e la resistenza agli agenti patogeni, con conseguenze che riguardano il benessere e il successo riproduttivo dei singoli organismi.

Le api nutrici, infatti, a causa della carenza di polline presente nell'ambiente non hanno altra scelta che ridurre la quantità di covata da dover nutrire (cannibalismo) ed anticipare il passaggio da nutrice a bottinatrice, nel tentativo di poter raccogliere e stoccare più polline. Questi stress nutrizionali caratterizzati da periodi di fame, variazione del rapporto tra carboidrati e proteine nella dieta o mancanza di alcuni degli aminoacidi essenziali, possono avere conseguenze serie sulla salute delle api e contribuire alla perdita delle colonie. Il nostro studio è nato dalla necessità di salvaguardare la salute delle api e non solo per amore degli animali ma anche e soprattutto per il ruolo importante che queste svolgono sia come insetti pronubi che come bioindicatori dello stato di salute dell'ambiente. Tutto allo scopo di salvaguardare e tutelare l'ambiente, favorire e mantenere la biodiversità e quindi proteggere gli animali e l'uomo.

## Bibliografia

**Klein A.M., Vaissiere B.E., Cane J.H., Steffan-Dewenter I., Cunningham S.A., Kremen C. and Tscharntke T. (2007).** “Importance of pollinators in changing landscapes for world crops”. *Proceedings of the Royal Society B*, 274: 303–313.

**FAO (2009).** FAOSTAT/Production/ Live Animals.[Http://Faostat.Fao.Org](http://Faostat.Fao.Org).

**Kluser S. and Peduzzi P. (2007).** “Global Pollinator Decline: A Literature Review”. UNEP/GRIDEurope.UNEP.

**Winfrey R. G. (2011).** “Valuing pollination services to agriculture”. *Ecological Economics*, 80- 88.

**Calderone N. W. (2012).** “Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: trend analysis of aggregate data for the period 1992-2009”. *PLoS ONE*, 7(5): e37235.

**Gallai N., Salles J.M., Settele J. and Vaissière B.E. (2009).** “Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline”. *Ecological economics* 68: 810–821.

**Potts S.G., Biesmeijer J.C., Kremen C., Neumann P., Schweiger O. and Kunin W.E. (2010).** “Global pollinator declines: trends, impacts and drivers”. *Trends in Ecology and Evolution*, 25: 345–353.

**EFSA (2008).** “Bee Mortality and Bee Surveillance in Europe”. A Report from the Assessment Methodology Unit in Response to Agence Francaise. *EFSA Journal Q-2008-428*

**Le Féon, V., Schermann-Legionnet, A., Delette, Y., Aviron, S., Billeter, R., Bugter, R., ... Burel, F.** (2010). "Intensification of agriculture, landscape composition and wild bee communities: a large scale study in four European countries". *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 137, 143-150.

**Il clima che cambia minaccia api e impollinatori (2018) - wwf -**  
[https://www.wwf.it/il\\_pianeta/clima\\_ed\\_energia/parigi\\_2015/?38720/il-clima-che-cambia-minaccia-le-api](https://www.wwf.it/il_pianeta/clima_ed_energia/parigi_2015/?38720/il-clima-che-cambia-minaccia-le-api)

[www.informamiele.it/wp-content/uploads/2019/07/Report-ISMEA-mancata-produzione-2019](http://www.informamiele.it/wp-content/uploads/2019/07/Report-ISMEA-mancata-produzione-2019).

**Maini, S., Medrzycki, P., Porrini, C.** (2010). "The puzzle of honey bee losses: a brief review". *Bulletin of Insectology*, 63 (1), 153-160.

**Winston M.L.** (1991). "The Biology of the Honey Bee". Harvard University Press. USA.

**Michener, C. D.** (1969). *Annu. Rev. Entomol*, 14, 299-342.

**Wilson, E. O.** (1971). "Le società degli insetti". Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge. Massachusetts.

**Batra, S.W.T.** (1966). "Nests and social behavior of halictine bees of India". *Indian J. Entomol.* 28: 375-93

**Heimpel G.E. and de Boer J.G.** (2008). "Sex determination in the hymenoptera". *Annual Review of Entomology*, 53: 209-230.

**Sammataro D. and Avitabile A.** (1998). "The Beekeeper's Handbook". Ithaca, New York: Cornell University Press.

**Neukirch A.** (1982). “Dependence of the lifespan of the Honeybee (*Apis Mellifica*) upon flight performance and energy consumption”. *Journal of Comparative Physiology B.* 146: 35-40.

**Guzman-Novoa E., Page R.E. Jr. and Gary N.E.** (1994). “Behavioral and life-history components of division of labor in honey bees (*Apis mellifera* L)”. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 34: 409–417.

**Page RE., Peng CYS.** (2001). “Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee (*Apis mellifera* L.)”. *Exp. Gerontol.* 36: 695–711.

**Haydak MH.** (1963). “Age of nurse bees and brood rearing”. *J. Apic. Res.* 2: 101–103.

**Remolina S.C., Hafez D.M., Robinson G.E. and Hughes K.A.** (2007). “Senescence in the worker honey bee *Apis mellifera*”. *J. Insect Physiol.* 53: 1027-1033.

**Amdam GV., Aase ALTO, Seehuus SC., Fondrk MK., Norberg K., Hartfelder K.** (2005). “Social reversal of immunosenescence in honey bee workers”. *Experimental Gerontology.* 40: 939-947.

**Neumann, P. and Carreck, N.** (2010). Honey bee colony losses. *J. Apic. Res.* 49 (1): 1-6.

**Flemming G.** (1871). “Animal plagues, Their history, nature and prevention”. Chapman and Hall.

**Rennie J., White P. B., Harvey E. J.** (1921); Isle of Wight Disease in hive bees; *Transactions of the Royal Society of Edimburgh* 52, 737-779.

**Moritz R. F. A., de Miranda J., Fries I., Le Conte Y., Nuemann P. and Paxton R. J.** (2010). "Research strategies to improve honeybee health in Europe". *Apidologie* 41: 227-242.

**Carvalho L.G., Kunin W.G., Keil P., Aguirre-Gutierrez J., Ellis W.E., Fox R., Groom Q., Hennekens S., Van Landuyt W., Maes D., Van de Meutter F., Michez D., Rasmont P., Ode B., Potts S.G., Reemer M., Roberts S.P.M., Schaminée J., WallisDeVries M.F. and Biesmeijer J.C.** (2013). "Species Richness Declines and Biotic Homogenisation have Slowed Down for NW European Pollinators and Plants". *Ecology Letters*, 16: 870–878.

**Ellis J.D., Evans J.D. and Pettis J.** (2010). "Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States". *Journal of apicultural research*, 49(1): 134-136.

**vanEngelsdorp D. and Meixner M.D.** (2010). "A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them". *Journal of invertebrate pathology*, 103: S80–S95.

**Aizen M.A. and Harder L.D.** (2009). "The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination". *Current Biology*, 19: 915-918.

**Van der Zee R., Gray A., Holzmann C., Pisa L., Brodschneider R., Chlebo R., Coffey M.F., Kence A., Kristiansen P., Mutinelli F., Nguyen B.K., Nouredine A., Peterson M., Soroker V., Topolska G., Vejsnæs F. and Wilkins S.** (2013). "Standard survey methods for estimating colony losses and explanatory risk factors in *Apis mellifera*". *Journal of Apicultural Research*, 52(4): 1-32.

**Schmuck R, Schöning R, Stork A, Schramel O.** (2001). Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers *Pest Management Science*; 57: 225-238.

**Lucci S, Sannino R, Visicchio F, Campanelli F, Crosti R.** (2008). Introduzione. In *Atti del Workshop “Sindrome dello spopolamento degli alveari”*. Ed. V. Bellucci, 7. Roma.

**Kaplan K.** (2008). “Colon collapse disorder” - A complex buzz, *American Bee Journal* 2008; 148: 617-618.

**Higes, M., Martin, R., Meana, A.** (2006). “*Nosema Ceranae*, A New Microsporidian Parasite In Honeybees In Europe”. *J. Invertebr. Pathol.*, 92: 81–83.

**Cox-Foster D.L., Conlan S., Holmes E., Palacios G., Evans J.D., Moran N.A., Quan P.L., Briese T., Hornig M., Geiser D.M., Martinson V., van Engelsdorp D., Kalkstein A.L., Drysdale A., Hui J., Zhai J., Cui L., Hutchison S.K., Simons J.F., Egholm M., Pettis J.S. and Lipkin W.I.** (2007). “A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder”. *Science*, 318: 283–287.

**Mutinelli F., Granato A.** (2007). “La Sindrome Del Collasso Della Colonia (Colony Collapse Disorder) negli Usa. Un Aggiornamento Sulla Situazione Attuale”. - *APOidea*, 4: 175-187.

**Genersch E., von der Ohe W., Kaatz H., Schroeder A., Otten C., Büchler R., Berg S., Ritter W., Mühlen W., Gisder S., Meixner M., Liebig G. and Rosenkranz P.** (2010). “The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies”. *Apidologie*, 41: 332–352.

**Dainat B., Evans J.D., Chen Y.P., Gauthier L. and Neumann P.** (2012). “Dead or alive: Deformed Wing Virus and Varroa destructor reduce the life span of winter honeybees”. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 981–987.

**Di Prisco G., Cavaliere V., Annoscia D., Varricchio P., Caprio E., Nazzi F., Gargiulo G. and Pennacchio F.** (2013). “Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees”. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 110(46): 18466-18471.

**Anderson D.L. and Trueman J.W.H.** (2000). “Varroa jacobsoni (Acari: Varroidae) is more than one species”. *Experimental and Applied Acarology*, 24: 165–189.

**Johnson R.** (2010). “Honey Bee Colony collapse disorder”. Congressional Research Service.

**Delfinado-Baker M. and Aggarwal K.** (1987). “A new Varroa (Acari: Varroidae) from the nest of Apis cerana (Apidae)”. *International Journal of Acarology*, 13: 233–237.

**De Guzman L.I. and Delfinado-Baker M.** (1996). “A new species of Varroa (Acari: Varroidae) associated with Apis koschevnikovi (Apidae: Hymenoptera) in Borneo”. *International Journal of Acarology*, 22: 23–27.

**Boecking O. and Genersch E.** (2008). “Varroosis – the ongoing crisis in bee keeping”. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 3: 221–228.

**Belletti P.A.** (2008). “Priorità d’intervento nello studio e nel controllo della sindrome dello spopolamento degli alveari”. Università degli studi di Udine - Dipartimento di Biologia e Protezione delle Piante.

**Bignami L.** (2008). “Scacco alla Regina”. National Geographic.

**De Jong D., De Jong P.H. and Gonçalves L.S.** (1982). “Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *V. jacobsoni*”. *Journal of Apicultural Research*, 21: 165–216.

**Duay P., de Jong D. and Engels W.** (2002). “Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development”. *Genetics and Molecular Research*, 1: 227–232.

**Amdam G.V., Hartfelder K., Norberg K., Hagen A. and 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 (3): 741–747.

**Kralj J., Brockmann A., Fuchs S. and Tautz J.** (2007). “The parasitic mite *Varroa destructor* affects non-associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera* L”. *Journal of Comparative Physiology A*, 193(3): 363–370.

**Kralj J. and Fuchs S.** (2006). “Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers”. *Apidologie*, 37(5): 577–587.

**Kellner N.** (1980). “Studie van de levenscyclus van *Nosema apis* Zander in de honigbij (*Apis mellifera* L.)”. PhD thesis, FacWetenschappen, Rijksuniversitet Gent, Belgium.

**Bailey L. and Fernando E.F.W.** (1972). “Effects of Sacbrood virus on adult honey bees”. *Annals of Applied Biology*, 72:27–35.

**Farrar CL.** (1947). "Nosema losses in package bees as related to queen supersedure and honey yields". *J EconEntomol*; 40:333–338.

**Maiolino P., Iafigliola L., Rinaldi L., De Leva G., Restucci B. and Martano M.** (2014). "Histopathological findings of the midgut in European honeybee (*Apis Mellifera* L.) naturally infected by *Nosema* spp.". *Veterinary Medicine and Animal Sciences*.

**Kralj J, Fuchs S.** (2010). "Nosema spp. Influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers". *Apidologie*; 41:21–28.

**Retschnig G., Geoffrey R.W., Schneeberger A. and Neumann P.** (2017). "Cold Ambient Temperature Promotes *Nosema* spp. Intensity in Honey Bees (*Apis mellifera*)". *Insects*; 8(20):1-12.

**Cédric A., Jean-Luc B. and Le Conte Y.** (2010). "Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honey bees (*Apis mellifera*)". *Environmental Microbiology*; 12(3):774-82.

**Hedtke K., Jensen P.M., Jensen A.B., Genersch E.** (2011). "Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood". *J Invertebr Pathol*; 108:167–173.

**Vidau C., Diogon M., Aufauvre J., Fontbonne R., Vigùès B., Brunet J.L., Texier C., Biron D.G., Blot N., El Alaoui H., Belzunces L.P. and Delbac F.** (2011). "Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*". *PloS ONE*; 6: e21550.

**Chen Y.P., Zhao Y., Hammond J., Hsu H.T., Evans J.D. and Feldlaufer M.** (2004). "Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses". *Journal of invertebrate pathology*; 87:84-93.

**Baker A. and Schroeder D.** (2008). "Occurrence and genetic analysis of picorna like viruses infecting worker bees of *Apis mellifera* L. populations in Devon, South West England". *Journal of invertebrate pathology*, 98: 239-242.

**Runckel C., Flenniken M.L., Enge J.C., Ruby J.G., Ganem D., Andino R. and DeRisi J.L.** (2011). "Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*". *PloS one*, 6(6): e20656.

**Chen Y.P., Evans J.D. and Feldlaufer M.F.** (2006). "Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*". *Journal of invertebrate pathology*, 92(3):152–159.

**Judy Y. Wu, Carol M. Anelli, Walter S. Sheppard.** (2011). "Sub-Lethal Effects of Pesticide Residues in BroodComb on Worker Honey Bee (*Apis mellifera*) Development and Longevity". *PLoS ONE*; 6(2): e 14720.

**Jeschke P., Nauen R., Schindler M. and Elbert A.** (2011). "Overview of the status and global strategy for neonicotinoids". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 2897–2908.

**Brown L.A., Ihara M., Buckingham S.D., Matsuda K. and Sattelle D.B.** (2006). "Neonicotinoid insecticides display partial and super agonist actions on native insect nicotinic acetylcholine receptors". *Journal of Neurochemistry*, 99: 608–615.

**Palmer M.J., Moffat C., Saranzewa N., Harvey J., Wright G.A. and Connolly C.N.** (2013). "Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees". *Nature Communications*, 4: 1634.

**Stever H., Kuhn J., Otten C., Wunder B., Harst W.** (2006). “Verhaltensänderung unter elektromagnetischer Exposition”. Universität, Institut für Mathematik, Arbeitsgruppe Bildungsinformatik. Verfügbar unter <http://agbi.uni-landau.de/materialien>.

**Korall H.** (1987). “The influence of amplified static magnetic fields on the time orientation of honeybees”. *Zoologische Jahrbucher, Physiologie*, 91 (3): 377-389.

**Kimmel S., Kuhn J., Harst W., Stever H.** (2007). “Electromagnetic Radiation: Influences On Honeybees (*Apis Mellifera*)”.

**Walker M. M., Bitterman M. E.** (1985). “Conditioned responding to magnetic fields by honeybees”. *Journal of Comparative Physiology*, 157 (1), 67-71.

**ISPRA.** (2011). Indagine tecnico conoscitiva sul fenomeno della moria delle api all'interno delle aree naturali protette Relazione Finale, pp 185 Linee Guida Min. Sal., 2014. Linee guida per la gestione delle segnalazioni di moria o spopolamento degli alveari connesse all'utilizzo di agro farmaci, reperibile all'indirizzo: <http://www.izslt.it/apicoltura/wp-content/uploads/sites/4/2017/03/Linee-guida-Ministero-Salute-Avvelenamenti-Api.pdf>

**Bellucci, V., Lucci, S., Campanelli, F., Sannino R., Formato, G., Giacomelli, A., Scaramozzino, ... Baggio A.** (2010). “Risultati del primo semestre di attività dell'indagine sul fenomeno della moria delle api all'interno delle aree naturali protette”. *APOidea Anno VII*, 23-27

**<https://ipbes.net/> - <https://ipbes.net/pollination-assessment>**

**IPCC, Climate Change.** (2007). “Impacts, Adaptation and Vulnerability Working Group II contribution to the Fourth Assessment Report”.

**Report Agence Francaise de Sécurité Sanitarie des Aliments (AFSSA).** (2008). “Mortalités, effondrements et affaiblissements des colonies d’abeilles”.

**Dustmann, J.H. et Von Der Ohe W.** (1988). “Influence des coups de froid sur le développement printanier des colonies d’abeilles”. *Apidologie* 19, (3), 245-253.

**Jones, J., Myerscough, M., Graham, S. et Oldroyd, B.P.** (2004). “Honey bee nest thermoregulation : Diversity promotes stability”. *Science* 305, (5682), 402-404.

**Tautz, J., Maier, S., Groh, C., Rossler, W. et Brockmann, A.** (2003). “Behavioral performance in adult honey bees is influenced by the temperature experienced during their larval development”. *Proceedings of the National Academy of Science U S A* 100, (12), 7343-7347.

**Bühler, A., Lanzrein, B. et Wille H.** (1983). “Influence of temperature and carbon dioxide concentration on juvenile hormone titre and dependent parameters of adult worker honey bees (*Apis mellifera* L.)”. *Journal of Insect Physiology* 29, (12), 885-893.

**Solimene U., Condemi V.** (2009). “Ricerca su possibili influenze dei fenomeni climatici ed ambientali quali fattori determinanti l’assottigliamento delle popolazioni apistiche mondiali”.

**Crailsheim, K., Riessberger Blaschon, B., Nowogrodzki, R. et Hrassnigg, N., Shortterm** (1999). “Effects of simulated bad weather conditions upon the behaviour of food-storer honeybees during day and night (*Apis mellifera carnica* Pollmann)”. *Apidologie* 30, (4), 299-310.

**Menzel A. et Fabian P.** (1999). “Growing season extended in Europe”. *Nature*, 397, 659.

**Rortais A., Arnold G., Halm M. P. and Touffet-Briens F.** (2005). “Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees”. *Apidologie*, 36: 71–83.

**Nicolson S.W. and Human H.** (2008). “Bees get a head start on honey production”. *Biology letters*, 4: 299–301.

**Doner L.W.** (1977). “The sugars of honey - a review”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28: 443–456.

**de Groot AP.** (1953). “Protein and amino acid requirements of the honey bee”. *Physiol Comp Oecol* 3:1–90.

**Wille H., Wille M., Kilchenmann V., Imdorf A. and Bühlmann G.** (1985). “Pollenernte und Massenwechsel von drei *Apis mellifera*-Völkern auf demselben Bienenstand in zwei aufeinanderfolgenden Jahren”. *Revue suisse de Zoologie*, 92: 897–914.

**Schmickl T. and Crailsheim K.** (2002). “How honeybees (*Apis mellifera* L.) change their broodcare behavior in response to non-foraging conditions and poor pollen conditions.” *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 51: 415-425.

**Ellis A.M. and Hayes G.W. Jr.** (2009). “An evaluation of fresh versus fermented diets for honey bees (*Apis mellifera*)”. *Journal of apicultural research*, 48: 215-216.

**Huang Z.** (2010). “Honey bee nutrition”. *American Bee Journal*, 150(8): 773-776.

**Ruedenauer, F. A., Wöhrle, C., Spaethe, J. and Leonhardt, S. D.** (2018). “Do honeybees (*Apis mellifera*) differentiate between different pollen types?” *PLoS ONE* 13 (11): e0205821. DOI:10.1371/journal.pone.0205821

**Kremen C., Williams N.M. and Thorp R.W.** (2002). “Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 16812– 16816.

**Manning R., Rutkay A., Eaton L. and Dell B.** (2007). “Lipid-enhanced pollen and lipid-reduced flour diets and their effect on the longevity of honey bees (*Apis mellifera* L.)”. *Australian Journal of Entomology*, 46: 251–257.

**Brodschneider R. and Cailsheim K.** (2010). “Nutrition and health in honey bees”. *Apidologie* 41: 278–294.

**Hoover S.E., Higo H.A. and Winston M.L.** (2006). “Worker honey bee ovary development: seasonal variation and the influence of larval and adult nutrition”. *Journal of Comparative Physiology B*, 176: 55–63.

**Szymas B. and Jedruszuk A.** (2003). “The influence of different diets on haemocytes of adult worker honey bees, *Apis mellifera*”. *Apidologie*, 34: 97–102.

**Alaux C., Ducloz F., Crauser D. and Le Conte Y.** (2010). “Diet effects on honey bee immunocompetence”. *Biology Letters*, DOI:10.1098/rsbl.2009.0986.

**DeGrandi-Hoffman G., Chen Y., Huang E. and Huang M.H.** (2010). “The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.)”. *Journal of Insect Physiology*, 56: 1184-1191.

**van Dooremalen C., Stam E., Gerritsen L., Cornelissen B., van der Steen J., van Langevelde F. and Blacquiére T.** (2013). “Interactive effect of reduced pollen availability and *Varroa destructor* infestation limits growth and protein content of young honey bees”. *Journal of Insect Physiology*, 59: 487-493.

**Aronstein, Katherine A., Saldivar E., Vega R., Westmiller S., and Douglas A.E.** (2012). “How *Varroa* Parasitism Affects the Immunological and Nutritional Status of the Honey Bee, *Apis Mellifera*.” *Insects*, 3030601.

**Nazzi F., Brown SP., Annoscia D., Del Piccolo F., Di Prisco G., Varricchio P., Della Vedova G., Cattonaro F., Caprio E. and Pennacchio F.** (2012). “Synergistic Parasite-Pathogen Interactions Mediated by Host Immunity Can Drive the Collapse of Honeybee Colonies”. *PLoS Pathogens* 8(6): e1002735. doi:10.1371/journal.ppat.1002735.

**Nazzi F. and Pennacchio F.** (2014). “Disentangling multiple interactions in the hive ecosystem”. *Trends in parasitology*, 30(12): 556–561.

**Di Prisco G., Annoscia D., Margiotta M., Ferrara R., Varricchio P., Zanni V., Caprio E., Nazzi F. and Pennacchio F.** (2016). “A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health”. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 113(12): 3203–3208.

**Mao W., Schuler M.A. and Berenbaum M.R.** (2013). “Honey constituents upregulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*”. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 110: 8842-8846.

**Wheeler M.M. and Robinson G.E.** (2014). “Diet-dependent gene expression in honey bees: honey vs. sucrose or high fructose corn syrup”. *Scientific reports*, 4: 5726.

**Alaux C., Dantec C., Parrinello H. and Le Conte Y.** (2011). “Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen’s nutritive effects on healthy and Varroa-parasitized bees”. *BMC Genomics*, 12: 496.

**Schmehl D.R., Teal P.E., Frazier J.L. and Grozinger C.M.** (2014). “Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*)”. *Journal of Insect Physiology*, 71: 177-190.

**Mith CK, Riddiford LM.** (2007). “Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects”. *Bio Essays*; 29:344–55.

**Gillot C.** (1995). *Entomology*. Plenum Press, New York.

**Chapman, R. F.** (1998). “The Insects: structure and function”. 4<sup>th</sup> ed. Cambridge University Press.

**Lockey KH.** (1988). “Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function”. *Comp. Biochem. Physiol.* 89B: 595-645.

**Dean, R.L.; Locke, M.; Collins, J.V.** (1985). “Structure of the fat body”. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*; Kerkut, G.A., Gilbert, L.I., Eds.; Pergamon Press: Oxford, UK; Volume 3, pp. 155–210.

**Locke, M.; Collins, J.V.** (1968). “Protein uptake into multivesicular bodies and storage granule in the fat body of an insect”. *J. Cell Biol.*, 36, 453–483.

**Locke, M. Et Al.** (1982). “Developmental Changes In The Synthesis Of Haemolymph Polypeptides And Their Sequestration By Prepupal Fat Body In *Calpododes Ethlius* Stoll, Lepidoptera, Hesperiiidae”. *Insect Biochemistry*, Elmford, V. 12, P. 431-440.

**Locke, M.** (1984). “The Structure And Development Of The Vacuolar System In The Fat Body Of Insects”. In: King, R. C.; Akai, H. *Insect Ultrastructure*. New York: Plenum Press. P. 151-197

**Law JH, Wells MA.** (1989). “Insects as biochemical models”. *J Biol Chem*; 264:16335–38.

**Keeley, L.L.** (1985). “Physiology and biochemistry of the fat body”. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*; Kerkut, G.A., Gilbert., L.I., Eds.; Pergamon Press: Oxford, UK; Volume 3, pp. 211–248.

**Amdam G.V., Norberg K., Hagen A., Omholt S.W.** (2003). “Social exploitation of vitellogenin”. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 100: 1799–1802.

**Crailsheim K.** (1992). “The flow of jelly within a honeybee colony”. *J Comp Physiol B* 162, 681–689.

**Seehus S.C., Norberg K., Gimse U., Krekling T., Amdam G.V.** (2006). “Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 926-927.

**Gade G.** (2004). “Regulation of intermediary metabolism and water balance of insects by neuropeptides”. *Annu Rev Entomol.*; 49:93–113.

**Ferrandon D, Imler JL, Hetru C, Hoffmann JA.** (2007). “The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections”. *Nat Rev Immunol.*; 7:862–74.

**Fehlbaum P., Bulet P., Michaut L., Lagueux M., Broekaert W.F., Hetru C. and Hoffmann J.A.** (1994). "Septic injury of *Drosophila* induced the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides". *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 33159-33163.

**Meister M., Hetru C. and Hoffmann J.A.** (2000). "The antimicrobial host defense of *Drosophila*". *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 248: 17-36.

**Boman HG.** (1991). "Antibacterial peptides: key components needed in immunity". *Cell*, 65: 295-207.

**Brey P.T., Lee W.J., Yamakawa M., Koizumi Y., Perrot S., François M. and Ashida M.** (1993). "Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90: 6275-6279.

**Kylsten P., Kimbrell D.A., Daffre S., Samakovlis C. and Hultmark D.** (1992). "The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: different genes are expressed in midgut and salivary glands". *MGG*, 232: 335-343.

**Corona, M., Velarde, R. A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K. A., & Robinson, G. E.** (2007). "Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (17), 7128.

**Purać, J., Kojić, D., Petri, E., Popović, Ž. D., Grubor-Lajšić, G., & Blagojević, D. P.** (2016). "Cold adaptation responses in insects and other arthropods: an "omics" approach". In *Short views on insect genomics and proteomics* (pp. 89-112).

## **Ringraziamenti**

Scrivere i ringraziamenti è un po' come tagliare la linea di un traguardo: riesci a voltarti indietro e a pensare al percorso che hai compiuto, poi respiri, e ritorni a correre perché solo dopo che hai superato quella linea riesci a capire realmente quante difficoltà hai incontrato, quanti sorrisi hai accennato e quante notti insonni hai passato a pensare a cosa sarà.

Oggi, invece, penso a cosa è stato, a chi ci è stato e continua ad esserci nonostante le distanze, nonostante il tempo, nonostante tutto.

**Ringrazio mia madre** per tutto l'amore che mi ha dato, per tutto ciò che ha fatto per me, per la donna che sono diventata. A te dedico le mie vittorie, i miei sorrisi perché sento di non averti detto ancora tutto, perché sento che tutto non mi basterà una vita a dirtelo. Ti vedo sempre nelle tue espressioni più belle, mi perdo ancora nel ricordo dei tuoi occhi color cielo, mi ritrovo sempre nel pensiero dei tuoi abbracci. E mi capita di ritrovarti la sera, quando tutti dormono, quando guardo il cielo e ti cerco tra le stelle, e tu sei lì, oggi come ieri ad illuminare i miei passi e a far luce nel mio cielo. Continua ad amarmi mamma come solo tu sai fare.

**Ringrazio mio padre** per i sacrifici fatti per farmi studiare, per gli sguardi di rimprovero e per quelli di orgoglio. Mi hai osservata in silenzio, hai capito i miei dolori, i miei sbalzi di umore, la mia solitudine. Hai sopportato i miei mali umori, la mia rabbia e mi hai abbracciato. Mi hai sollevata dagli abissi dei ricordi e mi hai sorriso insegnandomi che va bene voltarsi indietro, ma che poi bisogna ritornare a guardare avanti, perché è importante curare i ricordi ma lo è anche vivere.

**Ringrazio mio zio Peppino** per i sorrisi e gli abbracci. Mi hai insegnato tanto, forse più degli altri. Mi ha insegnato che al buio si possono immaginare i colori, che gli abbracci possono farti sentire al sicuro e che le mani possono toccare visi e disegnare carezze.

**Ringrazio Maria.** So di avere un carattere particolare, a causa del quale non sempre vengo compresa da tutti, ma va bene non piacere a tutti sai. Abbiamo affrontato dolori e gioie insieme. Il destino beffardo ci ha tolto le persone che più amavamo, e noi, nonostante il cuore rotto, ci siamo rialzate. Ci siamo combattute, sopportate, supportate e amate. A te che sei molto diversa da me, che sei così fragile e un secondo dopo forte come una quercia, grazie.

**Ringrazio Attanasio** per avermi sopportato. Non so cosa ci riserverà il futuro e quali situazioni ci troveremo ad affrontare, so solo che comunque vada potremmo contare l'uno sull'aiuto dell'altro perché abbiamo corso insieme gridando di gioia, scalato alte montagne, precipitati verso il buio profondo per poi guardare con occhi fieri e dall'altro il mondo.

**Ringrazio Davide** per essermi accanto.

Hai sopportato con pazienza le mie innumerevoli giornate no, mi hai incoraggiato a non smettere mai di correre verso il traguardo e a lottare sempre per le cose desiderate.

Mi hai vista preoccupata, nascondere la rabbia e asciugarmi velocemente le lacrime.

Hai saputo regalarmi sorrisi, carezze e abbracci che hanno sfiorato delicatamente la mia anima.

Mi hai donato distrazioni (ricordiamo Spizzone), amore e rispetto.

Abbiamo affrontato insieme molte avventure, conosciuto posti nuovi e fatto amicizia, tu con i piccioni (Cocorito) ed io con gli scoiattoli. Abbiamo riso per il mio continuare a parlare in inglese con un commesso che mi aveva detto di essere italiano. Abbiamo macinato km su km per mangiare il mondo la sera.

Ci siamo scambiati riflessioni, opinioni e idee. Mi hai ascoltato parlare di scienza in ogni museo che abbiamo visitato. Ti ho ascoltato mentre parlavi di basket, di wow, di tastiere e altre cose da gamer, senza mai capirci niente ma amando moltissimo la passione che ci metti in ogni cosa che fai.

Non ci siamo mai stancati di ascoltarci e anche nel silenzio, non ci siamo mai stancati di guardarci. Tu sei la mia persona ed io ho e avrò sempre bisogno del tuo sostegno perché sei l'unico che mi conosce davvero e come dice una canzone che mi hai dedicato *“There's no fear here when you're lying in my arms... 'Cause you make me feel at home”*

**Ringrazio Ivana**, amica di sempre. Siamo cresciute insieme, e, ormai, conosci ogni piccola sfaccettatura del mio carattere per questo non te la prendi se non mi faccio sentire, se qualche volta leggo i messaggi e non rispondo perché sai che ci sono e che ci sarò.

**Ringrazio i miei cognati Eugenio e Ida.**

**Ringrazio Valeria e Angela** mie amiche di avventura.

Ci siamo scelte dal primo giorno in cui ci siamo viste. Abbiamo riso insieme pur non conoscendoci bene.

Poi abbiamo imparato sempre di più l'una dell'altra.  
Valeria ha imparato a calmarmi e tu Angela hai imparato a capire quando c'è qualcosa che non va.

Ed io ho imparato a capirvi con un solo sguardo, a leggervi.

Ho imparato a leggere nei vostri occhi la paura di non farcela e poi la gioia di esserci riuscite. Ci siamo supportate ad ogni esame.

Abbiamo affrontato la neve a Napoli in quel, ormai lontano, febbraio 2018. Abbiamo riso, ci siamo arrabbiate, abbracciate e consolate. Abbiamo sclerato per gli ultimi esami, bevuto caffè improponibili alle macchinette, mangiato insieme condividendo momenti di follia. Abbiamo iniziato insieme questo percorso ed insieme stiamo per tagliare la linea del traguardo.

**Ringrazio la mia correlatrice, la prof.ssa Paola Maiolino,** per avermi accompagnato in questo percorso con disponibilità e gentilezza e per il grande supporto nella stesura di questa tesi.

**Ringrazio la prof.ssa Martano** per l'affettuosa pazienza e per la fiducia.

**Ringrazio la dott.ssa Karen Power** per avermi aiutato, supportato, sorriso ed abbracciata quando ne avevo bisogno. Per esserci stata sempre, per aver condiviso con me la gioia della nascita di Emma. Per avermi arricchito anche solo con un sorriso.

**Ringrazio il mio relatore, il prof.re Angelo Genovese** per avermi insegnato a guardare le cose da una prospettiva nuova.

Concludo con un pensiero che dovrei ripetermi ogni giorno: *non imparare a non cadere, è inevitabile. Impara come rialzarti, sempre!*

*Ridere ci ha resi invincibili.  
Non come coloro che vincono sempre,  
ma come coloro  
che non si arrendono.*

**Grazie**

