

**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**

**Analisi morfologica, morfometrica e biomolecolare delle ghiandole ipofaringee delle api e relazione con l'alimentazione proteica**

**Morphological, morphometric and biomolecular analysis of the hypopharyngeal glands of the honey bees and relationship with protein feeding**

Relatore

Ch.mo Prof.

Angelo Genovese

Candidata

Valeria Di Maio

Matr. N99001918

Correlatrice

Ch.ma Prof.ssa

Paola Maiolino

**ANNO ACCADEMICO 2018/2019**

***Fai della tua vita un sogno,  
e di un sogno una realtà.***

*(Antoine de Saint-Exupéry)*

# INDICE

## CAPITOLO I

### 1. INTRODUZIONE

<b>1.1</b>	<b>Importanza dell'apicoltura.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2</b>	<b><i>Apis mellifera</i>.....</b>	<b>7</b>
1.2.1	Organizzazione sociale.....	8
1.2.2	Superorganismo Ape.....	12
<b>1.3</b>	<b>Sindrome dello spopolamento dell'alveare.....</b>	<b>14</b>
<b>1.4</b>	<b>Alimentazione delle api.....</b>	<b>23</b>
1.4.1	Importanza del polline sulla salute delle api.....	24
<b>1.5</b>	<b>Vitellogenina e salute delle api.....</b>	<b>30</b>
<b>1.6</b>	<b>Sistema immunitario.....</b>	<b>32</b>
1.6.1	Barriere fisiche.....	33
1.6.2	L'immunità sociale.....	35
1.6.3	L'immunità cellulare.....	36
1.6.4	L'immunità umorale.....	38
<b>1.7</b>	<b>Ghiandole ipofaringee e salute delle api.....</b>	<b>39</b>

## CAPITOLO II

<b>2.1</b>	<b>Scopo della tesi.....</b>	<b>42</b>
<b>2.2</b>	<b>Materiali e metodi.....</b>	<b>43</b>
2.2.1	Esame macroscopico e microscopico.....	43
2.2.2	Analisi morfometrica.....	44
2.2.3	Estrazione di RNA, retro-trascrizione (RT) e Real-time PCR quantitativa (qPCR).....	44

## **CAPITOLO III**

<b>3.1 Risultati.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1.1 Esame macroscopico e microscopico.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1.2 Risultati morfometria.....</b>	<b>48</b>
<b>3.1.3 Real-time PCR quantitativa (qPCR).....</b>	<b>48</b>
<b>Considerazioni e conclusioni.....</b>	<b>50</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>51</b>

# CAPITOLO I

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 Importanza dell'apicoltura

L'ape, definita da Plinio nel suo *Historia naturalis* “*neque mansueti, neque feri*” non è un animale domestico e neppure selvatico ma qualcosa di intermedio, una creatura capace di contrarre rapporti con noi senza perdere la propria libertà. Sono alcune delle “creature lavoratrici” più dure del pianeta e fin dalla comparsa dell'uomo sulla terra, hanno rivestito un ruolo di primaria importanza, infatti sono responsabili dell'impollinazione di circa un sesto delle specie di piante da fiore in tutto il mondo e di circa 400 diversi tipi di piante agricole (Fig. 1); secondo le stime dell'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO), delle 100 specie di colture che forniscono il 90% di prodotti alimentari in tutto il mondo, 71 sono impollinate dalle api.

	Colture dipendenti (1)		Colture favorite (2)
<b>ALBERI DA FRUTTO</b>	Albicocco - alcune cultivar Castagno Ciliegio dolce Mandorlo Melo - quasi tutte le cultivar Pero - molte cultivar Pesco - alcune cultivar Susino - molte cultivar		Albicocco Kaki Lampone Mirtillo Melo Pero Pesco Susino
<b>FORAGGERE PER SEME</b>	Erba medica Favino Ginestrino Lupinella	Trifoglio alessandrino Trifoglio ibrido Trifoglio ladino Trifoglio violetto Veccia	Trifoglio incarnato
<b>COLTURE ORTICOLE PER SEME</b>	Aglio Asparago Bietola Broccolo Carota  Cavolo Bruxelles Cavolo cappuccio Cavolo cinese Cavolfiore Cavolo rapa Cavolo verza Cetriolo Cipolla	Cocomero Melone Pastinaca Porro  Prezzemolo Ravanello Rutabaga Sedano Senape Zucca Zucchini	Melanzana Peperone
<b>COLTURE ORTICOLE</b>	Cetriolo Cocomero Melone Zucca Zucchini		Fragola Piante oleaginose: Colza Cartamo Lino Ravizzone

Fig. 1 - Principali colture agricole impollinate dalle api (fonte: <https://www.informamiele.it>)

Solo negli Stati Uniti l'impollinazione da ape contribuisce per un terzo alla produzione di alimenti di origine vegetale, poiché la maggior parte delle colture, tra le quali quelle fruttifere, orticole ed erbacee, necessitano della presenza di insetti impollinatori per fruttificare (Johnson, 2008). Forniscono quindi uno dei servizi ecologici più riconoscibili, ma oltre ai citati benefici all'attività agricola, contribuiscono alla ricchezza e al benessere dell'uomo grazie anche alla produzione di miele e prodotti derivati quali cera, propoli e gelatina reale.

Il procedere degli studi sulle caratteristiche chimico-fisiche e sulle proprietà di questi prodotti ne ha esteso enormemente i settori d'impiego, spaziando da quello alimentare a quello cosmetico e farmaceutico. Basti pensare all'interesse suscitato dalle sostanze polifenoliche, contenute in molti prodotti tra cui il miele e la propoli come "anti-promotori" e "anti-induttori" della carcinogenesi (Viola, 1997). Inoltre l'attività delle api concorre alla protezione e al mantenimento degli ecosistemi e delle specie animali e vegetali contribuendo alla diversità genetica e biotica. Le api svolgono anche l'importante ruolo di indicatori ambientali; sono molte infatti le caratteristiche etologiche e morfologiche che fanno dell'ape un buon rivelatore ecologico:

- è facile da allevare;
- è un organismo quasi ubiquitario;
- non ha grandi esigenze alimentari;
- ha il corpo coperto di peli che la rendono particolarmente adatta a intercettare materiali e sostanze con cui entra in contatto;
- è altamente sensibile alla maggior parte dei prodotti antiparassitari che possono essere rilevati quando sono sparsi impropriamente nell'ambiente (per esempio durante la fioritura, in presenza di flora spontanea, in presenza di vento, ecc.);
- l'alto tasso di riproduzione e la durata della vita media, relativamente corta, induce una veloce e continua rigenerazione nell'alveare;
- ha un'alta mobilità e un ampio raggio di volo che permette di controllare una vasta zona;
- effettua numerosi prelievi giornalieri;
- perlustra tutti i settori ambientali (terreno, vegetazione, acqua, aria);

- ha la capacità di riportare in alveare materiali esterni di varia natura e di immagazzinarli secondo criteri controllabili;
- necessità di costi di gestione estremamente contenuti, specialmente in rapporto al grande numero di campionamenti effettuati (Porrini, 2007).

Per tali motivi la loro presenza, assenza o quantità può essere utilizzata come segnale di una corretta gestione del territorio, indice che qualcosa sta accadendo e che è necessaria un'azione appropriata. Osservando inoltre lo sviluppo e la salute delle api, è possibile accertare così i cambiamenti nell'ambiente. A causa di questo stretto legame, qualsiasi problematica sanitaria e ambientale che investa le api è di crescente preoccupazione.

## 1.2 *Apis mellifera*

L'*Apis mellifera* è un insetto sociale, appartenente all'ordine degli Imenotteri, famiglia degli Apidi e al genere *Apis*, al quale appartengono altre tre specie (Fig. 2):

- *Apis dorsata* o ape gigante diffusa in India, Indocina e Indonesia. È molto aggressiva e costruisce un unico grande favo spesso appeso alle rocce o ai rami degli alberi;
- *Apis florea* o ape nana di dimensioni inferiori rispetto alla mellifera diffusa nelle stesse regioni della precedente. Costruisce un unico favo molto piccolo appeso ai rami degli alberi;
- *Apis indica* o *Apis cerana*, simile alla mellifera, diffusa in India e Cina. Costruisce i nidi entro cavità di rocce o alberi formati da vari favi verticali e affiancati.

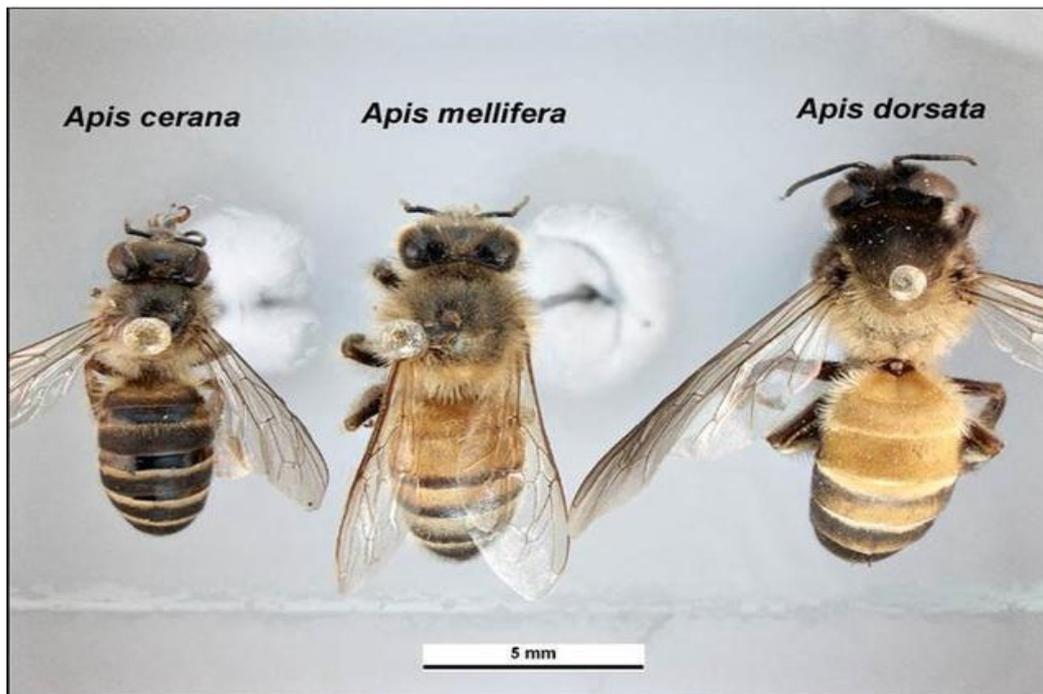


Fig. 2 - Specie di *Apis cerana*, *A. mellifera*, *A. dorsata* (fonte: <http://www.padil.gov.au>)

Attualmente l'*Apis mellifera*, detta anche ape domestica, è diffusa in tutto il mondo ed 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, si distingue, dalle altre razze europee per il colore giallo dei primi segmenti dell'addome. È considerata l'ape industriale per eccellenza per le sue positive caratteristiche di elevata operosità, prolificità delle regine e bassa tendenza alla sciamatura.

### 1.2.1 Organizzazione sociale

Ogni colonia è caratterizzata da una società matriarcale, monoginica e pluriennale, suddivisa in due caste (Fig.3):

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

La determinazione del sesso nelle api segue il sistema aplo-diploide, piuttosto comune negli insetti dell'ordine degli *Hymenoptera*, dove i maschi sono aploidi e le femmine diploidi (Heimpel, de Boer, 2008). Le api operaie si distinguono facilmente perché hanno il corpo ricoperto da una fitta peluria, le ali lunghe quasi quanto il corpo e gli occhi ben separati dalla fronte.

I fuchi invece sono di dimensioni maggiori, ma tozzi, hanno ali più lunghe del corpo e occhi molto grandi tanto da arrivare quasi a congiungersi. Le regine sono più grandi e più snelle, possiedono un grande addome turgido e lucente. Tutte e tre le caste attraversano quattro fasi di sviluppo: uovo, larva, pupa e adulto.

Il ciclo inizia quando una regina fertile depone un uovo nella cella preparata dalle api; dopo circa tre giorni schiude la larva che galleggia nella pappa reale secreta dalle api nutrici. Le larve crescono rapidamente nel corso dei successivi 6 giorni, aumentando il loro peso corporeo da 1500 a 1700 volte (Oliver, 2010).

Intorno al sesto giorno ogni larva fila un bozzolo all'interno della cella e le api operaie coprono ogni cella con un rivestimento di cera. Questo è l'inizio dello stadio di pupa che dura circa 12 giorni (Kevan, 2007).

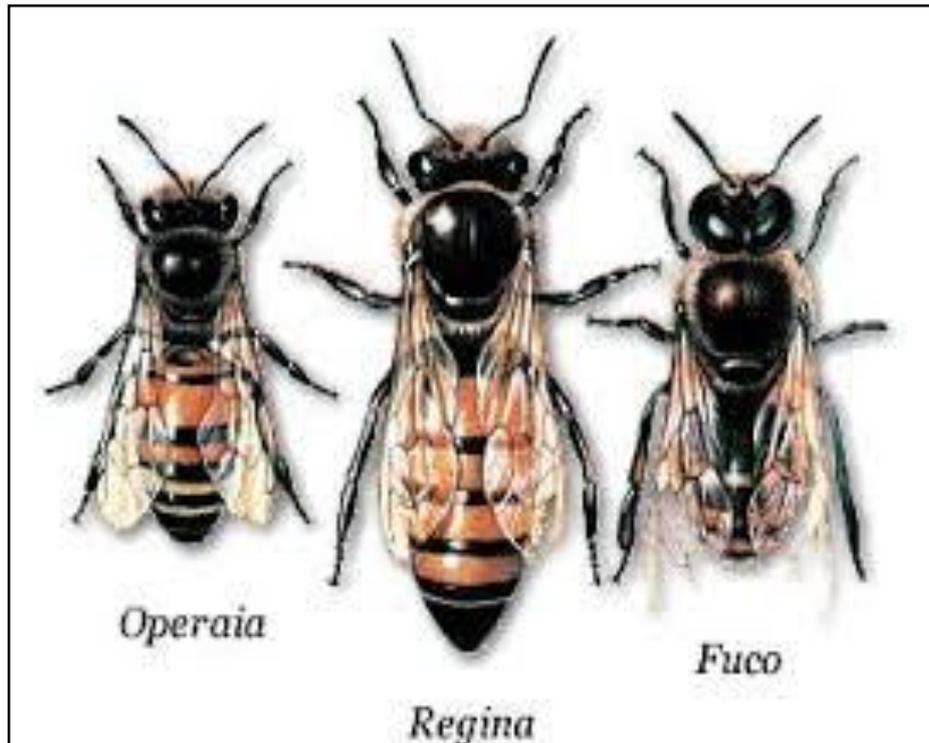


Fig. 3- Organizzazione sociale dell'alveare (fonte: <https://viaggioamathland.jimdo.com>)

- APE REGINA

Nasce da un uovo fecondato alimentato per tutta la durata della fase larvale con sola pappa reale e deposto in una particolare cella a forma di ghianda detta “cella reale”.

La funzione dell'ape regina è quella di accoppiarsi e di deporre alcune migliaia di uova al giorno. La regina può deporre circa 2000 uova al giorno e la colonia può aumentare da poche migliaia a decine di migliaia di api in diverse settimane (Tautz, 2008). La regina si accoppia con i fuchi una sola volta ed è in grado di immagazzinare tutto lo sperma nella spermateca e conservarlo per tutta la sua vita.

La durata di deposizione delle uova è mediamente di tre-quattro anni, dopodiché la regina diventa fucaiola, riuscendo a deporre solo covata maschile. Dal punto di vista genetico, è in tutto e per tutto identica alle operaie.

L'unica differenza è il tipo di alimentazione che la larva reale ha ricevuto, e che l'adulto continuerà a ricevere per tutto il resto della vita, ovvero esclusivamente pappa reale, dalla schiusa dell'uovo all'opercolatura (Fig.4). Produce una serie di ferormoni tra cui l'acido(E)-9-oxodec-2-enoico (9-ODA) capace di svolgere le più importanti funzioni, quali l'inibizione fisiologica dello sviluppo ovarico nelle api operaie ed il richiamo del maschio.



**Fig. 4- Ape regina all'interno del favo (fonte: [www.mondoapi.it](http://www.mondoapi.it))**

- **FUCHI**

Sono i maschi delle api, sviluppati da uova non fecondate presenti all'interno di cellette più grandi e con gli opercoli, con i quali le operaie le chiudono, convessi.

Di solito nascono quando la regina è al secondo anno di vita o da api operaie che iniziano a deporre uova. La funzione dei fuchi non è solo quella di accoppiarsi con le regine, ma anche di contribuire alla vita della colonia. Essi sono infatti utili nella produzione di calore e alla distribuzione del cibo all'interno dell'arnia.

A fine estate, però, quando non sono più di alcuna utilità, i fuchi eventualmente ancora presenti nell'alveare, vengono cacciati all'esterno o addirittura uccisi dalle api operaie (Fig.5).



**Fig. 5 - Fuco (fonte: <https://ianuaapi.it>)**

- **API OPERAIE**

Nascono da uova fecondate e vengono poi alimentate con pappa reale nei primi tre giorni di vita e con miele e polline nei successivi. Dalla deposizione alla comparsa delle giovani api trascorrono tre settimane. I loro compiti sono molteplici e si differenziano in base all'età. Per circa tre giorni dopo la nascita si dedicano alla pulizia e alla preparazione delle celle che debbono accogliere le uova deposte dalla regina.

Dal quarto giorno iniziano a sorvegliare e nutrire la covata e per questo motivo prendono il nome di *nutrici*. Queste si occupano prima delle larve più anziane fornendo loro miele, polline e acqua, poi, con lo sviluppo delle ghiandole ipofaringee che producono pappa reale, si occupano delle larve deposte da meno di tre giorni e di quelle reali.

Dal decimo al sedicesimo giorno entrano in funzione le ghiandole ceripare e iniziano, quindi, ad occuparsi dei lavori di costruzione e riparazione dei favi.

A circa venti giorni dalla nascita si dedicano alla difesa della comunità e, fino alla fine della loro vita, alla raccolta del cibo nei campi, assumendo la funzione di api *bottinatrici* (Fig.6).



**Fig. 6 - Api operaie sul favo (fonte: <https://mielemediterraneo.it>)**

### 1.2.2 Superorganismo ape

La definizione di superorganismo è usata principalmente per descrivere un gruppo di insetti eusociali, in cui la divisione del lavoro è altamente specializzata e in cui ogni individuo non è in grado di sopravvivere da solo per periodi prolungati. Il termine super organismo fu coniato da William Morton Wheeler (1928) per indicare le società di insetti che possiedono caratteristiche organizzative analoghe ai processi fisiologici degli organismi superiori. Questi includono anche le api da miele.

Wilson e Sober, invece, nel 1989, riassumono il concetto di super organismo come “un insieme di singoli individui che insieme posseggono l’organizzazione funzionale che è implicita nella definizione formale di organismo”.

Ciò significa quindi che ciascun individuo è dipendente dalla colonia per la sua sopravvivenza e può essere assimilato ad una singola cellula del corpo di un organismo superiore, il quale non può fare a meno delle singole unità (cellule), sane e perfettamente funzionanti per garantire la sopravvivenza dell'intero sistema vitale.

L'ape mellifera vive in colonie all'interno della quale vi è una precisa ripartizione dei compiti, atta a garantire lo sviluppo e il sostentamento della famiglia e, ove necessario, ad attuare comportamenti di difesa sociale nei confronti delle aggressioni esterne.

Per tale motivo essa viene definita eusociale. L'eusocialità si raggiunge con la sovrapposizione nel nido di più generazioni e con la divisione riproduttiva del lavoro tra le caste. La distinzione tra api primitivamente sociali e api altamente sociali poggia soprattutto sulla presenza in queste ultime di femmine strutturalmente differenti e sulla sopravvivenza, allo svernamento o alla fine del ciclo della colonia, delle sole femmine sessuate. (Ricciardelli D'Albore G., Intoppa F., 2000).

La famiglia delle api che popola l'alveare costituisce quindi un sistema capace di autogestirsi e di adattarsi all'ambiente che lo circonda grazie all'efficace metodo di comunicazione esistente fra le sue componenti: le api stesse (Fig. 7).



**Fig. 7 – Sciame di api che costruisce un alveare (Fonte: [www.focus.it](http://www.focus.it))**

### 1.3 Sindrome dello spopolamento dell'alveare

Negli ultimi decenni le api sono state interessate da fenomeni di morie che hanno destato più di qualche preoccupazione, non solo nel mondo dell'apicoltura.

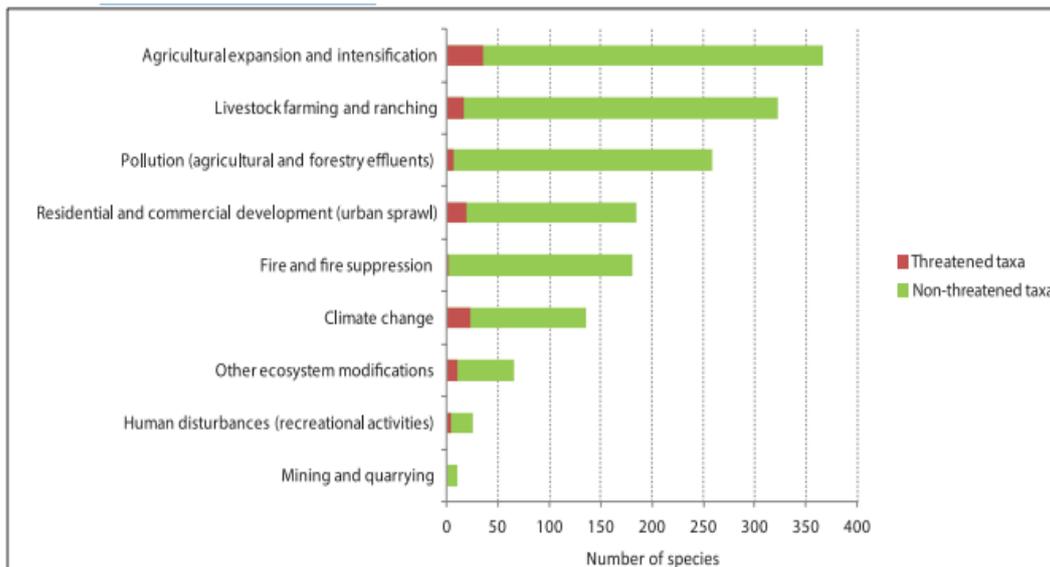
I primi casi di questa nuova emergenza per la salute delle api sono stati segnalati negli Stati Uniti nell'inverno del 2006/2007, quando furono riportati improvvisi e misteriosi episodi di spopolamento degli alveari che determinarono la perdita dal 30 al 90% di colonie di api statunitensi (vanEngelsdorp et al., 2007). A quest'allarme seguirono altre segnalazioni di questo tipo, con notevoli perdite di api accomunate da sintomi differenti da quelli tipici dell'alveare, che hanno permesso di definire una vera e propria sindrome alla quale è stato dato il nome di "*Colony Collaps Disorder*" o CCD (vanEngelsdorp et al., 2009) o "sindrome dello spopolamento degli alveari".

La Sindrome da spopolamento degli alveari ha segni rivelatori particolari che la rendono facilmente individuabile (van der Zee et al., 2013):

- Rapida perdita della maggior parte delle api operaie
- Presenza di una covata abbondante
- Presenza della regina
- Abbondanza di scorte di cibo (sia di miele che di polline)
- Le scorte non sono immediatamente rubate da altre api e l'attacco da parte di altri insetti è notevolmente ritardato
- Notevole mancanza di api operaie morte sia al di fuori che all'interno dell'arnia
- Livelli bassi e non dannosi di *Varroa* e/o *Nosema*.

Non è possibile, quindi, attribuire a un solo fattore il calo complessivo della popolazione di api o della loro salute generale. Questo calo è senza dubbio il prodotto di molteplici fattori, alcuni noti e altri sconosciuti, che agiscono singolarmente o in combinazione fra loro, come l'azione di agenti patogeni, i pesticidi, l'inquinamento ambientale ed i cambiamenti climatici (Fig. 8).

Ulteriori fattori responsabili della scomparsa delle api sono la progressiva diminuzione delle piante mellifere e l'uso massiccio di prodotti fitosanitari e di tecniche agricole poco sostenibili (monocolture).



**Fig. 8 - Principali minacce delle api in Europa (fonte: <https://ec.europa.eu>)**

Le colonie di api da miele sono diminuite solo in Europa del 25% in 20 anni.

Secondo i dati STEP (*Status and Trends of European Pollinators*), il 9,2% delle 1965 specie di insetti impollinatori sta per estinguersi, mentre un ulteriore 5,2% potrebbe essere minacciato nel prossimo futuro. 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). In una recente recensione sulla rivista *Science*, (Goulson et al., 2015) vengono indicati diversi fattori interagenti:

- disponibilità di cibo e risorse del nido;
- azione di agenti patogeni quali *Varroa* e *Nosema*;
- esposizioni agli agrofarmaci;
- cambiamenti climatici.

Uno dei più importanti fattori che limita la popolazione di api è la **disponibilità di cibo**. La conversione del terreno in abitazioni, strade ed altre infrastrutture urbane limita ed isola la zona delle piante fiorite, in tal modo le risorse risultano essere insufficienti per le api che richiedono nettare e polline (Fig. 9).

Anche le grandi estensioni di monocoltura possono contribuire all'indebolimento delle colonie e quindi alla loro maggiore suscettibilità ai patogeni. Queste, infatti,

limitano necessariamente la disponibilità di fonti alimentari integrative per le api, causandone la malnutrizione e quindi un generale indebolimento delle colonie.

Le api, infatti, si affidano esclusivamente alle piante che visitano per le loro esigenze nutrizionali; a loro volta agiscono come vettori di polline trasportandolo mentre volano da un fiore all'altro. Questa relazione mutualistica è responsabile del successo riproduttivo di oltre l'85% delle piante da fiore e di oltre 200 miliardi di dollari di prodotti alimentari (Miller-Struttman, 2016).

Pertanto l'effetto della disponibilità di risorse alimentari è direttamente correlato ai risultati sulla salute delle api, sulla forma fisica e sulla sopravvivenza globale (Belsky et al., 2019), in particolare la scarsità di risorse alimentari si traduce in marcati effetti sulla crescita, sulle aspettative di vita, sulla fisiologia e sulle capacità lavorative delle singole api, oltre che ovviamente sulla resistenza alle singole patologie o alla loro associazione. In carenza di proteine le nutrici presentano un'atrofia delle ghiandole ipofaringee, precoce attività di bottinamento (Free 1961; Wang et Moeller 1970 citati da Crailsheim) e ridotta attività di nutrizione delle larve. Le nutrici infatti abbandonano le larve più giovani per nutrire solo quelle in cui hanno già investito tanto lavoro, e quando i livelli di proteine sono estremamente bassi cannibalizzano le larve di età intermedia per riuscire a produrre coi loro corpi pappa reale.

Un'altra strategia è di opercolare le larve prematuramente, ma questo darà poi origine a delle api di basso peso corporeo. La conseguenza della malnutrizione è, quindi, costituita da api sottosviluppate, con basso livello proteico e minore aspettativa di vita. La indisponibilità di polline e di nettare è responsabile anche del mancato stoccaggio da parte delle api di polline sottoforma di pane d'api e di miele nel nido e quindi contribuisce alla mancata alimentazione delle api nutrici e alla diminuzione della cura della covata.

Si viene a creare perciò una situazione in cui le api allevano piccole quantità di covata utilizzando scorte di polline costituite all'interno del nido nei mesi precedenti ed ovviamente limitate nella quantità. La scarsità di polline diventa quindi il fattore limitante lo sviluppo delle famiglie.



Fig. 9 - Ape bottinatrice in un contesto urbano (fonte: [www.ilmielebuono.it](http://www.ilmielebuono.it))

Altri fattori che incidono sulla salute degli impollinatori sono correlati **all'azione di agenti patogeni**:

- L'infestazione da *Varroa*: l'acaro *Varroa destructor*, è una grave minaccia per l'apicoltura a livello globale (Anderson e Trueman, 2000). Il genere *Varroa* comprende 4 ectoparassiti obbligati: *V. jacobsoni* Oudemans, *V. underwoodi*, *V. rinderei* e *V. destructor*. Si preferisce distinguere i danni inferti direttamente da *V. destructor* al suo ospite da quelli provocati dall'acaro ma non causati direttamente. Questa distinzione non è sempre chiara. In molti casi, infatti, risulta impossibile distinguere quali fra gli effetti negativi conseguenti all'azione della *Varroa* dipendano dall'attività trofica dell'acaro (danni diretti) e quali, invece indirettamente dalla replicazione dei virus che l'acaro attiva. Gli acari creano danni alla covata succhiando l'emolinfa, questo comporta l'indebolimento, diminuzione del peso, deformità e riduzione della durata della vita. La riduzione di peso, probabilmente, dipende dal numero di acari-madre e dal numero della prole (De Jong et al., 1982). Le api che vengono parassitate durante il loro sviluppo passano precocemente da nutrici a foraggiere (Amdam et al., 2004); (De Jong et al., 1982). Le bottinatrici parassitate evidenziano, inoltre, una riduzione dell'apprendimento ed un minore capacità di ritornare all'alveare (Kralj e Fuchs, 2006). Gli acari della *Varroa* provocano, inoltre, una

riduzione della risposta immunitaria delle api e lo sviluppo di infezioni virali (Gregory et al., 2005). Sono anche vettori attivi nella trasmissione di virus e batteri (Yang e Cox-Foster, 2007).

- I funghi, come la *Nosema apis* e *Nosema cerana*, hanno dato prova di essere altamente dannosi per le colonie di api in alcuni Paesi dell'Europa meridionale. Questo microsporide attacca la parete dell'intestino delle api adulte. La malattia può svilupparsi senza sintomi visibili o manifestarsi come un indebolimento della colonia, che può concludersi con la morte. L'agente infettivo è la spora, l'ape si infetta per via orale. La spora, una volta ingerita, arriva nel mesointestino dove a contatto con i succhi gastrici germina. L'accumulo nella spora di una forte pressione causa l'estroffessione dell'organo di attacco, il "filamento polare" che permette alla forma vegetativa di penetrare nelle cellule intestinali dell'ospite e di moltiplicarsi. Risultano infette con maggiore frequenza le api operaie, forse a causa dell'attività di pulizia dei favi e all'attività di *grooming* a cui sono addette (Bailey L., 1972). Le api infette hanno una longevità ridotta ed una funzionalità compromessa delle ghiandole ipofaringee che riducono la produzione di enzimi proteolitici, compromettendo la capacità di digerire le sostanze nutritive e soprattutto quelle proteiche.

Anche **gli agrofarmaci** sono agenti di stress che contribuiscono al declino della competenza immunitaria. L'utilizzo di insetticidi in agricoltura è oggetto di numerose ricerche, poiché il loro utilizzo implica un aumento della morte delle api a causa della loro elevata tossicità. I neonicotinoidi esplicano la loro funzione agendo come antagonisti dei recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChR) determinando una sovrastimolazione dei recettori nicotinici in modo irreversibile. Questi insetticidi interferiscono con la trasmissione neuronale negli insetti, evidenziando che il gruppo nitro (-NO<sub>2</sub>) e ciano (-CN) contribuiscono a rendere selettivi i recettori dell'acetilcolina degli insetti (Decourtye e Devillers, 2010).

A seconda del principio attivo possiamo distinguere l'avvelenamento acuto che determina la morte dell'ape, e l'avvelenamento cronico che comporta alterazioni comportamentali ad esempio anomalie nell'attività di foraggiamento, riduzione della memoria olfattiva e delle performance nell'apprendimento, disorientamento e ridotta

comunicazione (Henry et al., 2012). Le bottinatrici, e in modo indiretto tutta la colonia, possono essere esposte ai neonicotinoidi, così come alle altre sostanze xenobiotiche, in differenti modi, come ad esempio per contatto diretto con l'insetticida, per contatto con piante che presentano residui o ancora per esposizione a nettare e polline contaminato (Krupke et al., 2012). Nell'avvelenamento da ingestione si distinguono una tossicità diretta ed una indiretta. La prima si verifica quando la molecola tossica avvelena direttamente il cibo, uccidendo le api bottinatrici, mentre la seconda è causata dall'aumento di concentrazione di sostanze sub-letali, che accumulandosi all'interno delle arnie, raggiungono livelli tali da causare il lento, ma costante declino dell'intero alveare.

L'esposizione ai neonicotinoidi influenza negativamente, inoltre, la risposta immunitaria dell'ape e questo sembra riflettersi in una maggiore suscettibilità dell'insetto agli agenti patogeni. È stato dimostrato, infatti, che dosi sub-letali di insetticidi, quali il fipronil o il thiacloprid, determinano un significativo aumento della mortalità delle giovani api operaie precedentemente infettate da *N. ceranae* (Vidau et al., 2011).

Infine tra i fattori che incidono sulla salute degli impollinatori ci sono i **cambiamenti climatici**. Il periodo di tempo dal 1995 fino al 2006 è stato indicato dall'Intergovernmental Panel On Climate Change (IPCC) come il periodo mediamente più caldo mai registrato da quando si hanno misure globali sufficientemente attendibili (IPCC - Quarto rapporto di valutazione - WP1). Si stima 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.

Dopo l'uso massiccio dei pesticidi, i cambiamenti climatici rappresentano una delle maggiori minacce per gli impollinatori. Molto probabilmente questi influenzano l'interazione tra gli impollinatori e le loro fonti di cibo, vale a dire le piante da fiore, modificando le date di fioritura. Recenti analisi indicano che tra il 17 e il 50% delle specie di impollinatori soffrirà di carenze alimentari, che causeranno variazioni nei modelli di fioritura delle piante (Fig. 10).

Il risultato atteso di questi effetti è la potenziale estinzione sia di alcuni impollinatori che di alcune piante, e quindi l'interruzione delle loro interazioni fondamentali (Memmott et al., 2007).

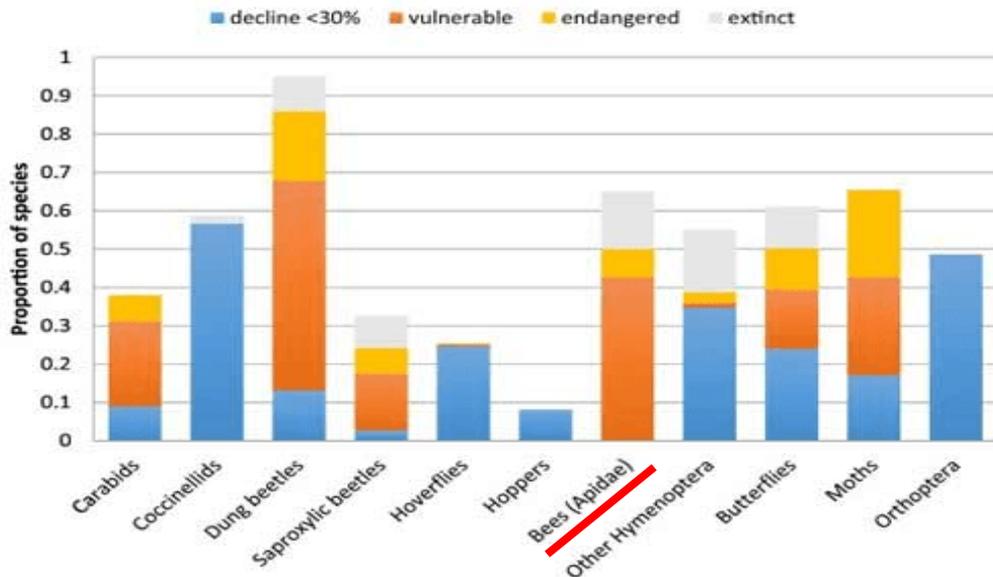


Fig. 10 - Declino di alcune delle specie di impollinatori (fonte: [www.regioneambiente.it](http://www.regioneambiente.it))

Un primo segnale di sofferenza arriva dalla produzione di miele. Secondo i dati forniti dagli apicoltori italiani dell'Unaapi 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.

I cambiamenti climatici possono influire sulle api mellifere a diversi livelli:

- influenza diretta sul comportamento e sulla fisiologia;
- alterazione della qualità dell'ambiente floreale;
- aumento o riduzione dello sviluppo e della capacità di raccolta delle colonie (Le Conte e Navajas, 2008).
- allevamento della covata. La temperatura è uno dei parametri fisiologici più precisamente controllati in una colonia. Le api adulte mantengono infatti la temperatura della covata intorno ai 34-35 ° C (Himmer, 1927; Seeley e

Heinrich, 1981). A tal fine la temperatura esterna alta o bassa è contrastata da comportamenti di termoregolazione (Kronenberg e Heller, 1982; Jones et al., 2004). Tuttavia, in particolari situazioni, la covata può essere soggetta a condizioni di temperatura non ottimale. Diversi studi (Tautz et al., 2003; Becher et al., 2009) hanno dimostrato che la temperatura non ottimale della covata ha riportato effetti negativi sulle api adulte tra cui difetti dell'apprendimento a breve termine, riduzione della capacità di memoria e orientamento. In particolare, le api allevate a basse temperature hanno mostrato prestazioni di danza ridotte e ridotta estensione della proboscide. McMullan e Brown (2005) hanno dimostrato, inoltre, che le api appena emerse da covata allevate a temperatura più bassa (30 ° C) sono più suscettibili all'infestazione da acari tracheali rispetto a quelle emerse da covata allevata a temperatura normale.

Il clima non è quindi da sottovalutare in quanto un suo andamento irregolare può anche andare ad interrompere quello che è il normale flusso di nutrienti che sono necessari alle api per la loro crescita e sviluppo.

Questo inoltre influenza lo sviluppo dei fiori e la produzione di nettare e polline, che sono direttamente collegati all'attività di foraggiamento e sviluppo delle colonie (Winston, 1987). Le api devono creare sufficienti depositi di miele per poter sopravvivere all'inverno. Un importante effetto del cambiamento climatico sulle api deriva dai cambiamenti nella distribuzione delle specie di fiori (Thuiller et al., 2005) da cui le api dipendono per il cibo. Una carenza di polline indotta dalla siccità autunnale sarà responsabile di indebolire il sistema immunitario delle api e di renderle più suscettibili agli agenti patogeni e ridurre quindi la durata della loro vita (Mattila e Otis, 2006).

L'influenza sulla salute delle api è dovuta anche alla:

- perdita dell'habitat: le temperature elevate spingono infatti le api a migrare verso latitudini più fresche e stabilirvi lì nuovi alveari, ma faticano ad adattarsi alle condizioni imposte dai nuovi habitat;
- variazione delle stagioni: 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. Secondo i ricercatori dell'Università di Milano l'inverno più corto e più caldo determinerebbe uno stress aggiuntivo per le api e comprometterebbe la loro salute. Lo stesso sincronismo tra la fase della fioritura e la ripresa delle attività di volo delle api dopo l'inverno potrebbe aver subito importanti sfasature;
- malattie: *il global warming* facilita la diffusione dei parassiti che attaccano le api, come l'acaro *Varroa Destructor* o il fungo *Nosema ceranae*. I cambiamenti climatici potrebbero anche modificare le interazioni con diversi agenti patogeni. L'acaro *Tropilaelaps* non infesta ancora *l'Apis mellifera* perché il ciclo di sviluppo di questa comprende un periodo senza covata, dal quale l'acaro dipende totalmente per la sua sopravvivenza (Sammataro et al., 2000). Tuttavia, se i cambiamenti climatici inducono inverni più caldi, *Apis mellifera* dovrebbe adattarsi a un ciclo continuo di nidiate, che lo renderebbe un potenziale ospite per *Tropilaelaps*.

#### **1.4 Alimentazione delle api**

Le api richiedono ingredienti essenziali per la sopravvivenza e la riproduzione, in particolar modo hanno bisogno di carboidrati, amminoacidi, lipidi, vitamine, minerali ed acqua. Queste sostanze nutritive devono essere presenti nel giusto rapporto affinché le api possano sopravvivere e prosperare. La quantità e la qualità di cibo varia a seconda della casta e dello stadio di sviluppo. Le regine adulte sono alimentate dalle api nutrici, mentre le operaie e i fuchi hanno bisogno di provvedere al proprio nutrimento. Al contrario, tutte le larve vengono alimentate, quando necessario, dalle api operaie.

Le regine sono nutrite per quasi tutto lo stadio larvale con la pappa reale, secreta per il 60-80% dalla ghiandola ipofaringea e circa il 20-40% da quella mandibolare, invece le larve delle api operaie ricevono tale alimento solo nei primi giorni di vita (Sammataro e Avitabile, 1998). Come altri animali, le api sfruttano i carboidrati come fonte di energia o possono essere convertiti in grassi corporei e quindi immagazzinati.

Un'ape operaia ha bisogno di 11 mg di zucchero secco ogni giorno (Hwang et al, 1998). In generale lo sviluppo da larva ad ape operaia richiede circa 59,4 mg di carboidrati (Rortais et al., 2005). La principale fonte di carboidrati è il nettare che presenta una concentrazione di zucchero che può variare tra il 25% e il 40%. Questo viene raccolto dalle api bottinatrici, trasportato all'alveare e infine immagazzinato come miele nelle celle opercolate. La trasformazione da nettare a miele è graduale e comincia già durante il volo di ritorno (Nicolson e Human, 2008). Nella colonia il contenuto di acqua è ridotto al 16-20% e vengono aggiunti enzimi, quali invertasi, diastasi e glucosio ossidasi, che spiegano la composizione di carboidrati del miele: in media 38% di fruttosio, 31% di glucosio e piccole percentuali di altri trisaccaridi (Doner, 1977).

Le api hanno inoltre bisogno di notevoli quantitativi di acqua per reintegrare i liquidi corporei, confezionare il cibo per le giovani larve e regolare la temperatura interna dell'alveare. La ricerca dell'acqua è affidata alle api acquaiole che scovano le fonti idriche nei fiumi, nelle pozzanghere e dalla rugiada sull'erba (Fig. 11). L'acqua importata non è stipata nelle cellette ma viene subito utilizzata.



**Fig. 11 - Ape che beve da una foglia (fonte: [www.fotoapi.com](http://www.fotoapi.com))**

Per quanto riguarda le vitamine si pensa che le api nutrici abbiano bisogno di uno specifico complesso vitaminico B per l'allevamento della covata. Queste insieme ai minerali, ai lipidi e alle proteine vengono fornite alle api attraverso il polline.

Per quanto riguarda, infine, gli aminoacidi, quelli fondamentali per la salute delle api sono essenzialmente dieci: metionina, triptofano, arginina, lisina, istidina, fenilalanina, isoleucina, treonina, leucina e valina (De Groot, 1953), ed eventuali carenze di questi possono limitare lo sviluppo, la produttività e il mantenimento della colonia (Brodschneider e Crailsheim, 2010).

#### 1.4.1 Importanza del polline sulla salute delle api

Le api, attraverso il cibo, devono assumere le sostanze nutritive essenziali alla loro vita ed il polline, al pari del nettare, riveste un ruolo fondamentale nella loro nutrizione.

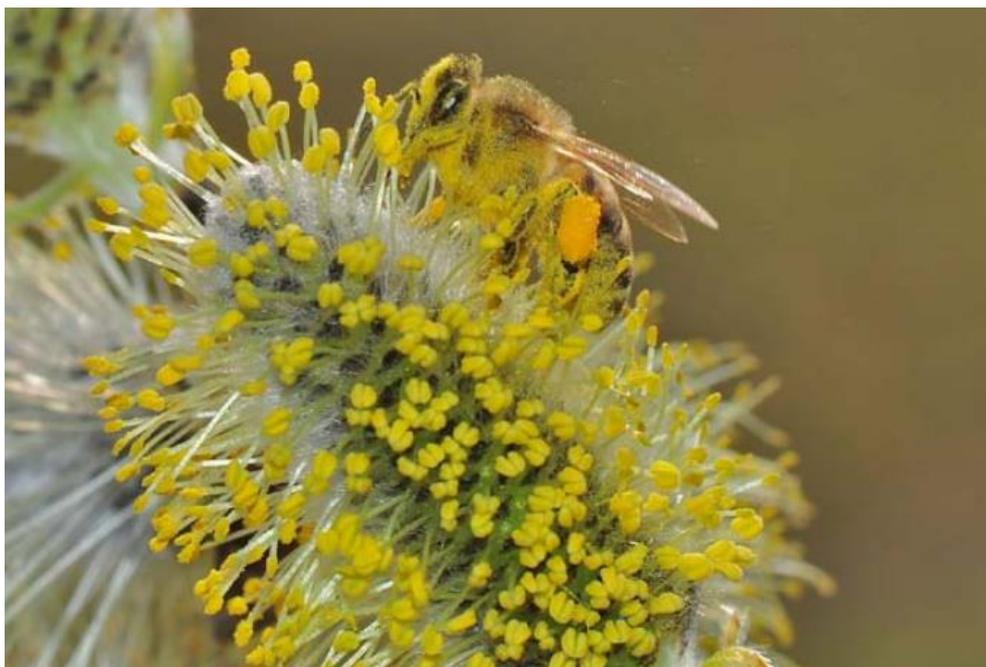
Il polline rappresenta l'unica fonte di proteine alimentari per le api e contiene gli aminoacidi essenziali per il loro sviluppo. Esso è in grado di influenzare la longevità, lo sviluppo delle ghiandole ipofaringee, delle ovaie (Pernal e Currie, 2000) e la suscettibilità agli agenti patogeni (Rinderer e Elliott, 1977). Quando le api non hanno polline in quantità sufficiente o il polline ha un basso valore nutrizionale, l'allevamento

della covata diminuisce e le operaie hanno una durata di vita inferiore. Questi effetti nel tempo possono compromettere la produttività della colonia. La carenza di polline durante le stagioni piovose può causare lo spopolamento della colonia fino al suo declino. Le colonie raccolgono dai 10 ai 26 kg di polline all'anno (Wille et al., 1985) (Fig. 12). A differenza del miele, solo una piccola quantità di polline viene immagazzinato nella colonia per lunghi tempi e le scorte diminuiscono rapidamente durante i periodi di non foraggiamento (Schmickl e Crailsheim, 2002).

Nella colonia le api mescolano il polline con il nettare rigurgitato, il miele e le secrezioni ghiandolari per produrre il cosiddetto pane delle 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). La concentrazione di lipidi contenuta dal polline varia da circa 0 a più del 20% (gli acidi grassi predominanti sono linoleico, palmitico e linolenico). Una ampia varietà di steroli è rinvenibile, compresi colesterolo e 24-metilene-colesterolo. Le api hanno esigenze specifiche e ben definite per ciò che riguarda gli steroli e gli acidi linoleico e linolenico (sono necessari almeno 1.6 mg/g di polline di linoleico e 5.5 mg/g di polline di linolenico).

La necessità di steroli può essere considerata dello 0.1% (sia colesterolo che 24-metilene colesterolo) del cibo assunto. Diverse vitamine risultano essenziali per le api, e cioè: biotina, colina, acido folico, inositolo, niacina, acido pantotenico, piridoxina, riboflavina, tiamina, vitamina B12, vitamina A, vitamina K, acido ascorbico. Il polline è ricco di vitamine solubili ma spesso contiene basse concentrazioni di vitamine liposolubili. Può contenere un'ampia varietà di vitamine ma alcune (niacina, acido folico e ascorbico, piridoxina) non sono stabili e si deteriorano nel tempo. I carboidrati, invece, presenti nel polline sono in modo predominante materiali fibrosi con contenuto di cellulosa dall' 1.2 al 15%. Il contenuto di amidi va dal 2 al 3%. Presenta inoltre zuccheri (circa 0.5%), minerali dall' 1 a 6.5% (macro e micro-elementi).

Il Potassio è il minerale più abbondante.



**Fig. 12 - Ape bottinatrice intenta a raccogliere polline (fonte: [www.fotoapi.com](http://www.fotoapi.com))**

Le api operaie iniziano a nutrirsi con rilevanti quantità di polline tra le 42 e le 52 ore dalla nascita. Il contenuto di polline è massimo nell'alimentazione delle api operaie tra l'ottavo e il nono giorno di vita per poi decrescere fino a livelli molto bassi in individui che hanno raggiunto il ventesimo giorno (Keller et al, 2005). Una larva operaia consuma, partendo dalla pappa reale di cui si nutre, tra i 68 e i 73 mg di polline, mentre un'ape operaia adulta consuma mediamente tra i 3,4 e i 4,3 mg di polline al giorno e nella sua intera vita richiede tra i 160 e i 180 mg di polline (Keller et al, 2005).

Una colonia di medie dimensioni raccoglie circa 30 kg di polline l'anno (Tautz, 2009). Dentro l'alveare il polline viene conservato, compresso nelle cellette, in prossimità della covata ricoperto da un leggero strato di miele per evitare l'ammuffimento dovuto al contatto con l'aria (Pistoia, 2010). La raccolta del polline è affidata alle api bottinatrici specializzate e si svolge in fasi distinte che determinano la formazione di pallottole agglomerate con nettare o miele.

Per raccogliere il polline le api "mordono" con le mandibole le antere dei fiori, umettano i granuli pollinici con nettare e saliva, e formano delle sferette che sistemano in apposite strutture dette cestelle o curbicole che sono presenti nelle zampe posteriori. Anche il polline che inevitabilmente aderisce ai peli del corpo dopo la visita al fiore viene dall'ape spazzolato e trasferito nelle cestelle (Pinzauti e Frediani, 2005) (fig. 12).

Questo viene poi affidato alle api addette al ricevimento che lo trasformano in miele stoccandolo poi nei favi. Le api bottinatrici mostrano preferenza per particolari tipi di polline; tale predilezione è dovuta all'aspetto qualitativo del polline oppure ad altri fattori quali segnali olfattivi o visivi provenienti da esso.

Le api in genere preferiscono il polline ricco di proteine (Schmidt e Johnson, 1984). La composizione del polline non è mai costante per qualsiasi tipo di pianta, ma varia da una zona all'altra e da un anno all'altro in conseguenza ad esempio dell'umidità del suolo, della fertilità del terreno e della temperatura. Il valore nutrizionale del polline varia ampiamente a seconda anche della varietà florale. La qualità può essere misurata in due modi: secondo i livelli di proteina grezza (Roulston et al. 2000, Hanley et al. 2008), o secondo la composizione degli aminoacidi.

È stato osservato che gli aminoacidi essenziali per le api sono 10, cioè le api non possono sintetizzarli o convertire altri aminoacidi, e devono quindi ottenerli direttamente dal cibo o come aminoacidi liberi o digerendoli da altre proteine.

Se i dieci aminoacidi non seguono determinati rapporti tra di loro, le api non possono utilizzare pienamente ciò che è disponibile nel polline.

Le api, però, raccolgono anche i pollini con diverso contenuto proteico e non solo quelli particolarmente ricchi di proteine (Andrada et al, 2005); è possibile quindi che le api non siano in grado di valutare il valore nutrizionale del polline in quanto non lo consumano direttamente, ma lo trasportano all'alveare nelle loro cestelle (Keller et al, 2005). Ciò significa che la colonia regola la quantità di polline raccolto piuttosto che la sua qualità al fine di garantire scorte idonee per la sopravvivenza.

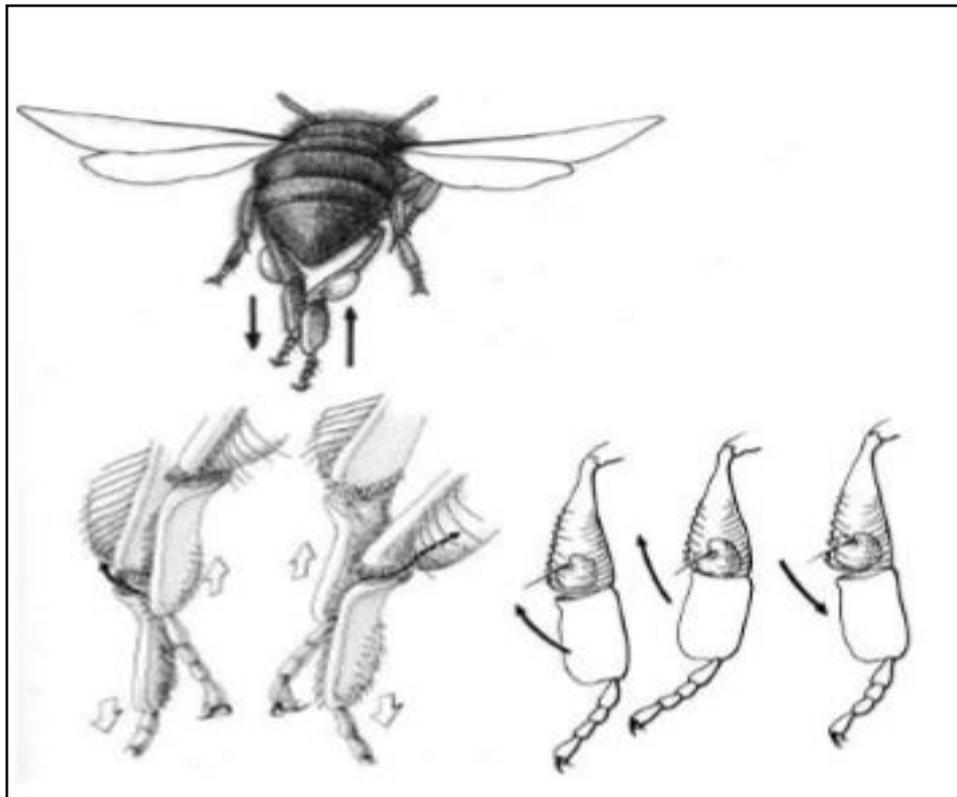


Fig. 12 - Fasi e modalità di accumulo del polline nelle cestelle (fonte: Frilli et al., 2001).

In generale le api una volta scelto di visitare la fioritura di una determinata specie botanica continuano a bottinarla finché il polline di questa non è esaurito o finché non compaiono altre specie maggiormente appetibili.

Il polline può essere classificato come di scarsa qualità alimentare per le api quando il contenuto di proteine risulta inferiore al 20% (Kleinschmidt and Kondos, 1976). Quello contenente proteine da 20 a 25% può essere considerato invece di media qualità. Purtroppo negli ultimi anni lo sviluppo crescente dell'agricoltura monofloresale e quindi di un'alimentazione proteica derivante principalmente da un solo tipo di polline così come la indisponibilità o la scarsa disponibilità di polline ha influenzato notevolmente la salute delle api, in particolare quella dell'ape nutrice e la tolleranza di questa ad alcuni agenti patogeni ad esempio al parassita *Nosema ceranae* (Le Conte, 2013).

La disponibilità del polline è influenzata prevalentemente dalle condizioni climatiche. Nel corso dell'anno, infatti, la curva di raccolta del polline segue l'andamento della deposizione della regina che è più intensa in primavera, portando la famiglia al massimo accrescimento, mentre rallenta in estate, giungendo addirittura a

sospendersi per riprendere entro certi limiti in autunno. Con i recenti cambiamenti climatici tale curva ha subito delle variazioni dovute ai diversi periodi di fioritura non in accordo con il ciclo biologico delle api. È stata inoltre dimostrata in numerosi organismi che la funzione immunitaria è influenzata dalla restrizione calorica (Cotter et al., 2011; Franca et al., 2009). Le proteine alimentari, derivate dal polline, forniscono aminoacidi essenziali necessari per la sintesi di peptidi che intervengono nella difesa immunitaria (Grimble, 2001; Schmid-Hempel, 2005). I carboidrati, derivate da nettare e miele, forniscono energia ai processi metabolici associati alle reazioni immunitarie umorali e cellulari innate e possono fornire metaboliti vegetali secondari che hanno proprietà antimicrobiche (Erler et al., 2014).

Tale relazione tra alimentazione e immunità è però compromessa quando le api sono parassitate da *Varroa*. Le operaie che sono parassitate durante lo sviluppo sfarfallano con livelli proteici più bassi di quelle non parassitate e tali livelli non possono essere aumentati anche se è disponibile polline in quantità sufficiente (van Dooremalen et al., 2013). Le pupe infestate da *Varroa* possono anche avere un contenuto proteico significativamente più basso, livelli elevati di aminoacidi liberi e peso inferiore rispetto alle pupe non infestate che suggeriscono che la sintesi proteica e, in definitiva, la crescita, sono inibite da *Varroa* (Aronstein et al., 2012). Il polline influenza l'espressione di geni che regolano la longevità, la funzione immunitaria, la produzione di alcuni AMP e la disintossicazione da pesticidi (Schmehl et al., 2014).

Tuttavia, se le api sono parassitate da *Varroa*, si verifica una diminuzione del metabolismo proteico, l'inibizione di alcuni geni dell'immunità e un aumento dei livelli di virus che non possono essere invertiti dall'alimentazione del polline.

### **1.5 Vitellogenina e salute delle api.**

Dallo sfarfallamento in poi, il passaggio dai compiti interni all'alveare all'attività di bottinamento è il cambiamento maggiore che avviene nel corso della vita di un'ape.

Questo cambiamento sembra essere collegato al silenziamento di geni deputati alla produzione della proteina vitellogenina (Santos 1995) che insieme alla proteina arilforina costituisce la coppia di principali proteine di stoccaggio nelle api. La vitellogenina è una glicolipoproteina, composta come dice il nome da zuccheri (2%), grassi (7%) e proteine semplici (91%), di estrema importanza per molte specie. È una proteina 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 stato 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. Nelle api, questa proteina non risulta necessaria solo per la sintesi della pappa reale, ma anche e soprattutto per la produzione di componenti del sistema immunitario ed ha inoltre una notevole funzione antiossidante in quanto inibisce i radicali liberi. È in gran parte responsabile del consistente allungamento della vita delle api invernali ed in parte della maggiore aspettativa di vita della regina. Anon (2007) ha verificato come sia diminuita o quasi del tutto assente nel corpo delle bottinatrici e che un'ape non diviene bottinatrice fino a che ha a disposizione questa proteina.

L'accumulo di vitellogenina nelle api è dunque uno degli elementi che maggiormente ne determinano la longevità, o al contrario, la sua carenza ne determina un invecchiamento precoce. È risaputo che le api invernali, vivono notoriamente più a lungo delle api estive perché non sono impegnate nell'allevamento della covata.

Perché questo avvenga, tuttavia, è necessario che queste abbiano una grande quantità di vitellogenina e che quindi non si siano attivati processi di invecchiamento precoce.

Nell'emolinfia delle api invernali si sono riscontrati livelli elevati di vitellogenina (dal 30 al 50%) e grazie all'immagazzinamento di questa proteina le api possono sopravvivere in inverno cibandosi di soli zuccheri (carboidrati). Pertanto per avere un'ottima deposizione autunnale, ma anche api con il massimo dell'aspettativa di vita possibile, è necessaria un'abbondante disponibilità di proteine (polline) nei mesi autunnali, unita ovviamente ad una bassa presenza di *Varroa*, virus e *Nosema*. La disponibilità di polline, sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo, ha una vasta ed importante serie di effetti a catena, e condiziona la qualità delle operaie. Sappiamo da diverse ricerche che la longevità delle api nutrici è inversamente proporzionale alla quantità di covata presente ed è regolata dalla quantità di lavoro svolto dalla nutrice (Maurizio 1950; Amdam et Omholt 2002). In carenza di polline le nutrici presentano un'atrofia delle ghiandole ipofaringee, ridotta attività di nutrizione delle larve e precoce attività di bottinamento (Free 1961; Wang et Moeller 1970 citati da Crailsheim).

Quindi la conseguenza della malnutrizione è costituita da api sottosviluppate, con basso livello proteico e minore aspettativa di vita. Si deduce da questo che vi è una precisa e forte relazione tra disponibilità di polline, longevità e salute (intesa come quantità di proteine disponibili per costituire la base delle difese immunitarie).

L'effetto della dieta sulla longevità delle api ha un peso enorme, che può variare da 4 a 41 giorni a seconda del tipo di alimentazione offerta. Secondo alcuni ricercatori (Schmidt et al. 1987) la longevità delle api è aumentata quando l'assunzione di proteine da polline è in quantità maggiori di almeno 0,7 mg/ape/giorno (Schmidt et al. 1987).

La disponibilità di polline condiziona fortemente lo sviluppo delle ghiandole ipofaringee, ghiandole deputate alla produzione della pappa reale. Rosca e Rusu, (1972) hanno dimostrato che le api alimentate senza polline presentavano una diminuzione del contenuto di vitellogenina nelle ghiandole ipofaringee e che tale contenuto veniva rimpiazzato dal contenuto di proteine presenti nel torace e il contenuto di questo veniva rimpiazzato a sua volta da quello dell'addome (corpo grasso del torace e dell'addome). Ciò sembra indicare che all'interno del corpo dell'ape avvenga un arrangiamento o trasferimento di proteine a seconda delle necessità. Da ciò si deduce che non solo la quantità di pappa reale prodotta ma anche la qualità dipende dalla disponibilità nelle nutrici di vitellogenina. È risaputo che in

assenza di vitellogenina le ghiandole ipofaringee vanno incontro ad atrofia e quindi le nutrici non saranno in grado di alimentare la covata e invecchieranno precocemente passando da nutrici a bottinatrici.

Dal momento che la nutrizione pollinica promuove lo sviluppo di corpi grassi, che sono la fabbrica in cui viene prodotta la vitellogenina, ci si può aspettare ragionevolmente un aumento di questa in api alimentate a polline, come conseguenza una maggiore longevità delle api e delle nutrici più efficienti. Page (2001) ha inoltre dimostrato che api selezionate particolarmente abili nella raccolta di polline erano caratterizzate da un alto livello di vitellogenina e successivamente insieme ad Amdam e Peng (2005) che la quantità di vitellogenina prodotta da un'ape nei primi quattro giorni di vita condiziona l'età in cui diventerà bottinatrice e se diventerà di preferenza bottinatrice di polline o nettare.

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).

## **1.6 Sistema immunitario**

Il sistema immunitario, per definizione, è la complessa rete di mediatori chimici e cellulari, di strutture e processi biologici, sviluppatasi nel corso dell'evoluzione per difendere l'organismo da qualsiasi forma di insulto, chimico, traumatico ed infettivo, alla sua integrità. Caratteristica fondamentale è quindi la capacità di distinguere tra sostanze endogene (così dette self) che generalmente non costituiscono un pericolo e strutture esogene (così dette no-self) che possono essere particolarmente nocive per

l'organismo. Negli insetti, sebbene con le dovute differenze, le cose funzionano non troppo diversamente dai vertebrati.

Nelle api non esiste un sistema umorale basato su anticorpi in grado di riconoscere e ricordare antigeni, ma esiste una risposta aspecifica cellulare e una risposta specifica umorale. La prima è coordinata dagli emociti in grado di riconoscere, fagocitare e neutralizzare corpi estranei; la seconda comporta la sintesi di proteine a partire dalle riserve di grasso presenti nel corpo dell'insetto. Gli insetti, e in particolare le api, mancano dell'immunità acquisita, hanno sviluppato un complesso ed efficiente sistema immunitario innato che comprende sia barriere fisiche che una complessa serie di reazioni di difesa cellulari e umorali, a cui si aggiungono risposte che coinvolgono l'intera colonia (immunità sociale).

L'insieme di tutti questi fattori determina la capacità dell'organismo di resistere alle malattie, capacità che può essere quantificata attraverso l'indice di Immuno-Competenza (Siva-Jothy et al., 2005; Wilson-Ritch et al., 2009). Inoltre, la suscettibilità a vari patogeni è strettamente correlata all'età dell'ape: le larve rispondono alle infezioni con una reazione umorale e riassumibile in tre particolari peptidi antimicrobici; le giovani adulte reagiscono con una reazione immunitaria di più ampio spettro con l'attivazione di almeno sette proteine (Randolt et al, 2008).

#### 1.6.1 Barriere fisiche

La prima linea di difesa nelle api è rappresentata dal tegumento (formato dall'interno verso l'esterno dalla membrana basale, l'epidermide, la cuticola e uno strato epicuticolare composto principalmente da cere, lipidi e peptidi derivanti dal veleno), e dagli strati epiteliali interni (rivestimento trachee e membrana peritrofica dell'intestino). Le trachee e l'intestino rappresentano potenziali vie di ingresso degli agenti patogeni nel corpo dell'insetto e perciò sono rivestiti da una matrice chitinosa che conferisce loro maggiore resistenza (Siva-Jothy et al., 2005).

La cuticola dell'esoscheletro, è una complessa struttura multifunzionale e, oltre a fungere da barriera all'ingresso dei patogeni, supporta l'insetto determinandone la forma, offre superficie di attacco per i muscoli, limita la perdita d'acqua ed è coinvolta

nella comunicazione chimica (Vincent e Wegst, 2004). È costituita da catene polisaccaridiche di chitina, imballate in una matrice di proteine e lipidi. Associati a questi ultimi vi sono gli idrocarburi cuticolari, presenti in abbondanza nell'epicuticola più esterna (Andersen et al., 1994). Questi vengono sintetizzati dagli enociti, dopodiché vengono trasportati attraverso l'emolinfa e raggiungono la superficie dell'insetto dove integrano lo sviluppo dello strato più esterno (Blomquist e Dillwith, 1985). Gli idrocarburi cuticolari sono escreti da molti insetti per riconoscere e identificare individui presenti nelle loro vicinanze (Blomquist e Bagnères, 2010) ed essendo specie-specifici e colonia-specifici è possibile riconoscere potenziali invasori.

Molti parassiti, tra cui la *Varroa*, però, hanno adottato strategie in grado di camuffare la loro presenza imitando l'odore, non attraverso la sintesi degli idrocarburi cuticolari ma attraverso un trasferimento passivo di questi dall'ape all'acaro (Kather et al., 2015). Gli idrocarburi cuticolari possono subire variazioni quantitative durante il passaggio da nutrici a bottinatrici e variazioni quantitative e qualitative anche in base allo stato fisiologico o in seguito a cambiamenti dell'ambiente (Howard e Blomquist, 2005; Blomquist e Bagnères, 2010). La ghiandola del veleno, nelle api così come in altri imenotteri aculeati, è stata recentemente indicata come la più importante fonte di sostanze antimicrobiche (Kuhn-Nentwig L. 2003).

L'applicazione di veleno sulla superficie del corpo come mezzo di protezione contro i patogeni è stata studiata nelle formiche, nelle vespe e in quattro specie di api da miele (Baracchi D., et al. 2010).

Il veleno di ape è composto da un ampio spettro di molecole, che spaziano da ammine biogene a peptidi e proteine la cui struttura e funzione sono stati in gran parte determinati. Melittina, apamina e MCD sono i principali composti della frazione peptidica del veleno e ci sono numerose riprove sperimentali che, sebbene l'apamina manchi di proprietà antisettiche, la melittina possiede una forte attività antimicrobica e antivirale. La presenza di peptidi del veleno sulla cuticola di almeno quattro specie di api può essere spiegato con la spalmatura del veleno sulla cuticola mediante l'auto-grooming. Oltre alla ghiandola del veleno anche ghiandole ipofaringee, mandibolari e salivari sono in grado di produrre sostanze chimiche battericide e fungicide.

### 1.6.2 L'immunità sociale

Il genoma degli insetti sociali presenta minor numero di geni impegnati nella risposta immunitaria rispetto agli insetti solitari. Ad esempio il genoma delle api contiene il 66% in meno di geni coinvolti nella risposta immunitaria innata rispetto ai Ditteri e circa il 10-20% in meno rispetto a *Nasonia* (Evans et al., 2006; Warren et al., 2010). Ciò è spiegato dal fatto che gli insetti sociali hanno un'immunità sociale e comportamentale (Evans e Spivak, 2010).

Un esempio di immunità sociale è l'attività di “*grooming*”, una sorta di pulitura mediante il quale le api adulte rimuovono dal proprio corpo (auto-*grooming*) o dal corpo delle altre (allo-*grooming*) particelle estranee e parassiti (Boecking e Spivak, 1999) (Fig. 13).

Il *grooming* è un'importante componente ereditaria della resistenza (Arechavaleta-Velasco e Guzman-Novoa, 2001), un fondamentale meccanismo di difesa adottato ad esempio da *A. cerana* contro la *Varroa* (Rath, 1999).

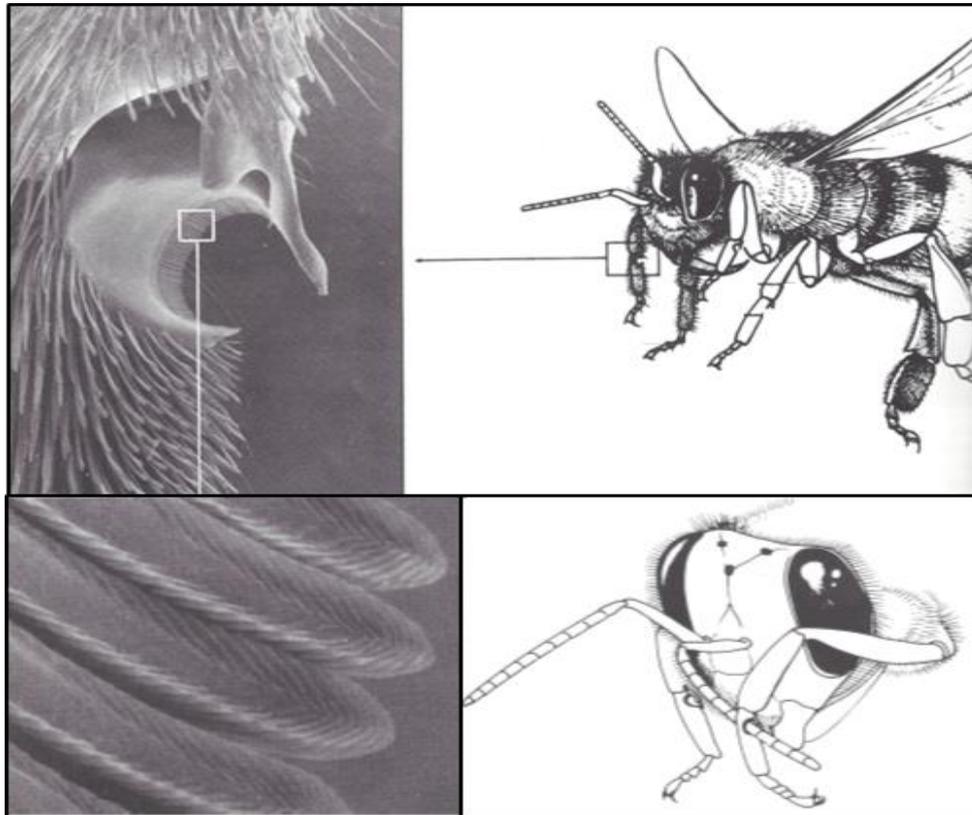


Fig. 13 - Rappresentazione dell'attività di *grooming* dell'ape (fonte: Frilli F., et al. 2001)

Un altro dei classici esempi di immunità sociale delle api è il “comportamento igienico” descritto da Rothenbuhler come la capacità delle api operaie di riconoscere ed allontanare dalla covata sana le larve malate o parassitate, evitando la diffusione della malattia (Rothenbuhler, 1964). Le api incaricate di rimuovere le larve infette sono solitamente le più anziane (15-18 giorni), riducendo così la probabilità di diffondere troppo rapidamente la malattia. Le bottinatrici infestate da *Varroa* o *Nosema*, inoltre, spesso muoiono lontano dall'arnia, tanto che le api infestate da covata a sacco o da *Nosema* tendono ad accorciare il periodo di permanenza nell'arnia e diventano bottinatrici precocemente (Evans et al., 2010). In aggiunta a questo le api hanno sviluppato meccanismi per mantenere costante l'ambiente all'interno del nido, riscaldandolo, raffreddandolo o ventilandolo a seconda delle necessità (Seeley e Visscher, 1985). Esse sono in grado di generare una sorta di “febbre dell'alveare” in risposta a un'infezione diffusa da patogeni termo-sensibili quali l'*Ascospaera apis* (Starks et al., 2000).

Ulteriore esempio di immunità sociale è l'utilizzo di sostanze quali le resine per la costruzione di celle per la covata rivestite di propoli che ha un'azione antimicrobica (Simone-Finmstrom e Spivak, 2010). Tutti questi comportamenti attuati dalle api porterebbero ad una minore esposizione ad agenti patogeni rispetto agli individui solitari e renderebbero superflui alcuni dei canonici *pathway* propri della risposta immunitaria innata (Harpur e Zeyed, 2013).

### 1.6.3 L'immunità cellulare

La risposta immunitaria cellulo-mediata coinvolge processi quali:

- fagocitosi: processo mediante il quale vengono internalizzate particelle con un diametro maggiore di 0,4  $\mu\text{m}$  (Haas, 2007). Prevede una cascata di eventi in successione, primo tra tutti il riconoscimento della particella da inglobare. Una volta avvenuto il riconoscimento, si assiste ad un rimodellamento del citoscheletro della cellula emocitaria e la particella bersaglio viene rapidamente circondata dagli pseudopodi e inglobata in una vescicola intracellulare, il fagosoma. Questa si fonde con i lisosomi formando un

fagolisosoma al cui interno si ha la distruzione della particella mediante l'azione degli enzimi lisosomiali, delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) (Siva-Jothy et al., 2005);

- incapsulamento: meccanismo di risposta cellulare, che le cellule emocitarie mettono in atto sia quando la cuticola è perforata da un corpo estraneo che per eliminare bersagli troppo grandi per essere fagocitati (Wilson et al., 2002). L'incapsulamento è costituito da una serie di fasi che coinvolgono in particolare i plasmotociti, che avvertono la presenza del corpo estraneo, e i lamellociti (Lavine e Strand, 2002; Ottaviani, 2005). Il parassita viene ucciso per produzione locale di radicali citotossici, quali ROS e RNS, o per asfissia (Nappi et al., 1995; Nappi e Ottaviani, 2000);
- formazione di noduli: molto simile alla reazione di incapsulamento in quanto, nel corso della formazione del nodulo, gli emociti si aggregano, circondando la particella estranea. I noduli, una volta formati, possono attaccarsi ai tessuti o essere a loro volta incapsulati (Vilmos e va Kurucz, 1998). La formazione di noduli, così come l'incapsulamento, è generalmente accompagnata da reazioni di melanizzazione (Soderhall e Cerenius, 1998).

Tali eventi sono mediati dall'azione delle "cellule del sangue", gli emociti (Gillespie et al., 1997). Nella maggior parte degli ordini di insetti, incluso *Lepidoptera*, *Diptera* e *Hymenoptera*, distinguiamo, oltre ai plasmotociti, i proemociti, i granulociti, gli sferulociti e gli enocitoidi (Lavine e Strand, 2002). Attraverso un confronto con i Ditteri, i Lepidotteri e altri membri appartenenti all'ordine degli Imenotteri, sono state evidenziate nell'emolinfa delle api cellule permeabilizzate, plasmotociti e particelle prive di nucleo, simili a microparticelle o protusioni delle membrane, (Marringa et al., 2014). Tali particelle sembrano comportarsi come una popolazione dinamica, con differenze non solo tra i membri di colonie differenti ma anche tra i singoli componenti di un alveare. Questo farebbe ipotizzare che sia un diverso stato fisiologico che l'azione di diversi stimoli, quali agenti patogeni o xenobionti, possano determinare cambiamenti a carico degli emociti presenti in circolo (Marringa et al., 2014).

Il numero di emociti cambia a seconda dello stadio di sviluppo delle api. È stato infatti osservato che le larve e le pupe, che crescono all'interno della cella e non possono adottare strategie comportamentali per difendersi dall'azione degli agenti

patogeni, presentano un maggior numero di emociti rispetto agli adulti (WilsonRich et al., 2008). Inoltre si assiste a un'ulteriore riduzione del numero di tali cellule nel passaggio da nutrici a bottinatrici, il che determinerebbe una riduzione nella capacità dell'insetto di difendersi attraverso una risposta immunitaria cellulo-mediata (Omholt e Amdam, 2004).

#### 1.6.4 L'immunità umorale

Come per l'immunità cellulare, i processi immunitari umorali dell'ape sono simili a quelli degli altri invertebrati non sociali. L'immunità umorale è determinata dalla componente antimicrobica non cellulare dell'emolinfa e la risposta immunitaria è indotta dalle ferite o dalla presenza di patogeni all'interno del corpo. Una stima indiretta dell'immunocompetenza umorale può essere effettuata mediante la quantificazione dei corpi grassi. Il grasso corporeo degli insetti è funzionalmente analogo al fegato dei vertebrati e produce molte delle proteine coinvolte nella difesa dagli agenti patogeni.

L'ape possiede quattro pathways molecolari principali e interconnessi tra di loro: Toll, IMD Jak/STAT, e JNK. Questi percorsi sono costituiti da proteine che riconoscono gli antigeni dei parassiti, proteine che modulano e amplificano il segnale di riconoscimento e proteine effettrici o metaboliti direttamente coinvolti con l'inibizione dei parassiti stessi. Le vie metaboliche attivate portano al rilascio di fattori che inducono la trascrizione di geni che codificano per peptidi antimicrobici o altri effettori, come quelli coinvolti nella melanizzazione.

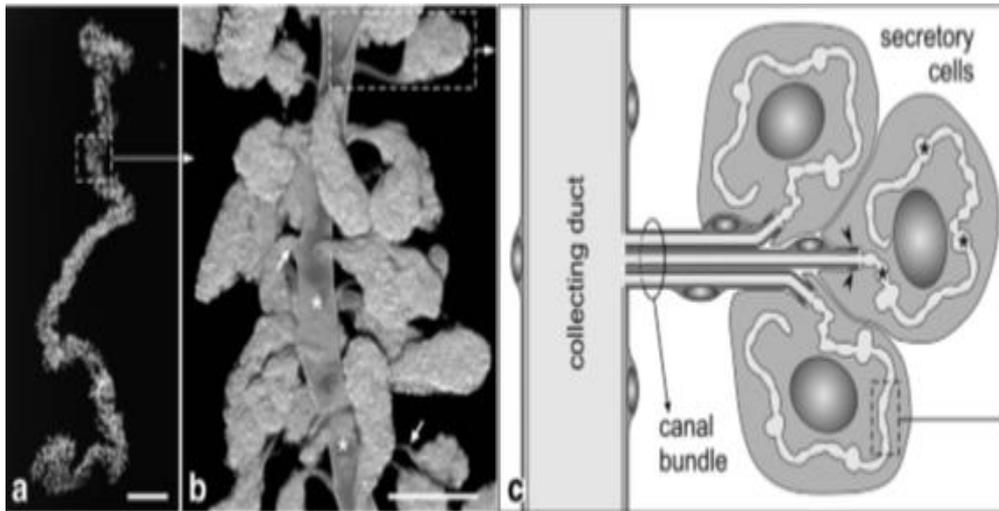
Nell'emolinfa dell'ape sono stati identificati almeno 4 peptidi antimicrobici (apidecina, abaecina, hymenoptaecina e defensina) che sono prodotti da emociti e corpi grassi in risposta al riconoscimento di varie classi di microbi. Alcune proteine antimicrobiche sono poco selettive nella loro attività e sono efficaci contro molti batteri. Al contrario, altre proteine presentano un'alta selettività mediata dalla specificità di legame con classi di molecole tipiche dei patogeni stessi come i peptidoglicani batterici o i residui di betaglucano dei funghi.

Il pathway della fenolossidasi (PO) è una componente centrale della risposta immunitaria nell'emolinfa degli insetti connessa con i pathways molecolari sopracitati. Sebbene la PO svolga un ruolo importante nell'immunocompetenza cellulare, essa può funzionare come proteina immunitaria umorale indipendente. La PO viene prodotta quando il suo precursore (proPO) è attivato in risposta a un qualsiasi stimolo prodotto da un patogeno. La PO agisce ossidando i derivati della tirosina per formare chinoni tossici (battericidi) che vengono poi polimerizzati in melanina (proteina che indurisce e si oscura intorno a un corpo estraneo permettendone l'isolamento dall'emolinfa).

### **1.7 Ghiandole ipofaringee e salute delle api**

Le ghiandole ipofaringee nelle api si sviluppano nei primi 7-10 giorni di vita e sono presenti in tutte le femmine, ma nelle regine sono di dimensioni ridotte e non funzionanti (Fig.14). Si deduce che nelle api operaie appena sfarfallate sono dunque inattive e il loro sviluppo è legato e dipende da quanto polline (proteine) queste riescono a consumare e quindi dalla disponibilità presente sia all'interno (sottoforma di pane d'api) che all'esterno dell'alveare. Le ghiandole ipofaringee nelle api sono organi pari, sono localizzate nella testa e precisamente sulla fronte tra gli occhi composti. I dotti si aprono nella porzione sub-orale dell'ipofaringe così che le sostanze prodotte sono rilasciate attraverso la bocca. Hanno una morfologia caratteristica. Ogni ghiandola è composta da circa 550 acini e ogni acino è costituito da 8-12 cellule connesse al dotto principale tramite piccoli dotti (Cruz-Landim, Costa, 1998; Kheyri et al., 2012).

Le cellule secernono i loro prodotti in un canalicolo, a fondo cieco che si snoda all'interno della cellula. L'estremità aperta del canalicolo è connessa con un dotto lungo e sottile rivestito da uno strato cuticolare che si apre nel dotto principale (Richter et al., 2016).



**Fig. 14 –Ape: ghiandola ipofaringea. (a) e (b): osservazione macroscopica; (c): rappresentazione schematica dell'organizzazione di un acino. (fonte: Klose, et al, 2017)**

All'esame microscopico le ghiandole di dimensioni variabile, sono costituite da un numero più o meno elevato di acini di forma irregolare e costituiti da cellule con nucleo piccolo, basofilo, generalmente appiattito, spesso spostato alla periferia. Il citoplasma ha un aspetto variabile da schiumoso e molto chiaro, in quanto le sostanze in esso contenute si sciolgono a causa della preparazione istologica, a granuloso e di colorito scuro.

Nel *Apis mellifera*, le ghiandole ipofaringee sono parte del sistema digestivo, e sono responsabili della produzione di pappa reale e della sintesi di enzimi (amilasi, glucosio ossidasi ecc..) importanti per la trasformazione del nettare in miele (Huang et al., 1989; Costa e Cruz-Landim 1999). L'attività delle ghiandole varia con l'età delle api e con la stagione (in presenza di covata o meno), ovvero le dimensioni degli acini che le compongono cambiano in funzione del lavoro che sono chiamate a svolgere (Liu et al. 2013). Nelle api nutrici, questa ghiandola è voluminosa, ha un'alta attività secretoria e contribuisce alla produzione della pappa reale, che viene utilizzata per alimentare le future regine per tutta la vita e le larve delle operaie e dei maschi per i primi 3 giorni. (von Planta, 1888). Nelle api bottinatrici, la ghiandola ha dimensioni nettamente inferiori, ha un'attività secretoria bassa e produce una diversa miscela proteica inclusi gli enzimi coinvolti nel metabolismo dei carboidrati (Deseyn, Billen, 2005; Ueno et al., 2015).

Lo sviluppo delle ghiandole ipofaringee nelle api operaie può variare significativamente in quanto influenzato da numerosi fattori sia interni che esterni alla colonia (Huang et al., 1989). Per esempio, nelle api infestate da *Varroa* si può avere una significativa riduzione del diametro degli acini ghiandolari (Yousef et al., 2014).

La diminuzione della dimensione delle ghiandole ipofaringee nelle api parassitate durante la loro fase di sviluppo può ridurre la loro capacità di produrre pappa reale e causare uno sviluppo anomalo delle larve oltre ad una diminuzione dell'aspettativa di vita dell'ape (Wegener et al., 2009). Una diminuzione della disponibilità e del contenuto proteico del polline raccolto dalle api può comportare lo sviluppo di ghiandole ipofaringee più piccole (DeGrandi-Hoffman et al. 2010; Di Pasquale et al. 2013), minore covata (DeGrandi-Hoffman et al. 2008; Herbert et al. 1977), e longevità più breve (Di Pasquale et al. 2013). Le api alimentate con polline di bassa qualità presentano ghiandole di dimensioni ridotte rispetto alle api alimentate con polline di alta qualità (Renzi et al., 2016). La dimensione ridotta delle ghiandole ipofaringee sembra essere responsabile anche dell'ulteriore riduzione in queste api delle dimensioni del corpo grasso. Il contenuto proteico della testa sembra venire probabilmente preservato a scapito di quello dell'addome.

Tra i fattori esterni rilevante importanza è data ai pesticidi. Diversi studi sull'azione dei pesticidi neonicotinoidi e acaricidi, che vengono utilizzati nelle colture e negli alveari, hanno verificato che questi riducono le dimensioni degli acini ghiandolari a causa della morte cellulare in queste strutture (Alaux et al., 2010; Hatjina et al., 2013).

Inoltre, l'alimentazione delle api esposte al fipronil e alla piraclostrobina, da sole o in combinazione, entro un periodo di sei giorni ha presentato alterazioni delle ghiandole mandibolari e ipofaringee (Zaluski et al., 2017).

## CAPITOLO II

### 2.1 Scopo della tesi

L'anno 2019 è risultato essere l'anno peggiore per la produzione di miele in Italia ma anche l'anno dei fenomeni di spopolamento, sciamatura ed elevata mortalità riscontrati e la causa sembra sia da imputare ai cambiamenti ambientali in generale e alle variazioni climatiche verificatisi durante tutto l'anno (alternanza di periodi di siccità a periodi di piogge intense, caldo torrido a freddo intenso e nevicate) in particolare. Le variazioni climatiche sembrano essere state responsabili della indisponibilità o della scarsa disponibilità di cibo (nettare e polline) e anche della mancata variabilità di polline (polline monofloresale e spesso di scarsa qualità). È noto che nella ape adulta la dimensione delle ghiandole ipofaringee diminuisce quando l'ape passa dallo stadio di nutrice a quello di bottinatrice e quando c'è una carenza di alimentazione proteica (polline). Entrambe queste condizioni si riflettono negativamente sulla crescita (sviluppo normale), sullo stato immunitario e sulla durata della vita di ogni singola ape e dell'intero alveare. Le dimensioni delle ghiandole ipofaringee sembrano variare con il variare della quantità di proteine (VT) presenti in esse e quindi con la disponibilità e con la qualità del polline presente nell'ambiente. Alla luce di tale osservazione abbiamo ritenuto opportuno studiare le caratteristiche morfologiche e morfometriche delle ghiandole ipofaringee nelle api nutrici e bottinatrici normalmente e scarsamente alimentate e di correlare i risultati ottenuti con la quantità di VT presente in esse.

## **2.2 Materiali e metodi**

Campioni di api, 8 nutrici e 8 bottinatrici (4/alveare), sono stati prelevate 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 (sia quantitativa che qualitativa intesa come polline scarsamente proteico) e gli apicoltori riportavano frequenti fenomeni di spopolamento, frequenti sciamature o gravi morie. 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 anatomico-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 4µm e successivamente colorati con Leica autostainer XL con l'Ematossilina-Eosina (EE), colorazione di base nello studio microscopico dei tessuti animali. Per alcuni campioni sono state effettuate delle colorazioni istochimiche elettive: Periodic Acid Schiff (PAS) e PAS - Alcian blue(PAS-BA) per l'evidenziazione del glicogeno e dei glicosaminoglicani.

### **2.2.2 Analisi morfometrica**

Per la valutazione delle ghiandole, 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. Le ghiandole presenti nei 10 campi/campione erano circoscritte manualmente e successivamente analizzate con l'utilizzo del software di analisi di immagini "Image J". Tale software ci ha permesso di misurarne 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  $-80^{\circ}\text{C}$  per preservare l'integrità degli acidi nucleici. Mediante lame sterili monouso, per ciascun campione sono stati separati testa e torace, 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, Tabella 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, Tabella 1). Il protocollo termico di qPCR prevedeva le seguenti fasi:

- $95^{\circ}\text{C}$  per 3 min (denaturazione),

- 45 cicli di amplificazione a 95°C per 15 sec (denaturazione) e 60.2 gradi 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  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  utilizzando il software Bio-Rad CFX Manager. Gli esperimenti sono stati ripetuti in triplicato tecnico.

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

**Tabella 1. 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 III

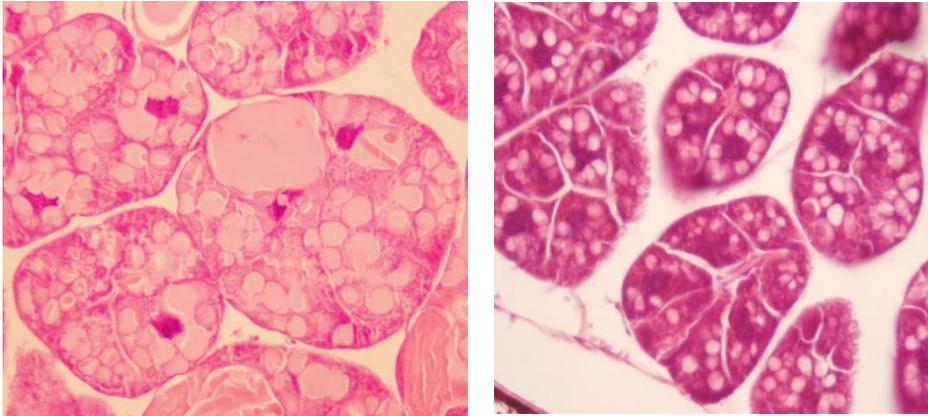
### 3.1 Risultati

#### 3.1.1 Esame macroscopico e microscopico

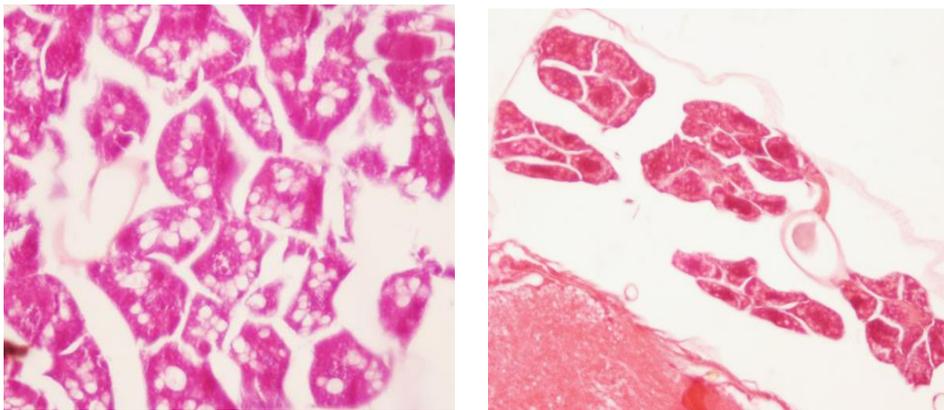
All'esame macroscopico con lo stereomicroscopio le nutrici e le bottinatrici, sia quelle normalmente alimentate che quelle scarsamente alimentate, non evidenziavano alcuna alterazione anatomica. All'esame microscopico le ghiandole risultano costituite da acini di forma irregolare, numero e dimensioni variabili a seconda che si tratti di nutrici o di bottinatrici. Le cellule che li compongono hanno nucleo piccolo, basofilo, appiattito e spesso spostato alla periferia. Il citoplasma ha aspetto variabile, da schiumoso e chiaro a granulare e scuro, e che varia, come le dimensioni, in funzione dell'età delle api e quindi del lavoro che svolgono (nutrici/bottinatrici). Il materiale granulare e scuro si dispone a cappuccio intorno a quello schiumoso, ad assumere un aspetto che ricorda le semilune del Giannuzzi, descritte nelle ghiandole miste dei mammiferi. Alla colorazione istochimica specifica della PAS-BA il materiale schiumoso è risultato positivo alla PAS confermando quindi la sua origine mucosa, mentre quello granulare è risultato BA positivo indicando una sua natura diversa, probabilmente proteica. All'esame microscopico le nutrici normalmente alimentate avevano ghiandole voluminose, costituite da un numero elevato di acini, di forma e grandezza variabile. Il citoplasma era notevolmente disteso dall'accumulo di abbondante materiale schiumoso e chiaro (mucine) mentre il materiale granulare e scuro (di natura proteica) era scarso, indicativo di un'attività secretoria prevalentemente mucosa.

Nelle nutrici scarsamente alimentate le ghiandole erano più piccole e gli acini erano in numero e di dimensione inferiore per un contenuto più basso di mucine, indicativo di un'attività secretoria più bassa. Nelle api bottinatrici normalmente alimentate, le ghiandole erano ipotrofiche e gli acini erano molto piccoli, con citoplasma scarso e granulare indicativo di un'attività prevalentemente sierosa, nelle bottinatrici scarsamente alimentate le ghiandole erano atrofiche e gli acini erano in evidente stato di degenerazione/regressione (Figs.15, 16, 17 e 18).

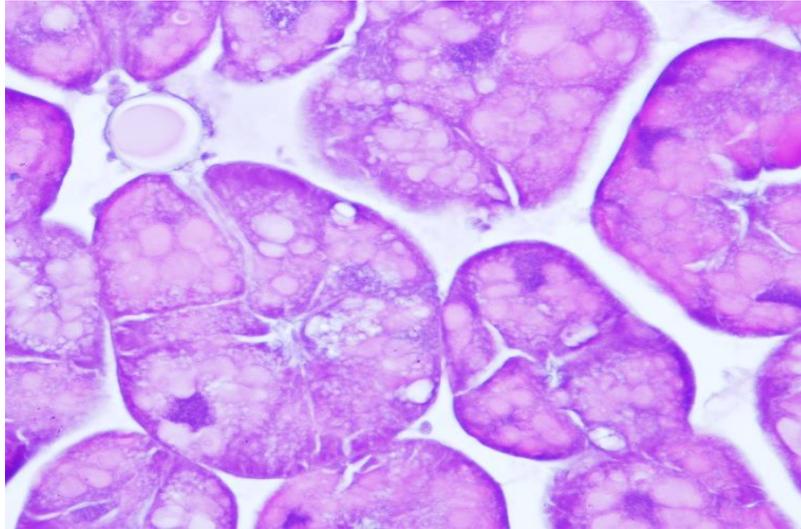
All'esame istochimico con la PAS-BA, le secrezioni mucose risultavano PAS + mentre quelle sierose Alcian + (Fig. 19).



**Figs. 15 e 16 – Acini ghiandolari in api nutrici e bottinatrici normalmente alimentate –  
Sezioni istologiche colorate con E-E – 40X**



**Figs.17 e 18 – Acini ghiandolari in api nutrici e bottinatrici scarsamente alimentate -  
Sezioni istologiche colorate con E-E – 40X**



**Fig. 19 – Acini ghiandolari in api nutrici – sezioni istologiche colorate con PAS-BA – 40X**

### **3.1.2 Risultati morfometria**

I risultati morfometrici confermano quanto osservato e descritto con l'esame istologico. Le ghiandole risultavano sempre più voluminose nelle nutrici e nelle bottinatrici normalmente alimentate rispetto a quelle scarsamente alimentate. I valori medi dell'area ( $\mu\text{m}^2$ ) e rispettiva Deviazione standard (DS) degli acini ghiandolari andavano da  $1.19 \pm 0.23$  a  $1.27 \pm 0.16$  e da  $0.62 \pm 0.20$  a  $0.90 \pm 0.27$  nelle nutrici normalmente alimentate e in quelle scarsamente alimentate; ( $\mu\text{m}^2$ ) e da  $0.37 \pm 0.16$  a  $0.88 \pm 0.26$  e da  $0.16 \pm 0.03$  a  $0.26 \pm 0.09$  nelle bottinatrici normalmente alimentate e in quelle scarsamente alimentate (Tabella 2).

### **3.1.3 Real-time PCR quantitativa (qPCR)**

La quantità di VT contenuta nelle ghiandole risultava essere maggiore nelle api nutrici e nelle bottinatrici normalmente alimentate, confermando i risultati istologici e morfometrici ottenuti. La quantità di VT andava da 1.76 a 15.7 N.G.E. e da 0.18 a 0.30 N.G.E. nelle api nutrici normalmente alimentate e nelle api nutrici scarsamente

alimentate, da 0.47 a 0.74 N.G.E. e da 0.14 a 0.30 N.G.E. nelle bottinatrici normalmente alimentate e scarsamente alimentate (Tabella 2).

<b>CAMPIONE</b>	<b>ACINI AREA MEDIA (<math>\mu\text{m}^2</math>) e DV</b>	<b>ACINI VT (N.G.E)</b>
<b>NUTRICI (N.A.)</b>	da $1.19 \pm 0.23$ a $1.27 \pm 0.16$	da 1.76 a 15.7
<b>NUTRICI (S.A.)</b>	da $0.62 \pm 0.20$ a $0.90 \pm 0.27$	da 0.18 a 0.30
<b>BOTTINATRICI (N.A.)</b>	da $0.37 \pm 0.16$ a $0.88 \pm 0.26$	da 0.47 a 0.74
<b>BOTTINATRICI (S.A.)</b>	da $0.16 \pm 0.03$ a $0.26 \pm 0.09$	da 0.14 a 0.30
*(N.A.): Normalmente Alimentate *(S.A.): Scarsamente Alimentate *N.G.E.: Normalized Gene Expression		

**Tabella 2. Risultati morfometrici e della qPCR nelle ghiandole delle api nutrici e bottinatrici campionate**

## Considerazioni e conclusioni

I risultati del nostro studio, sebbene effettuati su un numero limitato di campioni, sembrano confermare quanto riportato in letteratura, che le dimensioni delle ghiandole ipofaringee nelle api variano notevolmente in funzione del lavoro che sono chiamate a svolgere (nutrici o bottinatrici), oltre che con l'età. I risultati morfologici, morfometrici e la qPCR sottolineano che, nelle api nutrici queste ghiandole sono sempre voluminose ed hanno un'alta attività secretoria mentre nelle bottinatrici le ghiandole hanno dimensioni generalmente inferiori e un'attività secretoria bassa.

Il nostro studio dimostra inoltre che tali ghiandole sono di tipo miste e cioè che producono alternativamente, secrezioni mucose e sierose e che l'accumulo di tali secrezioni sono responsabili delle variazioni di dimensioni degli acini, e che queste generalmente dipendono dal contenuto di vitellogenina presente nelle ghiandole.

Le popolazioni di api da miele sono diminuite negli ultimi anni e recentemente ci sono state enormi perdite di colonie. È possibile che al centro di molti decessi nelle colonie ci sia una cattiva alimentazione o una limitata disponibilità nutrizionale dovuta alla crescente espansione di monocoltura e riduzione delle aree fiorite che acuisce lo stress delle api e la suscettibilità agli agenti patogeni e alle sostanze tossiche ambientali.

Si deduce quindi che una diminuzione della disponibilità e la raccolta di un polline di scarsa qualità (meno proteico) può comportare lo sviluppo di ghiandole ipofaringee più piccole e con quantità di vitellogenina notevolmente inferiore e quindi una ridotta capacità di produrre pappa reale, uno sviluppo anomalo delle larve e del loro sistema immunitario, ed infine una diminuzione dell'aspettativa di vita. Questi effetti nel tempo possono compromettere la produttività della colonia e causare spopolamento delle colonie.

Il nostro studio è nato dalla necessità di salvaguardare e salvare le api per il ruolo essenziale che svolgono negli ecosistemi come insetti impollinatori ricordando che un terzo del nostro cibo dipende dalla loro opera di impollinazione, e per il ruolo di sentinella dell'inquinamento grazie al quale possiamo monitorare lo stato dell'ambiente in cui viviamo.

## BIBLIOGRAFIA

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

**Amdam G.V., Hartfelder K., Norberg K., Hagen A., Omholt S.W.** (2004). “Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering?”. *Journal of Economic Entomology*. 97 (3): 741–747.

**Amdam G.V., Aase ALTO, Seehuus S.C., Fondrk M.K., Norberg K., Hartfelder K.** (2005). “social reversal of immunosenescence in honey bee workers”. *Experimental gerontology*. 40: 939-947.

**Andersen S.O., Hojrup P. and Roepstorff P.** (1994). “Insect Cuticular Proteins”. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25(2): 153 176.

**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.

**Andrada, A. C., Telleria, M. C.** (2005). “Pollen collected by honey bees (*Apis mellifera* L.) from south of Caldèn district (Argentina): botanical origin and protein content”. *Grana*. 44, 115-122.

**Arechavaleta-Velasco M.E. and Guzman-Novoa E.** (2001). “Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies”. *Apidologie*. 32:157–174.

**Aronstein K., Vega S.E., Westmiller R. and Douglas S.A.E.** (2012). “How *Varroa* parasitism affects the immunological and nutritional status of the honey bee, *Apis mellifera*”. *Insects*. 3:601-615.

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

**Baracchi D., Turillazzi S.** (2010). “Differences in venom and cuticular peptides in individuals of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) determined by MALDI-TOF MS”. *J Insect Physiol*. 56:366–375.

**Becher M.A., Scharpenberg H., Moritz R.F.A.** (2009). “Pupal developmental temperature and behavioural specialization of honey bee workers (*Apis mellifera* L.)”. *Journal of Comparative Physiology. A* 195: 673–679.

**Belsky J., Joshi N.K.** (2019). “Impact of Biotic and Abiotic Stressors on Managed and Feral Bees”. *Insects*. 10(8): 233.

**Blomquist G.J., Bagnères A.G.** (2010). “Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology”. University Press, Cambridge.

**Boecking O., Spivak M.** (1999). “Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud”. *Apidologie*. 30:141–158.

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

**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”. *PNAS*. 104 (17): 7128-7133.

**Cotter S.C, Simpson S.J., Raubenheimer D., Wilson K.** (2011). “Macronutrient balance mediates trade-offs between immune function and life history traits”. *Functional ecology*. 25(1): 186-198.

**Crailsheim K., Stolberg E.** (1989). “Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of the hypopharyngeal glands in the honeybee (*Apis mellifera* L.)”. *Journal of Insect Physiology*, 35(8): 595-602, 595-602.

**da Cruz-Landim C., Costa R.A.C.** (1998). “Structure and function of the hypopharyngeal glands of Hymenoptera: a comparative approach”. *J Comp Biol*, 3:151–63.

**de Groot, A.P.** (1953). “Protein and amino acid requirements of the honey bee (*Apis mellifica* L.)”. *Physiol. Comp. Oecol.* 3, 197–285.

**De Jong D., De Jong P.H., 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.

**Decourtye A., Devillers J.** (2010). “Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees”. In: Thany S. (Ed.), *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors*, Landes Bioscience.

**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.

**Deseyn J., Billen J.** (2005) Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae)”. *Apidologie* 36:49–57.

**Di Pasquale, G., M. Salignon, Y. Le Conte, L. P. Belzunces, A. Decourtye, A. Kretzschmar, S. Suchail, J. L. Brunet, and C. Alaux.** (2013). “Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter?” *PLoS One* 8: e72016.

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

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

**Erler S., Denner A., Bobis O., Forsgren E., Moritz R.F.A.** (2014). “Diversity of honey stores and their impact on pathogenic bacteria of the honeybee, *Apis mellifera*”. *Ecology and evolution*. 4(20): 3960-3967.

**Evans J.D., Aronstein K., Chen Y.P., Hetru C., Imler J.L., Jiang H., Kanost M., Thompson G.J., Zou Z., Hultmark D.** (2006). “Immune pathways and defence mechanisms in honey bees, *Apis mellifera*”. *Insect Molecular Biology*, 15:645–656.

**Evans J.D., Spivak M.** (2010). “Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees”. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: S62–S72.

**Franca T.G.D., Ishikawa L.L.W., Zorzella-Pezavento S.F.G., Chiuso Minicucci F., daCunha M.L.R.S., Sartori A.** (2009). “Impact of malnutrition on immunity and infection”. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 15: 374-390.

**Frilli F., Barattini R., Milani N.,** (2001). “L'ape, forme e funzioni”. Calderini Edagricole, Bologna: X + 112 pp.

**Gillespie J.P., Kanost M.R., Trenczek T.** (1997). “Biological mediators of insect immunity”. *Annual Review Entomology*, 42: 611–643.

**Goulson D., Nicholls E., Botías C., Ellen L.** (2015) “Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers”. *Science* 27. Vol. 347, Issue 6229, 1255957.

**Gregory P.G., Evans J.D., Rinderer T., de Guzman L.** (2005). “Conditional Immune-Gene Suppression of Honeybees Parasitized by *Varroa* mites.” *Journal of Insect Science*, 5: 1–5.

**Haas A.** (2007). "The phagosome: compartment with a license to kill". *Traffic*, 8:311-330.

**Hanley, M. E., M. Franco, S. Pichon, B. Darvill, and D. Goulson.** (2008). "Breeding system, pollinator choice and variation in pollen quality in British herbaceous plants". *Funct. Ecol.* 22: 592–598.

**Harpur B.A., Zayed A.** (2013). "Accelerated Evolution of Innate Immunity Proteins in Social Insects: Adaptive Evolution or Relaxed Constraint?" *Molecular biology and evolution*, doi:10.1093.

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

**Henry M., Beguin M., Requier F., Rollin O., Odoux J.F., Aupinel P., Aptel J., Tchamitchian S., Decourtye A.** (2012). "A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees". *ScienceExpress*, 336(6079): 348350.

**Himmer A.** (1927). "Ein Beitrag zur Kenntnis des Wärmehaushalts in Nestbau sozialer Hautflügler". *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie.* 5: 375-389.

**Howard R.W., Blomquist G.J.** (2005). "Ecological, behavioral, and chemical aspects of insect hydrocarbons". *Annual Review of Entomology*, 50: 371-393.

**Huang Z.Y., Otis G.W., Teal P.E.A.** (1989) "Nature of brood signal activating the protein synthesis of hypopharyngeal gland in honey bees, *Apis mellifera* (Apidae: Hymenoptera)". *Apidologie* 20:455-464.

**Huang Z.** (2010). "Honey bee nutrition". *American bee journal.* 150(8): 773-776.

**Johnson R.** (2008). CRS Report for congress "Recent honey bee colony declines". Analyst in Agricultural Economics Resources, Science and Industry Division.

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

**Kather R., Drijfhout F.P., Shemilt S., Martin S.J.** (2015). “Evidence for Passive Chemical Camouflage in the Parasitic Mite *Varroa destructor*”. *Journal of chemical ecology*, 41: 178–186.

**Keller, I., Fluri, P., Imdorf, A.** (2005). “Pollen nutrition and colony development in honey bees: part I”. *Bee World* 86, 3-10.

**Kheyri H., Cribb B.W., Merritt D.J.** (2012). “Comparing the secretory pathway in honeybee venom and hypopharyngeal glands”. *Arthropod Structure & Development* (in press).

**Kleinschmidt G., Kondos A.** (1976). “The influence of crude protein levels on colony production”. *Australasian Beekeeper* 78, 36–39.

**Klose S.P., Rolke D., Baumann O.** (2017). “Morphogenesis of honeybee hypopharyngeal gland during pupal development”. *Frontiers in Zoology*. DOI 10.1186/s12983-017-0207-z

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

**Kronenberg F., Heller H.C.** (1982). “Colonial thermoregulation in honey bees (*Apis mellifera*)”. *Journal of Comparative Physiology*. 148: 65-76

**Krupke C.H., Hunt G.J., Eitzer B.D., Andino G., Given K.** (2012). “Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields”. *PLoS ONE*, 7: e29268.

**Kuhn-Nentwig L.** (2003). “Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods”. *Cell. Mol. Life. Sci.* 60:2651–2668.

**Lavine M.D., Strand M.R.** (2002). “Insect hemocytes and their role in immunity”. *Insect biochemistry and molecular biology*, 32(10): 1295-1309.

**Le Conte Y., Navajas M.** (2008). “Climate change: impact on honey bee populations and diseases”. *Rev. Sci. Tech.* 27(2):485-97, 499-510.

**Marringa W.J., Krueger M.J., Burritt N.L., Burritt J.B.** (2014). “Honey Bee Hemocyte Profiling by Flow Cytometry”. *PLoS ONE*, 9(10): e108486.

**Mattila H.R., Otis G.W.** (2006). “Influence of pollen diet in spring on development of honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies”. *J. econ. Entomol.*, 99 (3), 604-613.

**McMullan J.B., Brown M.J.F.** (2005). “Brood pupation temperature affects the susceptibility of honey bees (*Apis mellifera*) to infestation by tracheal mites (*Acarapis woodi*)”. *Apidologie*. 36: 97–105.

**Memmott J., Craze P.G., Waser N.M., Price M.V.** (2007). “Global warming and the disruption of plant-pollinator interactions”. *Ecol. Lett.* 10(8):710-7.

**Miller-Struttman N.E., Geib J.C., Franklin J.D., Kevan P.G., Holdo R.M., Ebert-May D., Lynn A.M., Kettenbach J.A., Hedrick E., Galen C.** (2015). “Functional mismatch in a bumble bee pollination mutualism under climate change”. *Science*. Vol 349, Issue 6255

**Nappi A.J., Vass E., Frey F., Carton Y.** (1995). “Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites”. *European Journal of Cell Biology*, 68: 450-56.

**Nappi A.J., Ottaviani E.** (2000). “Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates”. *BioEssays*, 22: 469-480.

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

**Oliver R.** (2010). “The economy of the hive, part 1”. *American Bee Journal*, 150(1): 68-70.

**Omholt S.W., Amdam G.V.** (2004). “Epigenetic regulation of aging in honeybee workers”. *Science of Aging Knowledge Environment*, 28.

**Page R.E., Peng C.Y.S.** (2001). “aging and development in social insects with emphasis on the honey bee (*Apis mellifera* L.)”. *Exp. Gerontol.* 36: 695-711.

**Pernal S., Currie R.** (2000). “Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.)”. *Apidologie*, 31: 387–409.

**Pistoia, A.** (2010). “Apicoltura tecnica e pratica”. Edizioni l’Informatore Agrario. 318 pp.

**Randolt K., Gimple O., Geissendörfer J., Reinders J., Prusko C., Mueller M.J., Albert S., Tautz J., Beier H.** (2008) “Immune-related proteins induced in the hemolymph after aseptic and septic injury differ in honey bee worker larvae and adults”. *Insect biochemistry and physiology.* 69(4):155-167.

**Rath W.** (1999). “Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud”. *Apidologie*, 30: 97–110.

**Rinderer T.E., Elliott K.D.** (1977). “Worker honey bee response to infection with *Nosema apis*: influence of diet”. *Journal of Economic Entomology*, 70: 431–433.

**Rortais A., Arnold G., Halm M. P., 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.

**Rothenbuhler W.** (1964). “Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees IV. Responses of F1 and backcross generations to disease-killed brood”. *American Zoologist*, 4: 111–123.

**Roulston, T. H., Cane, J. H.** (2000). “Pollen nutritional content and digestibility for animals”. *Plant Systematics and Evolution*. 222, 187-209.

**Sammataro D., Avitabile A.** (1998). “The Beekeeper’s Handbook”. Ithaca, New York: Cornell University Press.

**Sammataro D., Gerson U., Needham G.** (2000). “Parasitic mites of honey bee: life history, implications, and impact”. *Annual Review of Entomology*, 45: 519–548.

**Schmehl D.R., Teal P.E., Frazier J.L., 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.

**Schmickl T., 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.

**Schmid-Hempel, P.** 2005 Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 529 –551.

**Schmidt J.O., Thoenes S.C., Levin M. D.** (1987). “Survival of Honey Bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), Fed Various Pollen Sources”. *Annals of the Entomological Society of America*. 80(2):176–183.

**Seeley T.D., Heinrich B.** (1981). "Insect thermoregulation". (Heinrich Ed.). John Wiley and Sons; New York, USA. p 340.

**Seeley T.D., Visscher P.K.** (1985). "Survival of honeybees in cold climates: the critical timing of colony growth and reproduction". *Ecological Entomology*, 10: 81–88.

**Seeley T.D.** (1989). "The Honey Bee Colony as a Superorganism". *American Scientist*. 77(6): 546-553.

**Simone-Finstrom M., Spivak M.** (2010). "Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees". *Apidologie*, 41: 295-311.

**Siva-Jothy M.T., Moret Y., Rolff J.** (2005). "Insect immunity: an evolutionary ecology perspective". *Advances in Insect Physiology*, 32: 1–48.

**Soderhall K., Cerenius L.** (1998). "Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity". *Current Opinion in Immunology*, 10: 23-28.

**Starks P.T., Blackie C.A., Thomas D., Seeley P.T.** (2000). "Fever in honeybee colonies". *Naturwissenschaften*, 87: 229–231.

**Tautz J., Maier S., Groh C., Rössler W., Brockmann A.** (2003). "Behavioural performance in adult honey bees is influenced by the temperature experienced during their pupal development". *Proceedings of the National Academy of Science*. 100(12): 7343–7347.

**Tautz J.** (2008). "The buzz about bees: Biology of a superorganism". Springer: Berlin, Germany.

**Tautz, J.** (2009). "Il ronzio delle api". Springer. 301 pp.

**Thuiller W., Lavorel S., Araujo M. B., Sykes M. T., Prentice, I. C.** (2005). “Climate change threats to plant diversity in Europe”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102, 8245–8250.

**Ueno T, Takeuchi H, Kawasaki K, Kubo T.** “Changes in the gene expression profiles of the hypopharyngeal gland of worker honeybees in association with worker behavior and hormonal factors”. *PLoS One*. 2015;10(6): e0130206.

**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., 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.

**van Dooremalen C., Stam E., Gerritsen L., Cornelissen B., van der Steen J., van Langevelde F., Blacquiere 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.

**vanEngelsdorp D., Underwood R., Caron D., Hayes J.Jr** (2007). “An estimate of managed colony losses in the winter of 2006–2007: a report commissioned by the Apiary Inspectors of America”. *American Bee Journal*, 147: 599–603.

**vanEngelsdorp D., Evans J.D., Saegerman C., Mullin C., Haubruge E., Nguyen B.K., Frazier M., Frazier J., Cox-Foster D., Chen Y., Underwood R., Tarpy D.R., Pettis J.S.** (2009). “Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study”. *PloS ONE*, 4: e6481.

**Vidau C., Diogon M., Aufauvre J., Fontbonne R., Viguès B., Brunet J.L., Texier C., Biron D.G., Blot N., El Alaoui H., Belzunces L.P., 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.

**Vilmos P., va Kurucz E.** (1998). “Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system”. *Immunology Letters*, 62: 59–66.

**Vincent J.F.V., Wegst.U.G.K.** (2004). “Design and mechanical properties of insect cuticle”. *Arthropod Structure and Development*, 33: 187–199.

**Viola P.** (1997). “I composti fenolici”. *Scientific nutrition*. 6: 5-8.

**von Planta A.** (1888). “Über den Futtersaft der Bienen”. *Hoppe-Seyler’s Z Physiol Chem*. 12:327–54.

**Wang D.I., Moeller F.E.** (1970). “Comparison of the free amino acid composition in the hemolymph of healthy and *Nosema*-infected female honey bees”. *Journal of Invertebrate Pathology*. 15(2): 202-206.

**Wille H., Wille M., Kilchenmann V., Imdorf A., 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.

**Wilson-Rich N., Dres S.T., Starks P.T.** (2008). “The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*)”. *Journal of Insect Physiology*, 54: 1392–1399.

**Wilson-Rich N., Spivak M., Fefferman N.H., Starks P.T.** (2009). “Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies”. *Annual Review of Entomology*, 59: doi:10.1146/annurev.ento.53.103106.093301.

**Winston M.L.,** (1987). “The biology of the honey bee”. Harvard University Press. ISBN 0-674-07409-2.

**Yang X., Cox-Foster D.L.** (2005). “Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification”. *Proceeding of National Academy of Science of United States of America*, 102(21): 7470–7475.

## Ringraziamenti

Sembra arrivata ormai la fine di un percorso che nonostante tutto, gli alti e i bassi, mi ha cambiata tanto. Tante volte ho pensato di rinunciare perché tante erano le delusioni che me lo facevano pensare, ma altrettante volte ho pensato che quello che ho fatto fino ad adesso in questo mio viaggio universitario, è quello che realmente voglio fare da “grande”.

Mi sembra doveroso a questo punto, dopo più di 60 pagine di tesi, ringraziare con poche parole le persone che hanno fatto parte di questo viaggio e quelle che fanno parte del mio viaggio di vita.

Vorrei ringraziare innanzitutto il Professore Angelo Genovese per la disponibilità e la fiducia che mi ha dato; la Professoressa Paola Maiolino per avermi accolto nel suo piccolo mondo e per avermi mostrato la bellezza di quest’ultimo.

Ringrazio le mie amiche di avventura ma soprattutto di disavventura, Grazia e Angela, insieme abbiamo affrontato questo percorso facendoci forza l’una con l’altra, sfidando la “ciorta” che sembra non volerci mai abbandonare, ma prima o poi si stancherà di noi.

Vorrei ringraziare la mia famiglia per essermi stata accanto, sperando di renderla orgogliosa sempre e di vivere insieme le gioie e le soddisfazioni che il futuro può riservarmi.

Ultimo, ma mai ultimo, vorrei ringraziare Davide che ha dovuto affrontare tutte le mie paranoie e le mie ansie, perché riesce anche solo con un piccolo gesto a risollevarmi il morale. Perché ha creduto in me più di quanto io stessa potessi fare. E sembrerà banale e ormai inflazionato ma sei tu che mi fai stare bene quando io sto male e spero viceversa!