RNA sequencing per migliorare la conoscenza del comportamento igienico in *Apis mellifera ligustica*.

Caterina Cambuli [1], Cecilia Costa [2], Marco Lodesani [2], Andrea Galli [2], Marina Montedoro [1].

[1] Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani, Rivolta d'Adda, Cremona, IT.
[2] CREA, Centro di ricerca Agricoltura e Ambiente, Bologna, IT.
[3] CREA, Centro di ricerca Zootecnia e Acquacoltura, Lodi, IT
Corresponding author: caterina.cambuli@istitutospallanzani.it

Introduzione

Apis mellifera ligustica (Spinola 1806) è una sottospecie di ape da miele evoluta nell'area peninsulare, **il suo patrimonio genetico è considerato a rischio** per varie motivazioni tra le quali l'introduzione incontrollata di ibridi, la diffusione di patologie e la fragilità creata dall'impatto degli agrofarmaci.
Le conseguenze negative relative alla tutela della biodiversità sono molteplici.
Il rischio concreto è di **non intervenire tempestivamente nel preservare una risorsa genetica unica,** riconosciuta a livello mondiale come **una delle più importanti sottospecie di *Apis mellifera*** per l'alta adattabilità a differenti condizioni ambientali, le caratteristiche comportamentali e le capacità produttive. Inoltre, non è trascurabile il relativo **impatto sulla biodiversità della flora spontanea e sulle produzioni agricole** considerato il ruolo fondamentale svolto nell'impollinazione.
La sinergia di vari interventi e di differenti approcci metodologici può dare un contributo alla tutela di questa preziosa risorsa genetica.

Scopo

Nell'ambito del **miglioramento della tolleranza alle malattie degli alveari** è riconosciuto il ruolo del **comportamento igienico** delle api che, tra le varie declinazioni comportamentali, hanno anche la capacità di riconoscere ed eliminare la covata non vitale o danneggiata.

In questo studio sono state applicate tecnologie di *Next Generation Sequencing* per approfondirne la conoscenza dei meccanismi molecolari alla base di questo comportamento.

Materiali e metodi

Campionamento e RNA *sequencing*

Apiario CREA, Centro di Ricerca Agricoltura e Ambiente.

Apiario costituito da oltre 30 alveari, presso la sede del **CREA di Reggio Emilia.**

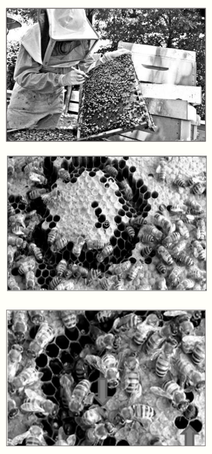
Test del comportamento igienico.

Il **Test per la valutazione del comportamento igienico** è stato effettuato **trattando con azoto liquido un'area del telaino in presenza di covata** e misurando **dopo 24 ore la percentuale di covata rimossa** dalle api nell'area trattata.

Il test è stato ripetuto **due volte per ciascuna stagione apistica, per due anni consecutivi.**

Prelievo campioni e *snap frozen* in azoto liquido.

Le api sono state **prelevate nell'area trattata al momento della rimozione della covata**; è stata effettuata la verifica che all'interno della celletta fosse presente covata da rimuovere. **Ai fini del controllo sono state utilizzate api inattive nel telaino osservate per 10 secondi.** I campioni sono stati **immersi in azoto liquido, *Snap frozen***, al fine di preservare l'integrità dell'RNA e bloccare lo stato dell'espressione genica.



Estrazione RNA
Kit miRNeasy QIAGEN ®

***RNA sequencing* con HISeq 2000 Illumina®**

L'RNA è stato estratto da 20 campioni per 5 famiglie. Il **sequenziamento dell' mRNA** e degli **small RNA** è stato effettuato con **HiSeq 2000 Illumina® .**

Risultati

Annotazione sequenze e studio di espressione genica differenziale

La scelta dei campioni per il successivo sequenziamento è stata effettuata negli alveari che hanno dimostrato la presenza di **un comportamento igienico elevato e ripetibile.**

Sequenze RNA — **Allineamento** delle sequenze di **mRNA** e **small RNA** sul genoma di riferimento di *Apis mellifera.*

Annotazione — **Annotazione di 119 small RNA e** oltre **10.000 geni.**

Differenze di espressione — **43 geni differenzialmente espressi, *FDR p value correction* < di 0,05**

Tra i geni individuati nello studio di espressione genica, particolarmente interessanti sono risultati i geni codificanti per la classe delle ***Odorant Binding Protein* (OBP)**, che interagiscono in modo selettivo con sostanze in grado di stimolare il senso dell'olfatto, **le Troponine**, il gene ***Carboxylesterase*,** che codifica per una proteina trovata espressa nelle antenne delle api associata a differenti funzioni del ciclo di vita.

Conclusioni

Le conoscenze e le applicazioni in ambito genetico potranno introdurre elementi che contribuiscono alle **strategie utili ai fini della tutela di *Apis mellifera ligustica.***
Il comportamento igienico è uno dei possibili caratteri di interesse che favorisce una generica maggiore tolleranza alle patologie dell'alveare. **La caratterizzazione di questo fenotipo**, tuttavia, necessità di particolare attenzione perché l'espressione del comportamento è fortemente influenzato dalle condizioni ambientali e dalla forza della famiglia. Di conseguenza, una **maggiore conoscenza delle basi molecolari**, quali i risultati dello studio, potranno dare un contributo ai fini di future applicazioni che necessitano di una migliore **caratterizzazione delle basi genetiche di questo fenotipo**.

Biodiversità 2018
XII Convegno nazionale
Biodiversità, Ambienti, Salute
Campus A. Saliceti, Università degli Studi di Teramo
13-14-15 giugno 2018

PROGETTO STRANOVA
Strategie di controllo di *Varroa destructor* e monitoraggio della diffusione di *Nosema ceranae* e *N. apis* in Lombardia.
Finanziatore: Regione Lombardia.

istituto SPALLANZANI