

INDICE

INTRODUZIONE.....	2
1. LA SINDROME DA SPOPOLAMENTO DEGLI ALVEARI (SSA/CCD).....	4
2. IL PROGETTO APENET.....	7
3. IL PANORAMA APISTICO REGIONALE.....	11
3.1. CENNI STORICI.....	11
3.2. TECNICHE ELETTROFORETICHE PER L'ANALISI DELLA VARIABILITÀ ENZIMATICA... 14	
4. SOSTANZE ATTIVE E PATOGENI RILEVATI.....	15
4.1 PESTICIDI.....	15
4.2. NOSEMIASI.....	20
4.3. VIROSI.....	21
5. SCOPI DELLA RICERCA.....	26
5.1. MONITORAGGIO DELLE MORTALITÀ.....	26
5.2. PROVA DI COMPARAZIONE.....	26
5.3. INDAGINE SUL GRADO DI IBRIDAZIONE.....	27
6. METODOLOGIA.....	28
6.1. MONITORAGGIO DELLE MORTALITÀ.....	28
6.1.1 Analisi di laboratorio.....	37
6.2. PROVA DI COMPARAZIONE.....	39
6.3. INDAGINE SUL GRADO DI IBRIDAZIONE.....	42
6.3.1. Analisi elettroforetica.....	42
7. RISULTATI e DISCUSSIONI.....	44
7.1. MONITORAGGIO DELLE MORTALITÀ.....	44
7.1.1. Risultati 2009.....	44
7.1.2. Analisi di laboratorio.....	62
7.1.3. Risultati 2010.....	64
7.1.4. Analisi di laboratorio.....	70
7.1.5. Discussioni.....	75
7.2. PROVA DI COMPARAZIONE.....	79
7.2.1. Risultati.....	79
7.2.2. Discussioni.....	87
7.3. INDAGINE SUL GRADO DI IBRIDAZIONE.....	89
7.3.1. Risultati.....	89
7.3.2. Discussioni.....	92
8. CONCLUSIONI.....	93
BIBLIOGRAFIA.....	96

INTRODUZIONE

Quando, qualche anno fa si è cominciato a parlare su larga scala del problema della moria delle api, una delle frasi che più di frequente veniva citata era questa: “Se l’ape scomparisse dalla faccia della terra all’uomo non resterebbero che quattro anni di vita” attribuita ad Albert Einstein. Successivamente fu smentito che Einstein avesse mai detto niente del genere e l’attenzione si spostò dal significato che essa esprimeva alla polemica su chi l’avesse pronunciata. Prescindendo dalla attribuzione di paternità di tale frase, quello che appare più significativo è quanto essa esprime e non tanto i termini allarmistici con cui il messaggio viene espresso ma certamente il fatto che pone l’accento su una problematica spesso scarsamente conosciuta o totalmente ignorata dalla maggioranza dei non addetti ai lavori. Quando si parla di api la reazione più diffusa che si genera nell’ascoltatore e quella legata alla paura della puntura accomunando così in un unico grande gruppo tutti gli imenotteri aculeati. Soltanto in confinati ambienti tecnico-scientifici si fanno le dovute distinzioni e si parla di *Apis mellifera* come di un apoideo sociale che svolge un ruolo essenziale nei processi di impollinazione. In effetti ad uno sguardo più approfondito emerge in tutta la sua enormità l’importanza che le api, e più in generale tutto il gruppo degli apoidei, riveste nei meccanismi di impollinazione delle piante entomogame sottolineando il fatto che in questo gruppo di vegetali rientra la quasi totalità delle colture agrarie. A queste vanno aggiunte tutte le essenze vegetali che costituiscono e caratterizzano la flora spontanea delle diverse aree del globo e che per perpetuarsi necessitano dell’attività pronuba di tali insetti. In realtà si è anche arrivati a quantificare il danno economico che deriverebbe dalla scomparsa degli impollinatori, ma risulta pressoché impossibile quantificare il danno che deriverebbe dalla scomparsa di elementi costituenti della flora spontanea. Da qui ad affermare l’esistenza di una correlazione diretta tra la scomparsa delle api e l’estinzione dell’uomo, il passaggio appare un po’ forzato, soprattutto se la si inquadra anche in una definita connotazione temporale. Tuttavia calcare un po’ la mano quando è necessario richiamare l’attenzione su un problema tutt’altro che banale, forse non è poi così sbagliato.

Il dato essenziale è che la scomparsa delle api ha generato grande preoccupazione sia tra i diretti interessati, gli apicoltori e agricoltori, che ne hanno avuto un danno immediato di natura economica, sia tra i ricercatori, i quali, consapevoli che l’entità del problema si inserisce su una più ampia scala, ne hanno compreso appieno le possibili drastiche ripercussioni. Per tale ragione il mondo della ricerca si è subito attivato per iniziare a studiare il fenomeno e tentare almeno di comprenderne le cause nella speranza di potere

porre un eventuale rimedio. In ambito nazionale nasce così il progetto APENET finanziato dal Ministero delle politiche agricole e Forestali e dal Ministero della Salute che mira a creare una rete operativa in cui fare convergere le diverse competenze nel settore apistico, necessarie per approfondire il problema nelle sue diverse sfaccettature. Il presente studio si inserisce in tale contesto, nascendo dall'esigenza di approfondire in ambito regionale, alcune delle criticità emerse nel settore apistico. Trovandosi in un contesto ambiente alquanto peculiare quale è la realtà territoriale siciliana, si è ritenuto utile approfondire anche l'indagine relativa alla presenza sul territorio regionale della sottospecie autoctona *Apis mellifera siciliana* che, essendosi evoluta proprio in tale territorio ne costituisce una componente essenziale e, per tale ragione, nel momento in cui ci si deve approcciare alle problematiche apistiche regionali, non si può prescindere dal fatto di trovarsi di fronte ad una sottospecie diversa da quella diffusa a livello globale.

Pertanto la prima parte di questa ricerca riguarda la creazione e la messa a punto in ambito locale della rete di monitoraggio per la valutazione dei fenomeni di mortalità e spopolamento secondo quanto previsto dal progetto nazionale. Contestualmente sono state predisposte una prova per la valutazione di alcune delle principali caratteristiche distintive delle due sottospecie presenti sul territorio finalizzata all'ampliamento delle conoscenze sulla sottospecie autoctona in comparazione con l'ape da miele per antonomasia e una breve indagine sulla composizione genetica della popolazione apistica presente nelle aree oggetto di studio tramite analisi della variabilità enzimatica.

1. LA SINDROME DA SPOPOLAMENTO DEGLI ALVEARI

La sindrome dello spopolamento degli alveari SSA, (CCD: Colony Collapse Disorder) è un fenomeno ancora poco conosciuto per il quale le famiglie di api (*Apis mellifera*) periscono bruscamente. La SSA/CCD è stata riscontrata per la prima volta nelle colonie di api del Nord America alla fine del 2006 (*Van Engelsdorp et al. 2007, 2008*). Dal 1976 al 2006 si è verificata una drastica riduzione del numero delle api selvatiche negli Stati Uniti ormai quasi estinte; bisogna, tuttavia, tenere presente che l'*Apis mellifera* non è una specie autoctona del continente americano, ove è stata introdotta dall'uomo (*Watanabe, M., 1994*) ed un significativo, sebbene graduale, declino nel numero delle famiglie allevate dagli apicoltori. Questo declino comprende il cumulo delle perdite dovute a tutti i fattori come l'urbanizzazione, l'uso dei pesticidi, le patologie apistiche, il pensionamento degli apicoltori e la chiusura delle attività commerciali. Tuttavia alla fine del 2006, inizio del 2007, il tasso di riduzione è cresciuto raggiungendo proporzioni fino ad allora sconosciute ed il termine "Disturbo da Collasso dell'Alveare" è stato proposto per descrivere queste improvvise scomparse (*Cox-Foster et al. 2007*).

Gli apicoltori europei osservarono un fenomeno simile in Belgio, Francia, Olanda, Grecia, Italia, Portogallo e Spagna (*Dupont G., 2007*).

Le prime segnalazioni arrivarono anche dalla Svizzera e dalla Germania anche se in misura minore (*Steinberger P. 2007*). Possibili casi di SSA/CCD sono stati riscontrati anche a Taiwan dall'aprile (*Molga P., 2007*). Negli ultimi 2-3 anni, anche nel nostro paese, sono stati segnalati gravi episodi di mortalità di colonie d'api (*Higes et al., 2006; Gonzales, 2007; Stockstad, 2007*).

La causa, o le cause, della sindrome non sono ancora ben comprese: alcune teorie parlano di stress dovuto ai cambiamenti ambientali (*Sahba A., 2007*) malnutrizione, vari patogeni tra cui il virus della paralisi acuta (IAPV), il Kashmir bee virus (KBV) e il virus delle ali deformi (DWV). (*Refkin A. C., 2007; Minkel JR., 2007; Chen et al. 2007*), acariosi, pesticidi come ad esempio neonicotinoidi o imidacloprid (*Decourtye et al. 2004*), radiazioni da telefoni cellulari o altri dispositivi creati dall'uomo (*Lean G. Shawcross H., 2007*) e colture geneticamente modificate.

I trattamenti con pesticidi giocano un ruolo particolarmente critico se effettuati durante la stagione primaverile estiva soprattutto nelle aree più intensamente coltivate.

La maggior parte dei principi attivi utilizzati ha un effetto tossico sulle api che determina una mortalità acuta nel caso di contatto diretto o ingestione. Altre sostanze, come i concianti o i regolatori di crescita possono invece avere effetti più nascosti e difficili da rilevare.

Un recente studio delle Università di Plymouth e Stirling, in Inghilterra e di Poitiers in Francia, rintraccia nella diminuzione del polline una delle concause principali nella moria delle api: con meno nutrimento, viene meno l'apporto proteico delle api e di conseguenza si indebolisce il loro sistema immunitario (*Ognibene A., 2007*).

A livello internazionale si è concordi nell'affermare che difficilmente esiste un'unica causa valida per ogni episodio segnalato, ma che diversi fattori agiscano simultaneamente o singolarmente, variando negli anni a seconda delle situazioni contingenti che si possono creare. I fattori ritenuti responsabili dell'aumento di mortalità delle colonie sono: i patogeni dell'alveare, i trattamenti fitosanitari, il cambiamento climatico, la riduzione della variabilità genetica delle popolazioni di api, la diminuzione e l'uniformità delle fonti alimentari e ancora altri possibili fattori, tra cui sono indicati i campi elettromagnetici.

Tali fattori influiscono anche sulla gestione delle colonie da parte degli apicoltori; ad esempio, l'elevata infestazione da varroa nell'estate 2007, unitamente alla notevole siccità nei mesi di Luglio e Agosto, con conseguente carenza di sostanze alimentari per le colonie (soprattutto polline per l'allevamento della covata), ha fatto sì che molti apicoltori interrompessero precocemente la produzione per iniziare i trattamenti. Questi ultimi, a causa del fenomeno della reinfestazione, sono stati protratti anche oltre il consueto periodo, con frequenza ravvicinata e con svariate sostanze, andando a disturbare l'allevamento delle "api invernali". Gli interventi climatici e quelli umani potrebbero quindi da un lato aver favorito la riproduzione delle forme virali responsabili del collasso delle colonie, e dall'altro stressato chimicamente le colonie in un momento così delicato come la preparazione all'inverno. Inoltre, è probabile che esistano interazioni sinergiche tra fattori biotici e/o abiotici, su cui ancora molto rimane da scoprire, poiché le infestazioni multiple di altri patogeni con Varroa sono inevitabili, data l'ubiquità del parassita. Anche altri parassiti, quali il microsporide di recente introduzione *Nosema ceranae*, ritenuto da alcuni autori come il più probabile responsabile del fenomeno di spopolamento (*Higes et al., 2008*), è stato segnalato come presente nella maggior parte degli alveari negli Stati Uniti (*Cox-Foster et al., 2007*) e in Europa sembra addirittura aver rimpiazzato il microsporide tradizionalmente parassita di *A. mellifera*, *Nosema apis*. E' quindi verosimile che possano essersi instaurati dei meccanismi d'interazione tra questo parassita emergente ed altri fattori. I fattori sopra menzionati influiscono su una popolazione di api la cui diversità genetica, a livello europeo, è ridotta, a causa delle pratiche di miglioramento genetico che hanno utilizzato alcune linee per la riproduzione di migliaia d'individui. Inoltre, le caratteristiche selezionate dagli allevatori per ottenere api facilmente maneggiabili ed altamente produttive, potrebbero essere andate a

discapito di quelle caratteristiche invece necessarie alla colonia per superare le avversità. Le variabilità genetica delle popolazioni di api selvatiche in Europa sono fortemente ridotte anche a causa della presenza dell'acaro *Varroa*; le api allevate, per la peculiare caratteristica di accoppiamento delle api, in cui la regina si accoppia con molti fuchi a distanza di alcuni Km dall'alveare, scambiano il loro patrimonio genetico con le popolazioni selvatiche. Ciò significa che la maggior parte delle popolazioni attuali di api potrebbe aver perso alcune caratteristiche importanti per la difesa della colonia dai fattori di stress. Inoltre, è comunemente in uso la pratica di utilizzare regine di diversa origine geografica, senza tener conto del fatto che popolazioni locali potrebbero essere maggiormente in grado di tollerare situazioni avverse. Per questo motivo, è importante valutare l'esistenza di interazioni tra genotipo delle api allevate e ambiente, ed individuare le caratteristiche di tolleranza agli stress ambientali delle popolazioni autoctone. Inoltre, alla luce dei cambiamenti climatici in atto, sarà utile ottenere informazioni sulle possibili modalità di reazione delle colonia a situazioni climatiche caratterizzate da temperature invernali più elevate e da prolungati periodi di siccità, osservabili in sottospecie che si sono evolute in condizioni naturali di questo tipo, quali la razza siciliana *A. m. siciliana*.

I principali sintomi che generalmente vengono riscontrati e portano a ritenere che si tratti di CCD sono i seguenti:

Nel caso di colonia già collassata:

1. Totale assenza di api adulte nella colonia con presenza di poche api morte all'interno della famiglia o davanti all'arnia.
2. Presenza delle scorte immagazzinate all'interno dell'arnia che non vengono saccheggiate né da altre api né da altri parassiti
3. Presenza di covata opercolata

Nel caso di colonia spopolata:

1. drastica riduzione del numero di api bottinatrici
2. assenza di api morte dentro o davanti l'arnia
3. api operaie insufficienti al mantenimento della covata
4. generalmente costituite da giovani api
5. la regina è presente
6. scarsa propensione a consumare alimentazioni suppletive (sciropo di zucchero, candito, proteine aggiuntive) (*Van Engelsdorp et al. 2007*).

2. IL PROGETTO APENET

Le morie registrate anche nel nostro paese (Fig.1) a partire dal 2006 hanno messo in evidenza la necessità e l'urgenza di attivare procedure che consentissero di ottenere dati scientifici sul fenomeno della scomparsa delle api che consentano di determinarne l'entità e comprendere le possibili cause. Per tale ragione a partire da 2008 il ministero delle politiche agricole e ambientali inizia le procedure per finanziare un progetto di ricerca mirato all'approfondimento delle varie problematiche correlate alla CCD. Il 29/12/2008 con DM 19735/7303/08 viene finanziato il progetto APENET-monitoraggio e ricerca in apicoltura il cui coordinamento viene affidato al CRA api di Bologna. Vengono coinvolte istituzioni nei diversi settori della ricerca e gli Istituti Zooprofilattici al fine di raccogliere le maggiori competenze nei vari settori e garantire così uno scambio di informazioni che consenta di studiare le interazioni tra i diversi fattori di rischio.

Perdite di colonie in Europa			
Country	Losses	When	where
Germany	~10%	2005 to 2008	Monitoring project in south
	> 30%	2007/08	
Austria	8 to 15%	2007-2008	depending of regions
Poland	20%	2007/08	from questionnaires
	>30%	2007/08	from samples
USA	30% < 17%	08.07.2006 before	
Belgium	8 to 18%	2006-2007	
Croatia	16%	2005-6	
	25%	Winter 2007-8	
Finland	16%	98-02	
	34%	2002-03	
	10%	2003-07	
Italy	30-40%	2007	North
	10-30%	2007	South
Greece	5 to 25%	2007	survey (166 questionnaires) depending on the area
Switzerland	30%	2007-8	
	10-30 %	2002-7	
Denmark	15,9	1986- 2006	
	22-25%	2007-2008	
Netherlands	13-26%	2003-08	
Bulgaria	6%	2007	
Turkey	40%	2007	Carnica & caucasica Anatolica
	10%	2007	
Sweden	devastating	2002-3	
Slovenia	27%	last winter	
	20%	2007	

Data from 2nd CoLoss meeting, Feb. 2008

Figura 1. Dati relativi alle perdite di alveari registrate in Europa.
(COLOSS Meeting, Zagabria 3-4 marzo 2009)

La struttura del progetto (Fig. 2), vista la multifattorialità della problematica affrontata, prevede infatti cinque grandi linee di ricerca relative alle diverse criticità emerse:

- Agrofarmaci
- Mais conciato
- Patologie
- Ambiente

alla base di tutto è prevista una attività di monitoraggio che fornisca dati su scala nazionale relativi allo stato di salute generale degli apiari.

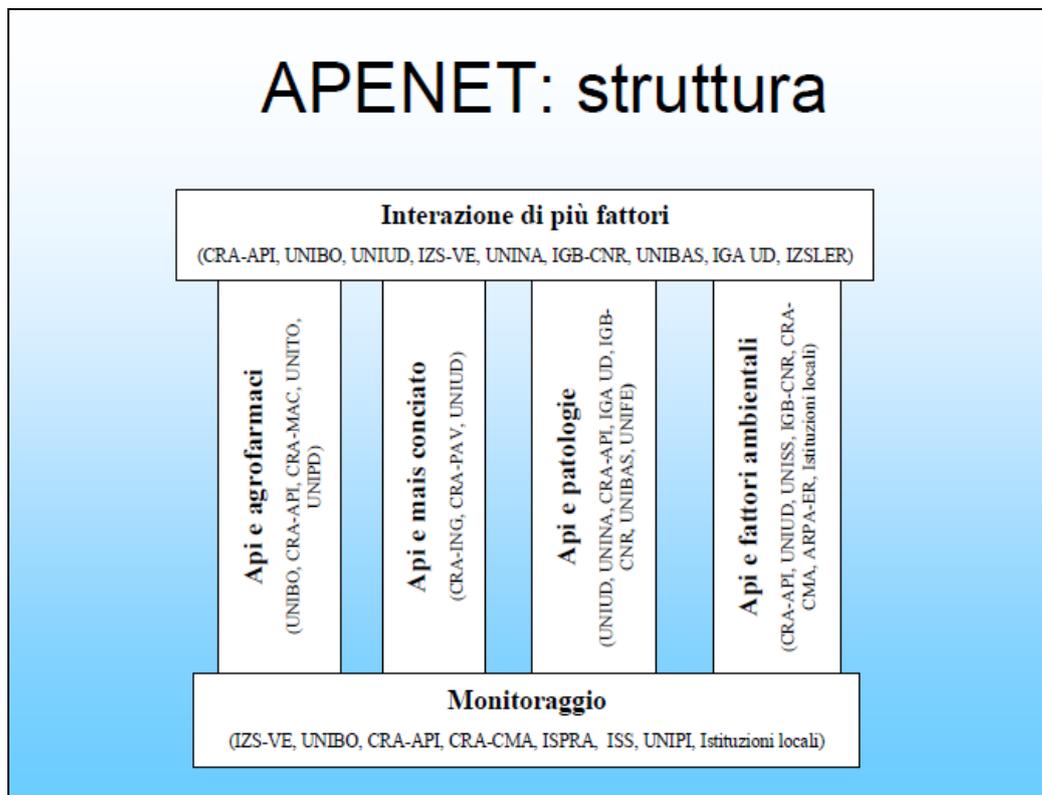


Figura 2. Struttura organizzativa delle diverse linee di ricerca del progetto Apenet.



Figura 3. Dislocazione spaziale degli apiari inseriti nei moduli di monitoraggio del progetto Apenet

Per tale scopo viene costituita una Rete Nazionale di Monitoraggio Apenet (figura 3) che prevede la creazione in ciascuna regione del paese di almeno un modulo di rilevamento. Ciascuno di tali moduli deve essere costituito da 5 apiari di 10 alveari ciascuno che abbiano come requisito fondamentale quello di essere postazioni stanziali e che siano localizzati in aree geografiche rappresentative delle diverse realtà ambientali della regione.

Per ragioni logistiche si stabilisce che non vi sia tra un apiario e l'altro una distanza maggiore di 50 km e che siano disposti secondo lo schema mostrato in figura 4. Per la gestione del

modulo vengono individuati i referenti regionali che si occuperanno oltre che della individuazione ed installazione delle postazioni, della raccolta dei dati e dei campioni da inviare ai laboratori di riferimento. Per la gestione ed elaborazione dei dati viene predisposto un software dedicato e un sito web che funge da banca dati di riferimento.

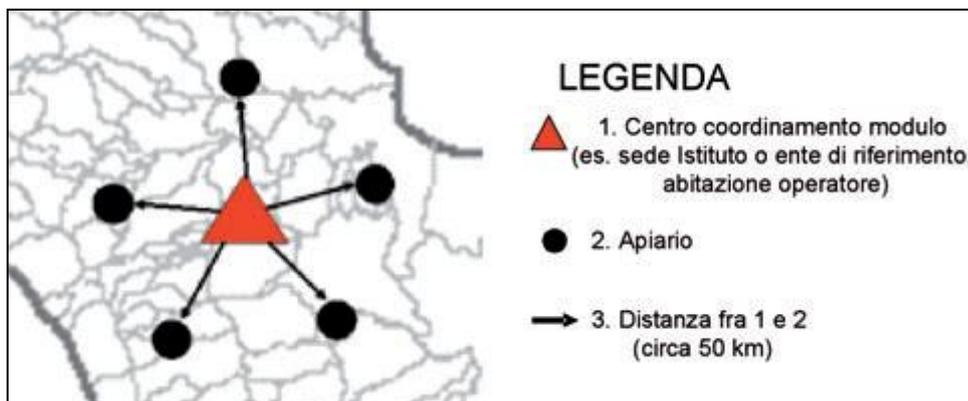


Figura 4. Struttura ipotetica del modulo di rilevamento (*Porrini et al.*)

La rete di monitoraggio fornisce informazioni sullo stato di salute delle api grazie ai controlli effettuati e alle analisi sui campioni prelevati in ogni postazione.

Il protocollo operativo prevede infatti quattro controlli nel corso dell'anno (dopo l'inverno; in primavera; durante l'estate; prima dell'inverno) (*Chauzat et al., 2006*) in cui viene rilevato lo stato generale di ogni singola famiglia su apposite schede e vengono prelevati campioni di diverse matrici (api, cera, miele e polline) per la ricerca di sostanze inquinanti e patogeni.

La gestione e il coordinamento delle analisi di laboratorio vengono affidate all'Istituto Zooprofilattico sperimentale delle Venezie.

3. IL PANORAMA APISTICO REGIONALE

3.1. CENNI STORICI

La specie *Apis mellifera*, evolutasi a partire dal periodo pleistocenico circa 2 milioni di anni fa, era diffusa originariamente in Europa, Africa e Asia occidentale. Attualmente, in seguito alle attività antropiche legate alle pratiche apistiche, popola ampiamente anche il continente americano e australiano. Questa vasta distribuzione geografica ha determinato una notevole diversificazione intraspecifica dovuta alle pressioni ambientali esercitate sulle singole popolazioni, portando alla formazione di diverse razze o ecotipi locali afferibili alla specie *Apis mellifera*. Oggi vengono riconosciute ben 27 sottospecie (Ruttner F., 1988; Sheppard, 1997) riconducibili a due macro gruppi: il tipo tropicale, a cui appartengono le razze africane a sud del Sahara, e il tipo temperato, derivanti dall'evoluzione di quattro linee filogenetiche originarie alle quali corrispondono altrettanti gruppi geografici:

- (A) Africa tropicale
- (M) Africa settentrionale e Mediterraneo occidentale
- (C) Mediterraneo settentrionale
- (O) Mediterraneo orientale e Medio oriente.

L'Europa ospita oltre la metà delle 27 sottospecie di *Apis mellifera* oggi riconosciute. In Italia sono presenti due sottospecie *Apis mellifera ligustica*, valorosa da un punto di vista produttivo e per questo apprezzata in tutto il mondo, e *Apis mellifera sicula*, particolarmente importante da un punto di vista conservazionistico in quanto endemismo dell'isola Sicilia, ponte evolucionistico tra le razze africane e le razze europee di api, adattata a climi mediterranei e fonte di variabilità genetica residua.

Studi effettuati sul DNA mitocondriale hanno portato all'individuazione di tre principali ceppi di api, il ceppo africano (A) il ceppo nord-europeo (M) e il ceppo del centro ed est Europa (C) (fig.5.). Mentre nelle popolazioni di api italiane si ha una prevalenza di mitocondri di tipo (C), nelle api siciliane si riscontrano prevalentemente quelli di tipi (A), caratteristici del ceppo africano.

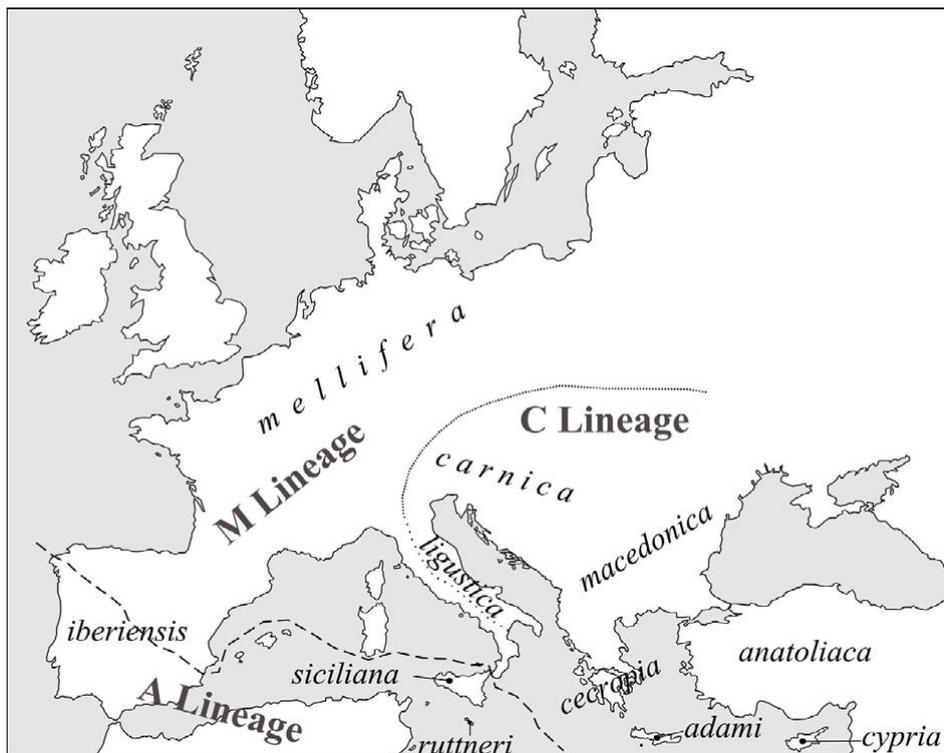


Figura 5. Distribuzione delle principali linee genetiche di *A. mellifera* (De la Rù et al. 2009)

Studi sul polimorfismo enzimatico hanno confermato la peculiarità genetica dell'ape siciliana caratterizzata dalla presenza di un allele EST3 S che non viene riscontrato in nessun'altra popolazione (Badino et al. 1985; Biondo et al. 1991). Secondo tali studi le popolazioni di *A. mellifera intermissa*, presenti nei territori nord africani, avrebbero in comune con l'ape siciliana l'allele MDH1-F ma non possederebbero l'allele EST3 S, ritenuto quindi esclusivo delle popolazioni siciliane.

L'impoverimento degli habitat utili e problemi di natura patologica e agrotecnica, hanno progressivamente ridotto la popolazione naturale di *Apis mellifera* in Italia (ed in tutto il mondo più in generale), mentre l'attività di apicoltura professionale ha contribuito ad omogeneizzare il patrimonio genetico esistente, creando anche zone di ibridazione non naturale tra sottospecie differenti (Dall'Olio R. et al., 2007).

Per tale ragione, a tutela delle razze autoctone e del loro patrimonio genetico, importante fonte di biodiversità e di plasticità genomica, a partire dagli anni ottanta, sono stati attivati studi mirati alla raccolta di ceppi di ape nera sicula per dare vita ad un progetto di tutela ed allevamento in isolamento sulle isole circù siciliane. Inizialmente le api sono state allevate sull'isola di Ustica e successivamente alcune colonie vengono trasferite da Ustica a Filicudi; e Vulcano.

Nel 2006 era allevata una popolazione residua di 36 colonie. Su queste, già dalla fine degli anni '90, inizia il monitoraggio dei parametri biometrici, condotto da CRA-api di bologna, funzionale all'iscrizione all'Albo Ministeriale Nazionale degli allevatori di Api Regine (sezione sottospecie sicula) dell'apicoltore che alleva tale sottospecie.

Successivamente, a scopi scientifici iniziano anche le analisi genetiche sempre condotte presso il CRA-API, che evidenziano tramite l'uso di marcatori genetici mitocondriali e nucleari l'esistenza sull'isola principale Sicilia, nel lato orientale della stessa, di alcune zone maggiormente soggette all'introggressione genetica di *Apis mellifera ligustica* e di aree di territorio, nel lato occidentale, meno interessate da questo fenomeno e pertanto idonee ad un progetto di reintroduzione dell'ape nera sull'isola principale (*Dall'Olio R. et al. 2008*).

Nel 2008 l'ape nera siciliana muove l'interesse della Fondazione Slow Food per la Biodiversità, che, supportata dall'Assessorato Regionale Agricoltura e Foreste, identifica la razza ed i suoi prodotti come meritevoli di Presidio Slow Food e si pone contemporaneamente come obiettivo del Presidio, la reintroduzione dell'ape nera sicula in Sicilia, inizialmente nelle parti della regione meno vocate alla produzione di miele e pertanto maggiormente idonee all'allevamento in purezza della razza.

3.2. TECNICHE ELETTROFORETICHE PER L'ANALISI DELLA VARIABILITÀ ENZIMATICA

Con il termine elettroforesi si indica la migrazione di molecole sotto l'azione di un campo elettrico. Questa tecnica consente la separazione di tali molecole inserite in una matrice adeguata, sulla base della loro carica elettrica o del peso molecolare. Al termine della migrazione ciascuna proteina si localizzerà ad una distanza specifica dal punto di applicazione del campo elettrico (origine). Successivamente con tecniche di colorazione istochimica specifiche verranno evidenziate le diverse frazioni proteiche come bande colorate (Figura 6). Nel caso in cui più loci genici producano forme diverse di un determinato enzima o vi siano più alleli in un locus che codifica per una data proteina si otterranno forme multiple di uno stesso enzima che vengono indicate come isozimi. Se questi sono dovuti a variazioni alleliche di un dato locus si parla di allozimi. Verranno definiti allozimi. Dall'analisi dei quadri elettroforetici individuali per un determinato locus è quindi possibile determinare il genotipo di un individuo ricavando le relative frequenze alleliche per i loci analizzati. Questo tipo di analisi consente nel caso in cui un locus abbia carattere diagnostico, di discriminare individui appartenenti a popolazioni diverse. Perché un locus venga definito diagnostico è necessario che oltre il 95% degli individui di una popolazione presenti un allele alternativo rispetto a quelli dell'altra.

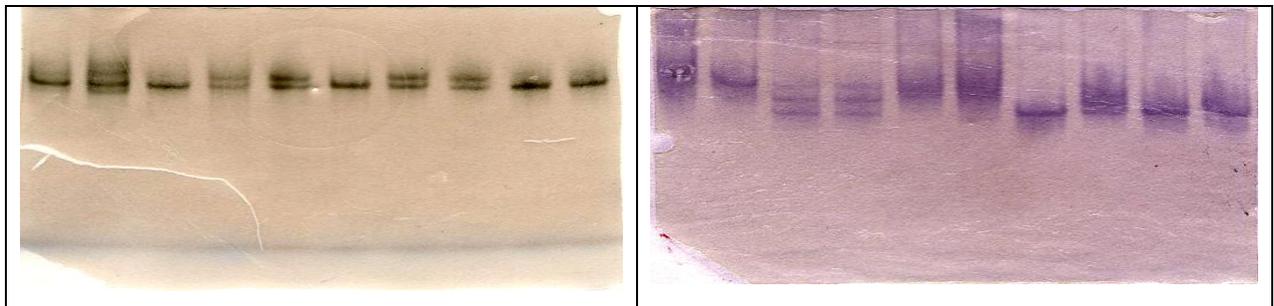


Figura 6. Bande elettroforetiche relative ai loci Est 6 (sinistra) ed Mdh 1 (destra).

Lo studio dei sistemi enzimatici applicato alla specie *Apis mellifera* ha messo in evidenza, in accordo a quanto riscontrato in generale negli imenotteri, una bassa variabilità genetica riferita al parametro dell'eterozigosi (H) media per locus. Da precedenti studi condotti su 40 loci (Basiolo) sono risultati valori medi di eterozigoti compresi tra 0.01-0.02. in conseguenza di ciò è stato possibile individuare un basso numero di marcatori genetici da utilizzare a fini diagnostici. Nel presente studio sono stati utilizzati come marcatori il locus EST 6 e il locus Mdh-1 che sulla base di quanto riportato in bibliografia risultano marcatori diagnostici per l'identificazione della sottospecie siciliana.

4. SOSTANZE ATTIVE E PATOGENI RILEVATI

4.1. PESTICIDI

L'uso degli antiparassitari si è notevolmente modificato nel corso degli anni, privilegiando sempre di più molecole a basso impatto ambientale pur con una persistente azione nei confronti dei competitori siano essi di origine vegetale o animale. Si è così passati dagli organoclorurati, sostanze ampiamente usate negli anni '50 agli organofosforati negli anni '60 per passare successivamente ai carbammati diffusi negli anni '70 ed ai piretroidi negli anni '80. Nell'ultimo decennio sono subentrati i neonicotinoidi che in breve tempo hanno preso il sopravvento grazie alla loro efficacia nei diversi settori. Si è infatti registrata una forte crescita nella vendita di prodotti a base di neonicotinoidi con l'imidacloprid in testa. In generale i neonicotinoidi costituiscono una classe di insetticidi di concezione relativamente nuova, che ha ottenuto in breve tempo ottimi riscontri ed una rapida diffusione. Tale successo si deve principalmente ai seguenti fattori:

- Ottima attività insetticida in modo particolare contro i principali gruppi di parassiti tra cui Omotteri, Coleotteri ed alcune specie di Lepidotteri;
- Ampio spettro d'azione poiché risultano efficaci anche sugli insetti resistenti ad altri gruppi chimici
- Ridotta dose d'impiego
- Elevata sistemicità, il principio attivo può infatti essere assorbito dalle radici, dal fusto e dalle foglie e dopo l'assorbimento viene traslocato nella pianta attraverso la corrente xilematica (ascendente) venendo costantemente veicolato alle foglie presenti e a quelle in corso di formazione.

Inoltre il pesticida viene assorbito anche attraverso la cuticola fogliare (azione citotropica e translaminare) e consente la protezione anche delle parti sviluppatesi dopo il trattamento.

La molecola agisce a livello del sistema nervoso degli insetti con un meccanismo di tipo acetilcolinomimetico, legandosi in modo irreversibile ai recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChR), localizzati a livello delle sinapsi tra due neuroni, provocando così l'alterazione della trasmissione degli impulsi nervosi, che determina conseguentemente paralisi e morte dell'insetto.

I neonicotinoidi attualmente presenti sul mercato possono essere distinti in due sottoclassi a seconda del gruppo chimico che li caratterizza, e precisamente in CLORONICOTINILI e THIANICOTINILI

I primi sono caratterizzati dalla presenza nella molecola di un gruppo CLOROPIRIDILE, i secondi da un gruppo CLOROTHIAZOLO.

Nel settore apistico tuttavia le sostanze che possono inquinare l'ambiente alveare sono anche di altra natura. Oltre ai pesticidi utilizzati in agricoltura, possiamo infatti rilevare sostanze che derivano direttamente dalle pratiche apistiche utilizzate per il controllo delle patologie. In questa categoria rientrano principalmente acaricidi per il controllo della varroasi e antibiotici che sebbene non consentiti dalla normativa vigente sono spesso impiegati per il trattamento delle pesti sebbene ad oggi gli unici medicinali ammessi dalla legge per la cura delle api siano soltanto i varrostatici. Per la peste americana e per le altre malattie che colpiscono le api non si conoscono non esistono infatti medicinali regolarmente registrati

Tra gli acaricidi possiamo inoltre distinguere quelli consentiti e quindi regolarmente registrati per l'uso specifico e quelli non consentiti. In alcuni casi possiamo avere una stessa molecola presente in due prodotti differenti ma con dosaggi diversi e che pertanto vengono indicati per usi diversi. È il caso del cumafos principio attivo regolarmente registrato per la lotta alla varroasi nel perizin ma illegalmente utilizzato come asuntol.

I prodotti autorizzati disponibili sul mercato italiano, attivi contro la varroa sono stati così classificati dal Decreto 22 dicembre 2000 che ha nuovamente revisionato e ricatalogato i presidi medico-chirurgici in farmaci veterinari:

Nell'allegato 1 di tale decreto vengono indicati i prodotti per la cui vendita non è necessario l'obbligo di una prescrizione medica e non è previsto né il limite massimo di residui (LMR) né il tempo di sospensione. Questi sono:

Apistan (p.a. Fluvalinate),

ApiLifeVar (p.a.: timolo, essenza di eucalipto, canfora, mentolo)

Bayvarol (p.a. Flumetrina).

Più recentemente, a questi prodotti è stato aggiunto, con Decreto del 03.04.2003 l'**Apiguard**. (p.a. Timolo in gel).

L'**Apivar** (p.a. Amitraz) non figura nell'Allegato 1 in quanto già registrato con Decreto 16.12.1998 come specialità medicinale per uso veterinario.

Nell'Allegato 2 del medesimo Decreto, inoltre, compaiono **Apitol** (p.a. Cimiazolo) e **Perizin** (p.a. Coumafos) per i cui principi attivi sono stati stabiliti limiti provvisori di residui e tempi di sospensione.

Contrariamente a quanto previsto per tutti gli altri prodotti, per l'acquisto e l'utilizzazione di questi due varrostatici è obbligatoria la ricetta veterinaria in triplice copia e la tenuta del registro dei trattamenti rilasciato dall'ASL (il registro non è obbligatorio per chi non provvede alla commercializzazione del miele e per le piccole aziende amatoriali).

Oltre ai principi attivi di natura chimica per la lotta alla varroasi sono ammesse e largamente utilizzate anche sostanze naturali, principalmente oli essenziali come timolo ed eucaliptolo ed acidi organici. I prodotti naturali ammessi dalla normativa comunitaria sono:

- **Acido lattico,**
- **Acido formico,**
- **Canfora,**
- **Eucaliptolo,**
- **Mentolo,**
- **Timolo**

A questi, con Regolamento 546/2004 CE, è stato aggiunto l'**Acido ossalico** la cui efficacia, l'economia e la facilità di preparazione ed uso sono state ampiamente sperimentate (Grillino R., 2004)

Le analisi di laboratorio effettuate sui campioni delle diverse matrici hanno riscontrato la presenza di diverse sostanze perlopiù acaricidi per la lotta alla varroa. In un solo caso è stata rilevata la presenza di un neonicotinoide. I principi attivi ritrovati sono i seguenti:

- Clothianidin
- Coumaphos
- Fluvalinate
- Clorpheninfos
- Acrinatrina

Il Clothianidin è un insetticida appartenente alla classe dei neonicotinoidi tianicotinili utilizzato in agricoltura per la difesa di melo e pero e per la concia delle sementi di mais e barbabietola da zucchero.

Altamente tossico per le api tramite esposizione di tipo acuto (EPA), viene segnalato dalle organizzazioni degli apicoltori italiani come fonte di problemi per l'attività e possibile causa delle ricorrenti stragi di api.

Dal punto di vista legislativo con il Decreto 13 novembre 2006 tale sostanza è stata inclusa nell'allegato 1 del decreto legislativo 17 marzo 1995, n.194.

Attualmente tale p.a. non è ancora stato inserito in un provvedimento di aggiornamento del Decreto 27 agosto 2004 (Longo A., Branca P., 2007)

Nome IUPAC: (E)-1-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-3-methyl-2-nitroguanidine

CAS: 210880-92-5

Formula: C₆H₈CIN₅O₂S

Peso molecolare: 249.7 (*WWW.agronica .it*)

Il clorfenvinfos è un acaricida organofosforato utilizzato in agricoltura nella lotta a taluni acari ed afidi. In particolare la sua attività fitoiatrica si esplica nei confronti di diversi gruppi di insetti tra cui Emitteri (Psille), Lepidotteri (Cavolaia, Nottue, piramidi), Coleotteri (Altiche, Cassidi, Dorifora, Meligete, Punteruoli), Ditteri (Mosche) (istituto sperimentale per la patologia vegetale, 1988). Rappresenta il principio attivo di prodotti quali Birlane®, Supona®, Saprecon® e Steladone®. È una sostanza liposolubile, con un tempo di semivita, periodo in cui dimezza la propria concentrazione, di 36 giorni. Sul piano della tossicità per l'uomo, è stata dimostrata una certa pericolosità per il sistema nervoso. (*Gallina et al. 2008*). Prodotti come il Birlane e il Supona sono stati tutti revocati dal Consiglio europeo. Il pericolo tuttavia persiste a causa delle enormi scorte di magazzino o della possibile illecita reintroduzione da Paesi terzi. (*Grillino R., 2004*)

L'acrinatrina è un norpiretrato che esplica elevata azione contro acari ed afidi oltre ad altri insetti. È il principio attivo dei prodotti commerciali Rufast®, Orytis® ed Ardent®. Agisce per contatto. È liposolubile ed ha un tempo di semivita di 37 giorni. È considerata una sostanza poco tossica per l'uomo ma che può creare disfunzioni al sistema endocrino.

Il Coumaphos Questo fosfororganico è stato registrato in passato per i trattamenti acaricidi in apicoltura e in zootecnia ed è tuttora utilizzato per il controllo della *Varroa*. Questo residuo è da considerarsi proveniente o dai trattamenti acaricidi in quanto il principio attivo è caratterizzato da elevata persistenza nella cera e può essere rilevato anche dopo anni dall'ultimo trattamento.

Il fluvalinate è un aficida piretroide caratterizzato da una elevata selettività nei confronti delle api e degli altri pronubi selvatici presenti nel frutteto. La sua selettività è legata alla particolare struttura di base della molecola che deriva dalla valina, aminoacido naturale presente nelle proteine animali. Agisce per contatto sviluppando un'azione neurotossica a livello del sistema nervoso dell'insetto. Trova impiego per trattamenti precoci in prefioritura. Risulta caratterizzato, oltre che da una buona azione residua, dal fatto di mantenere la sua attività anche a temperature alte. La sua solubilità in acqua e la sua bassa tensione di vapore impediscono che il prodotto venga dilavato nel terreno. E' attivo, oltre gli afidi anche su numerosi altri insetti fitofagi e anche su alcune forme di acari. Data la sua elevata selettività nei confronti delle api, viene utilizzato nella lotta contro *Varroa destructor*, ma dopo anni di uso massiccio si sono segnalati sempre più casi di resistenza dell'acaro. In seguito, l'impiego del prodotto fu sospeso per 5 anni, durante i quali pare che abbia riacquisito efficacia. Ora è in uso.

L'uso di sostanze quali il clorfenvinfos e l'acrinatrina nella lotta alla varroasi è in contrasto con la legislazione nazionale e comunitaria. Infatti, non esistendo farmaci registrati per l'apicoltura a base di questi principi attivi, il loro utilizzo risulta del tutto illecito. Inoltre è bene ricordare che in Italia tutte le autorizzazioni alla commercializzazione dei prodotti aventi come principio attivo il clorfenvinfos sono state ritirate alla fine del 2003 (Reg. (CE) 2076/2002). La somministrazione di questi p.a. avviene il più delle volte facendo assorbire, su stecche di legno o cartone, il prodotto commerciale opportunamente diluito. Tali stecche imbevute vengono posizionate in corrispondenza della porticina di ingresso dell'alveare o addirittura all'interno dell'arnia esplicando la loro azione per contatto diretto o lenta evaporazione del principio attivo. L'utilizzo di questi principi attivi porta con se molti rischi. Il primo è di carattere sanitario: un dosaggio sbagliato può essere pericoloso sia per le api che per gli stessi operatori e vista l'applicazione "fai da te" tale rischio è molto elevato. Infatti, non vi sono studi accurati sulle quantità da utilizzare, le modalità ed i tempi di applicazione di questi prodotti che a determinate dosi possono risultare letali per le api (rischio acuto). Senza considerare il fatto che non ci sono nemmeno studi sugli effetti a bassi dosaggi che tali sostanze potrebbero avere (rischio cronico). Un secondo rischio è dovuto all'inquinamento di tutto ciò che è interno all'arnia: in particolare alcuni prodotti dell'alveare possono assorbire i principi attivi e conservarli a lungo. Il ritrovamento di residui di clorfenvinfos o acrinatrina o di qualsiasi altro principio attivo non autorizzato nel miele o negli altri prodotti alimentare dell'apiario, nel corso di un controllo ufficiale, fa scattare automaticamente la denuncia alle autorità competenti ed il ritiro immediato dal mercato del prodotto stesso. Un problema ancora maggiore può risultare l'inquinamento della cera, in cui queste sostanze si sciolgono benissimo. Infatti, la cera, per le sue caratteristiche di inerzia chimica e capacità conservativa, tende ad accumulare grandi quantità di principi attivi pesticidi, rallentandone oltretutto la degradazione. È logico immaginare che una cera molto inquinata possa rilasciare quantità più o meno basse di principio attivo al miele, alla gelatina reale ed al polline. (*Gallina et al. 2008*)

4.2. NOSEMIASI

Il Nosema sp. è un protozoo appartenente alla classe Microsporida che comprende un ampio gruppo di parassiti intracellulari obbligati molto diffusi (Mutinelli et. al.2007). Il genere Nosema comprende più di 150 specie che generalmente hanno come ospiti principali gli invertebrati. In particolare Nosema viene riscontrato in lepidotteri e imenotteri. In questi ultimi rappresenta l'agente della nosemiasi che colpisce *Apis mellifera*. Attualmente le specie che colpiscono in genere *Apis* sono due, *N. apis* e *N. ceranae*.

Nosema apis è stato descritto oltre un secolo fa come agente della “diarrea” nella specie *Apis mellifera*. La patologia interessa le api adulte e determina una grave infiammazione del tessuto mesointestinale, che causa la dissenteria. Le spore di *N. apis* (fig. 7) vengono assunte attraverso la nutrizione e appena ingerite, germinano e penetrano all'interno delle cellule dell'epitelio mesointestinale dove completano il loro ciclo di sviluppo con la formazione di nuove spore che vengono poi eliminate con le feci. L'infezione si diffonde rapidamente all'interno della colonia e tra le famiglie di un apiario ma generalmente non causa grosse perdite poiché le famiglie riescono a gestire il problema (Nardi et. al., 1982). Sulla base di quanto emerso dai dati dello studio tale patogeno non sembra più essere presente negli apiari esaminati poiché non viene ritrovato in nessuno dei campioni analizzati.

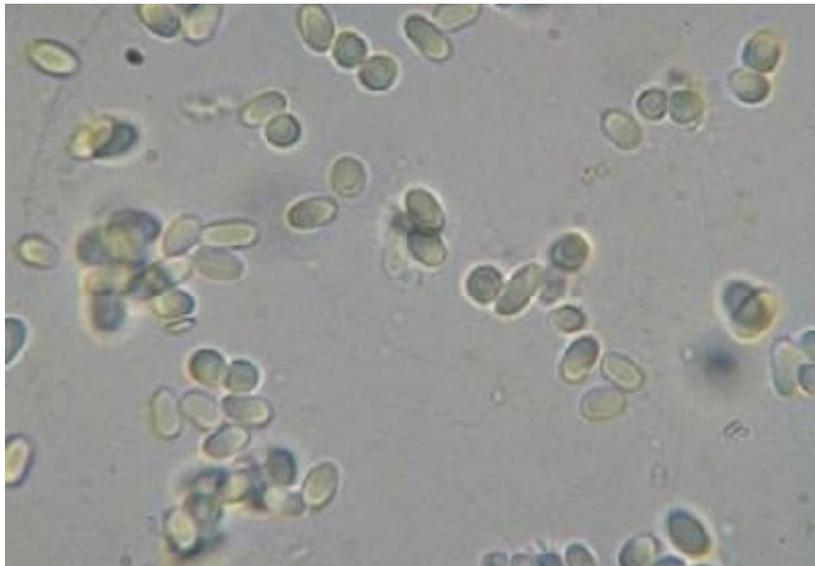


Figura. 7. Spore di *Nosema sp.* al microscopio ottico (40X)

Nosema ceranae. Negli ultimi anni una nuova specie di Nosema inizialmente riscontrata solo in *Apis cerana*, è stata ritrovata anche in campioni di *A.mellifera*. Molti studi sono stati condotti per valutare l'infettività di *N.ceranae* anche su *A.mellifera* (Fries, 1996; Huang et

al., 2006; Higes et al., 2006). A differenza del *N.apis*, il *N.ceranae*, non causa sintomi visibili e riconoscibili ma spesso determina un generale indebolimento della famiglia che nei casi di infestazione più elevata può anche andare incontro a fenomeni improvvisi di spopolamento. Per tale motivo il *N. ceranae* è stato ritenuto una delle probabili cause della sindrome da spopolamento degli alveari (CCD). Oggi quello a cui si assiste è una quasi totale sostituzione del *N.apis* ad opera di *N.ceranae* che viene riscontrato nella totalità dei campioni esaminati, mentre il *N.apis* attualmente è presente solo in zone marginali del nord Italia.

4.3. VIROSI

La maggior parte dei virus che possono infettare le api causano infezioni latenti o in apparenza. Solamente due, il virus della covata a sacco (SCB) e il virus della paralisi cronica (CPV), possono essere diagnosticati facilmente sulla base dei sintomi caratteristici indotti. Diversi fattori di stress, biotici o abiotici, possono innescare fenomeni di intensa replicazione virale e di conseguenza, la transizione a malattia conclamata. Spesso le infezioni virali hanno un comportamento insidioso, con danni lievi o protratti nel tempo, che talvolta rimangono inosservati e determinano per lo più un generale “accorciamento della vita” delle api, ma in condizioni di non stress il loro impatto può essere trascurabile o transitorio. Nel corso dei due anni di studio, negli apiari esaminati, sono stati rilevati cinque diversi virus di cui, di seguito, si riporta una breve descrizione

Virus delle ali deformate (DWV) E' uno dei virus riscontrato con maggiore frequenza e risulta molto diffuso su tutto il territorio nazionale. Può causare infezioni latenti ma in generale determina malformazioni delle ali e può provocare anche la morte della covata nelle cellette. Molto spesso associato ad elevate infestazioni da *Varroa*, che ne consente la rapida trasmissione tra gli individui della colonia. Appartiene alla tipologia di virus con genoma ad RNA positivo, di 10100 nt. Il contagio avviene principalmente ad opera dell'acaro che succhiando l'emolinfa dell'insetto adulto diffonde l'infezione. Probabilmente gli adulti infetti contagiano le larve attraverso la nutrizione. Lo sviluppo è piuttosto lento e le pupe infette riescono quasi sempre ad emergere dalle celle ma con le ali rovinare o poco sviluppate e sono presto soggette a morte. (dossier patologia unapi)



Figura.8. Soggetto con evidenti sintomi del virus delle ali deformi (Foto Pennacchio F.)

Virus della cella reale nera (BQCV) Come indicato dal nome, questo virus colpisce le pupe delle regine, raramente di operaia, che muoiono e diventano nere; anche le pareti della cella reale assumono questo colore. Nei primi stadi della malattia le larve infette hanno una sintomatologia simile a quella della covata a sacco. Questa patologia si nota più facilmente negli allevamenti di regine dove si trovano molte celle in colonie con poca covata; questo capita più facilmente all'inizio della stagione ed è spesso in associazione con la nosemiasi di cui finisce per amplificare gli effetti portando ad una riduzione della longevità e ad una elevata mortalità invernale. Contrariamente al virus della covata a sacco, questo non si moltiplica molto velocemente quando viene ingerito dalle larve o dalle nutrici, ma si trova facilmente nelle api che bottinano nei campi. Questa virosi si controlla attraverso le pratiche comunemente indicate per la lotta alla nosemiasi.

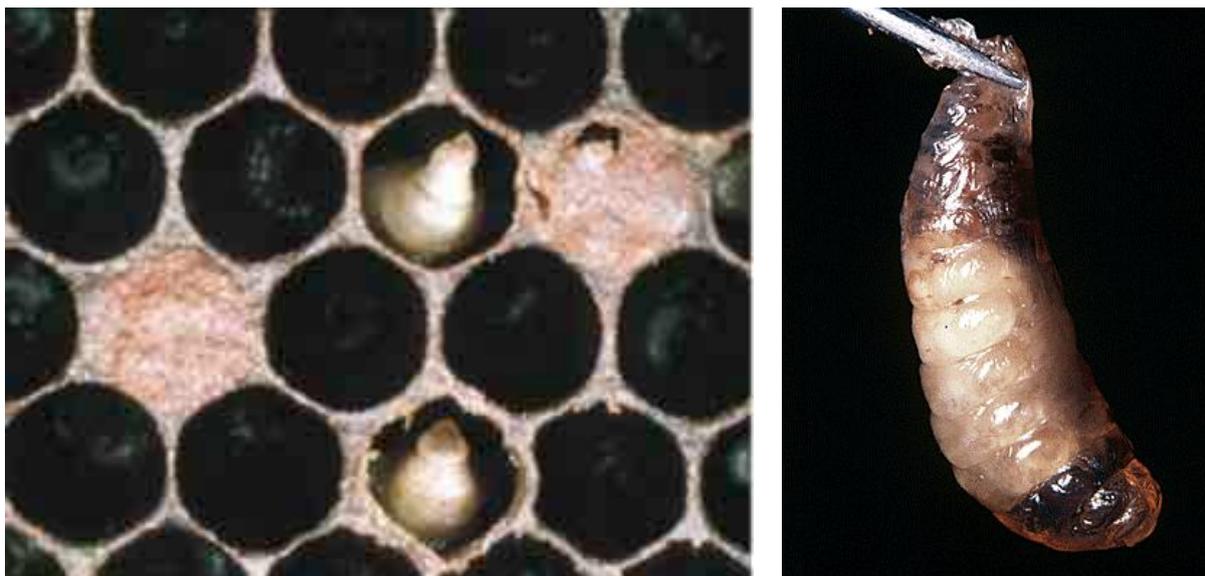


Figura 9. Larve di *A-mellifera* colpite dal virus della covata a sacco (foto Unapi).

Virus della covata a sacco (SBV): Questo virus causa una patologia limitata alla covata poiché negli individui adulti il virus si moltiplica senza causare danni. Le larve di circa due giorni di età sembrano essere quelle più suscettibili all'infezione. Le larve colpite dal virus (fig. 9) falliscono la metamorfosi e muoiono velocemente dopo l'opercolatura, determinando un accumulo di liquido all'interno della cuticola. Il colore delle larve ammalate cambia e, da bianche perlacee, si fanno dapprima gialle e, dopo la morte, diventano marroni per seccare infine formando una scaglia a forma di gondola. I sintomi di questa patologia sono molto specifici e facilmente riconoscibili. Il contagio avviene attraverso la nutrizione e una volta penetrato, il virus della covata a sacco si moltiplica nel corpo delle giovani larve, fino a causarne la morte. Ogni larva infetta contiene circa un milligrammo di virus, sufficiente ad infettare le larve di mille colonie. In circostanze naturali, l'infezione tende a rimanere debole ed a risolversi spontaneamente nel corso dell'estate. Le api adulte, infatti, riconoscono ed eliminano velocemente parte delle larve colpite. Il virus inoltre perde rapidamente la sua infettività. L'infezione si mantiene all'interno delle colonie, di anno in anno, attraverso le api adulte, in cui il virus si moltiplica senza causare danni. Le giovani api sono le più suscettibili perché si infettano durante le operazioni di pulizia delle larve uccise dal virus. Il patogeno si moltiplica poi nelle ghiandole ipofaringee e, con la secrezione della gelatina reale, l'infezione si propaga alle larve, completando il ciclo del virus (*Nardi et. al., 1982*). Tuttavia, molte volte il ciclo non arriva a compimento, perché le api adulte infette cambiano mansioni all'interno dell'alveare e, in questo caso, cessando di nutrire la covata, le ghiandole ipofaringee degenerano e queste api non sono più in grado di trasmettere la malattia. Frequentemente la diffusione avviene attraverso il polline che riceve i virus attraverso le secrezioni ghiandolari,

durante la raccolta. Se il polline infetto è utilizzato rapidamente può contagiare parecchie larve prima di perdere la propria carica infettiva. La trasmissione del virus avviene più facilmente nei periodi in cui la divisione del lavoro all'interno della colonia è meno sviluppata; ovvero, generalmente, all'inizio della stagione e durante i periodi di carestia. La malattia non è tuttavia molto infettiva perché le api adulte colpite dal virus (esattamente come accade quando le nutrici sono anestetizzate con l'anidride carbonica) perdono l'appetito per il polline e cambiano comportamento diventando bottinatrici. Inoltre il metabolismo delle api infette diminuisce, un po' come capita nelle giovani operaie che sono state completamente private del polline: la loro vita risulta accorciata e molte non sopravvivono all'inverno. Curioso il fatto che molte di queste api infette si trovano morte poco lontano dal glomere. Ricerche effettuate in paesi anglosassoni hanno trovato il virus in colonie senza segni apparenti, in percentuali che vanno dal 30 al 90% delle colonie esaminate. Molte volte la patologia passa inosservata perché le api rimuovono velocemente le larve. In condizioni normali la malattia ha un andamento benigno e si risolve spontaneamente.

Virus della paralisi cronica: Questo virus non è risultato essere particolarmente diffuso negli apiari oggetto di studio, essendo presente solo nel 13% dei campioni del secondo anno di indagine mentre non è stato rilevato nel corso del primo anno. La patologia può presentarsi secondo due diverse sindromi ben distinte. Nel primo caso, le api colpite presentano un anomalo tremolio del corpo e delle ali, sono incapaci di volare e camminano in modo disordinato davanti gli alveari, raggruppandosi spesso a decine sui fili d'erba, dove poi muoiono. Molte volte hanno l'addome gonfio e le ali presentano la classica disposizione a "K". L'addome gonfio è causato dal liquido che si accumula nella sacca melaria. Questo spesso causa dissenteria e le api colpite muoiono nel giro di pochi giorni. Le colonie fortemente affette spesso collassano e nell'ispezione della colonia si trova solo la regina, circondata da poche centinaia di api (*Nardi et. al., 1982*). . Questa sindrome corrisponde alla malattia un tempo conosciuta come mal della foresta, perché si riscontrava quando gli apiari venivano portati a raccogliere la melata. Nel secondo caso, un tempo chiamata mal nero, le api infette non perdono la capacità di volare ma restano prive di gran parte della peluria e quindi appaiono nere e più piccole del normale. Dopo qualche giorno, anche in questo caso, perdono la capacità di volare, sono soggette a tremolio e vanno incontro alla morte. Entrambe le sindromi possono coesistere in una colonia, ma di solito una è prevalente. L'espressione di una delle due sintomatologia rispetto all'altra sarebbe dovuta prevalentemente al diverso genotipo delle api colpite. Occasionalmente in famiglie fortemente colpite anche le pupe

possono restare uccise. Per infettare un'ape sono necessarie parecchie milioni di particelle, ma, se iniettate direttamente nell'emolinfa, ne bastano anche solo un centinaio. In natura, la trasmissione avviene attraverso i peli rotti. Va peraltro detto che api sane, in colonie sane, se sottoposte a test sierologici, a volte risultano positive. Non esiste un periodo particolare dell'anno in cui si manifesta la malattia, tuttavia condizioni avverse come maltempo, carestia di raccolto e alcune pratiche apistiche possono contribuire a determinarne lo sviluppo.

Virus della paralisi acuta: anche questo virus non è risultato particolarmente diffuso nel corso del primo anno di studio, essendo presente solo nel 5% dei campioni, mentre mostra una consistente presenza durante il secondo anno poiché viene ritrovato nel 63% dei campioni. Durante la stagione attiva non è difficili ritrovarlo comunemente in famiglie apparentemente sane, senza causare danni alle colonie poiché, di solito si va a dislocare in tessuti non essenziali per la vita delle api. Tuttavia, dopo la diffusione della varroa, ha causato notevoli danni sia in Europa che negli Stati Uniti. Apparentemente, l'acaro attiva il virus o, più semplicemente, lo trasmette nei tessuti nei momenti di suzione ed il virus entra in circolo nell'emolinfa dell'ape. Le api adulte, in cui il virus è stato attivato o iniettato, prima di morire infettano le giovani larve, probabilmente attraverso la secrezione della gelatina dalle ghiandole ipofaringee. Le larve nutrite con una carica sufficiente di virus muoiono prima che la cella sia opercolata, altre volte sfarfallano come se fossero sane.

5. SCOPI DELLA RICERCA

5.1. MONITORAGGIO DELLE MORTALITÀ

Lo scopo principale del presente studio era quello di ottenere dati sullo stato generale della popolazione apistica regionale al fine di valutare gli eventuali effetti della Sindrome da Spopolamento degli Alveari in ambito locale. Questo ha consentito di conoscere lo stato di salute generale degli apiari monitorati e valutare di conseguenza la presenza e l'entità del fenomeno in Sicilia. Obiettivo prioritario era quello di raccogliere dati che potessero anche contribuire a comprendere le possibili cause di tale problematica. In particolare ci si è proposti di raccogliere dati sul contesto ambientale in cui si è operato, sulle tipologie vegetazionali in cui sono inseriti gli apiari, sia relativamente alla flora spontanea che alle principali colture agrarie. Ci sé proposti inoltre, potendo attingere direttamente ad informazioni sullo stato di salute degli apiari monitorati di ottenere dati anche sulle pratiche apistiche con cui gli stessi vengono gestiti e conseguentemente sul livello di preparazione professionale degli apicoltori stessi. La creazione di un modulo di rilievo stabilmente presente sul territorio ha consentito inoltre non solo la creazione di una rete di contatti in abito locale ma ha consentito la circolazione dell'informazione all'interno del mondo apistico generando positivi risvolti anche in un contesto sino ad oggi piuttosto chiuso ed isolato.

In ultima analisi scopo dello studio era anche quello di inserire la realtà regionale nel contesto nazionale e creare una rete di contatti con le istituzioni che operano nel settore della ricerca applicata all'apicoltura così da garantire visibilità e riconoscimento anche al comparto apistico regionale.

5.2. VERIFICA DEL GRADO DI IBRIDAZIONE

Lo scopo del presente studio è quello di valutare, a distanza di diversi anni dall'ultima indagine effettuata, il grado di ibridazione delle api siciliane. Secondo quanto rilevato da precedenti studi (*Badino et al., 1985; Biondo et al., 1991; Marinaro et al. 1999*) il patrimonio genetico della sottospecie *Apis mellifera siciliana* risulta ormai inesorabilmente contaminato a causa dell'immissione di razze alloctone utilizzate in apicoltura, principalmente la sottospecie *Apis mellifera ligustica*. Già negli anni ottanta le indagini condotte mostravano un elevato livello di ibridazione delle api siciliane principalmente nell'area orientale dell'isola. Nella zona occidentale si riscontrava invece un minore livello di ibridazione testimoniato da più alti valori delle frequenze degli alleli F per l'MHD ed S per l'esterasi. In alcuni casi sono anche stati rinvenuti ceppi relitti afferibili alla sottospecie siciliana che sono subito stati isolati sulle isole Eolie per salvaguardarne la purezza e isolarli da eventuali contaminazioni. Negli ultimi

anni tuttavia la maggior parte degli apicoltori presenti nella zona occidentale dell'isola (province di Palermo-trapani-agrigento) riconoscendo su base empirica la migliore qualità della sottospecie autoctona hanno cominciato a privilegiare all'interno dei loro apiari ceppi che si avvicinassero alla razza siciliana effettuando una selezione sulla base di parametri morfologici e comportamentali quali il colore e la docilità. Questo ha determinato, almeno macroscopicamente, un generale inscurimento delle api presenti in queste zone. Per tale motivo si è pensato di approfondire l'indagine e verificare se anche dal punto di vista enzimatico si riscontra un incremento delle frequenze alleliche tipiche della sottospecie siciliana. Contestualmente si è pensato di inserire nello studio la sottospecie africana *A.m.intermissa* per verificare, visto l'alto grado di parentela tra le due (*Frank P. et al., 2000*) che l'allele s dell'esterasi non fosse presente anche in quest'ultima e potesse quindi continuare ad essere utilizzato come marcatore specifico della ape siciliana.

5.3. PROVA DI COMPARAZIONE TRA LE DUE SOTTOSPECIE *A.m.siciliana* e *A.m.ligustica*

Lo studio si propone di valutare alcuni parametri indicatori del benessere delle api in condizioni di normale gestione degli apiari. In particolare sono stati indagati i fattori nutrizionali, le influenze dei diversi patogeni, responsabili di effetti sinergici. In vivo, è stato valutato l'impatto dei diversi metodi di gestione delle colonie sulle variazioni interne dei parametri microclimatici e l'influenza di tali variazioni sullo sviluppo dei patogeni nelle colonie. Gli interventi climatici e quelli umani potrebbero infatti da un lato favorire la riproduzione delle forme virali responsabili del collasso delle colonie, e dall'altro contribuire a creare delle situazioni di disequilibrio alle colonie, in un momento delicato come la preparazione all'inverno.

Da pochi decenni, presso alcune aziende, è diventata pratica comune l'utilizzo di regine di origine geografica non autoctona, senza tener conto del fatto che popolazioni locali potrebbero essere maggiormente in grado di tollerare situazioni avverse. Per questo motivo, era importante valutare l'esistenza di interazioni tra genotipo delle api allevate e ambiente, ed individuare le caratteristiche di tolleranza agli stress ambientali delle popolazioni autoctone. Inoltre, alla luce dei cambiamenti climatici in atto, si sono ottenute informazioni sulle possibili modalità di reazione delle colonie a situazioni climatiche caratterizzate da temperature invernali più elevate e da prolungati periodi di siccità, osservabili in sottospecie che si sono evolute in condizioni naturali di questo tipo, quali la razza siciliana *A. m. siciliana*. Lo scopo di questo studio è di indagare se esistono adattamenti all'ambiente da parte di popolazioni di *Apis mellifera*, e se questi adattamenti hanno un effetto sulla sopravvivenza e vitalità delle colonie

6. METODOLOGIA

6.1 MONITORAGGIO DELLA MORTALITÀ

Per il controllo della mortalità sul territorio regionale secondo quanto previsto dal progetto nazionale Apenet per il monitoraggio dei fenomeni di mortalità e scomparsa delle api è stato allestito un modulo di rilevamento costituito da cinque apiari comprendente dieci famiglie ciascuno. Per tale prova sono stati scelti apiari preesistenti, tre dei quali siti sul territorio della provincia di Palermo e due in provincia di Trapani. In tabella 1 il dettaglio e le caratteristiche di ciascun apiario. La dislocazione degli apiari sul territorio è mostrata in figura 10. Lo studio ha avuto una durata complessiva di due anni con inizio nella primavera 2009 e termine nell'estate 2011. Il protocollo prevedeva quattro controlli per anno in cui valutare lo stato sanitario, la consistenza della famiglia e la mortalità. Per tali rilievi sono stati utilizzati moduli

ID	X	Y	LOCALITA'	PROV.	USO DEL SUOLO (%)	VEGETAZIONE	DESCRIZIONE
SCL1-1	407203	4209018	Lascari	PA	90 Agricolo 10 Naturale	oleo-carrubeto	Azienda agricola a conduzione biologica
SCL1-2	307644	4166743	Castelvetrano	TP	agricolo	Uliveto agrumi viti sulla rosmarino incolto con prevalenza di cardus	Azienda agricola
SCL1-3	384174	4188777	Montemaggiore Belsito	PA	agricolo	Eucaliptus agrumi seminativo a sulla veccia e frumento	Azienda agricola
SCL1-4	301564	4221345	San vito lo capo	TP	90 Agricolo 10 Naturale	Uliveto+incolto con prevalenza di cardus	Terreno privato
SCL1-5	340000	4224000	M.Pellegrino	PA	Naturale	Eucaliptus Pinus sp. macchia mediterranea incolto	Riserva Naturale

Tabella 1. Elenco delle postazioni di monitoraggio.

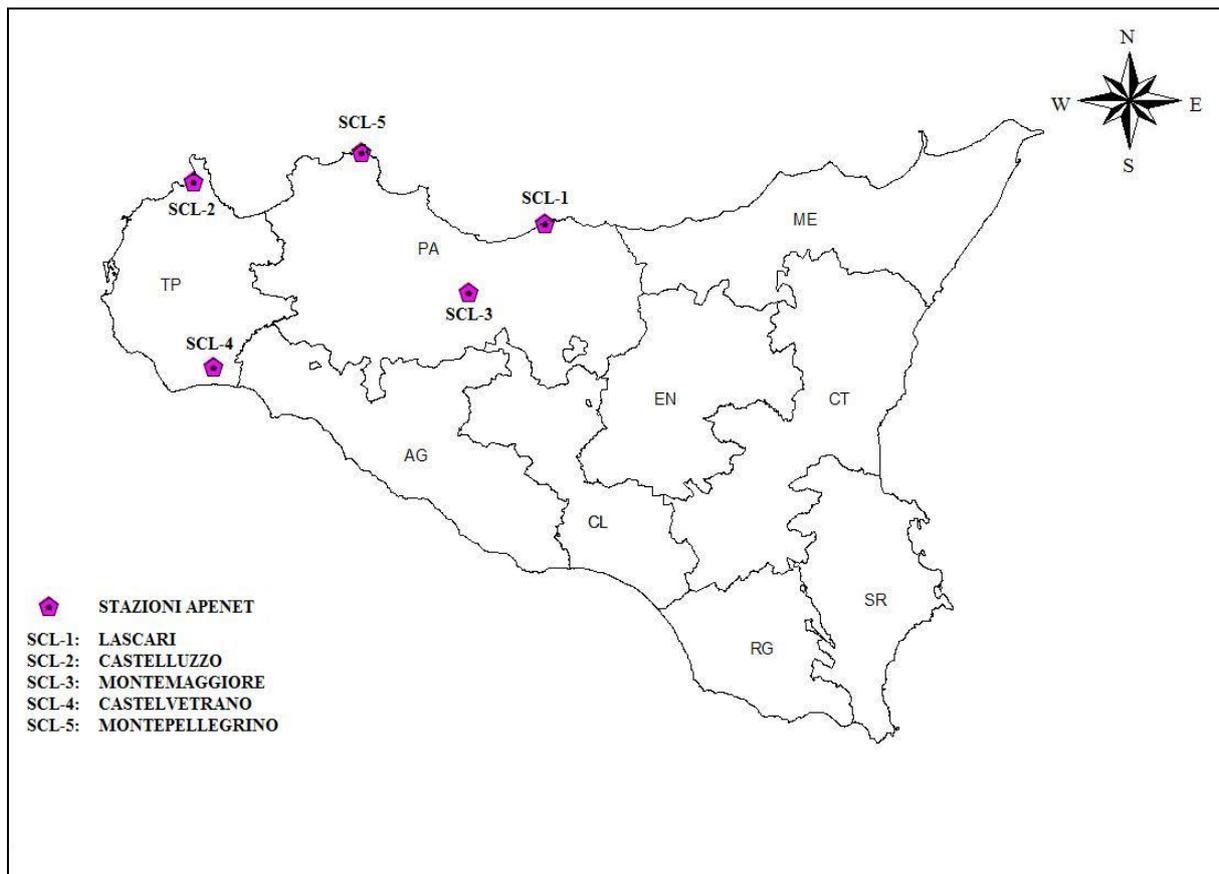


Figura 10. Localizzazione delle 5 postazioni del modulo di rilevamento SCL-1

mostrati nelle figure 12, 13 e 14. Per il rilievo della mortalità sono state predisposte appropriate trappole under-basket delle dimensioni di 50x50 cm da posizionare sotto ciascuna arnia. Tali trappole consentono di evitare la dispersione delle api morte che si accumulano sotto l'arnia permettendo così di effettuarne il conteggio.

Per ciascun modulo sono stati preventivamente annotati dati su:

1. Tipo di zona (pianura, collina, montagna);
2. Destinazione d'uso del territorio (agricoltura, bosco, industria, urbanizzazione);
3. Principali coltivazioni dell'area;
4. Dati meteorologici (temperature, precipitazioni, ecc.).

Durante il controllo periodico sono stati annotati dati relativi alle fioriture presenti sia spontanee che coltivate al fine di caratterizzare la zona anche dal punto di vista ambientale e le condizioni atmosferiche al momento del controllo.

Per ogni alveare sono stati valutati i seguenti parametri:

1. Forza della famiglia (numero di api adulte, estensione della covata opercolata e non, scorte età della regina, presenza di fuchi);

2. Osservazioni sulla famiglia (mortalità, attività di volo, presenza di api con pallottole di polline, presenza di varroa, sintomi di peste americana ed euro-pea, sintomi evidenti di altre patologie, comportamenti anomali, ecc.)
3. Indicazione degli interventi sanitari e delle tecniche apistiche adottate;
4. Prelievo di polline, ed eventualmente di api morte (analisi agrofarmaci);
4. Prelievo di api vive (analisi virologiche, nosema).

La consistenza della famiglia è stata effettuata valutando la percentuale di api, uova, covata miele opercolato, miele non opercolato e polline presente su ciascun telaino, utilizzando le classi di abbondanza riportate nelle tabella 2 e 3, secondo lo schema mostrato in figura 11. I dati rilevati in campo e annotati sulle schede sono stati successivamente inseriti nel software predisposto per l'elaborazione e la creazione del database (fig.15, 16, 17)

CLASSE	% DI COPERTURA DEL TELAINO
3 Abbondante	> 70%
2 Medio	Dal 30% al 70%
1 Scarso	Sino al 30%
0 Assente	Non presente

Tabella 2. Classi di abbondanza per la valutazione della quantità di api, covata e miele.

CLASSE	% DI COPERTURA DEL TELAINO
3 Abbondante	> 15%
2 Medio	Sino al 15%
1 Scarso	Qualche celletta
0 Assente	Non presente

Tabella 3. Classi di abbondanza per la valutazione della quantità di uova e polline

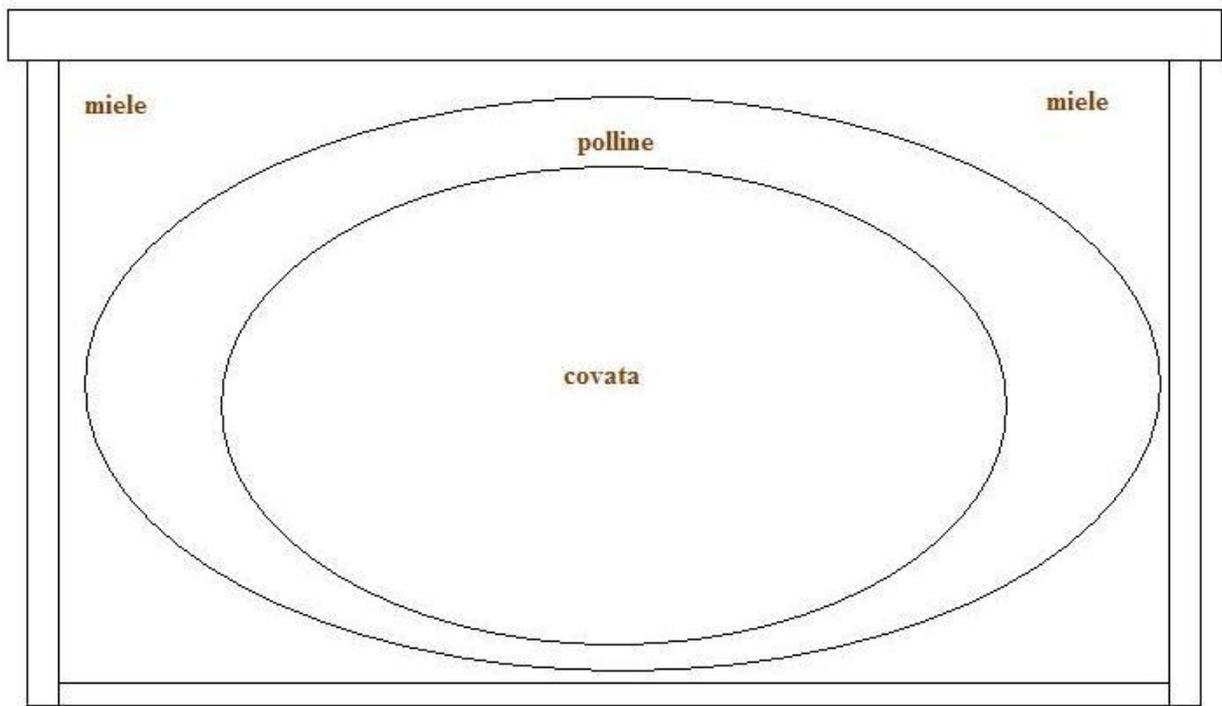


Figura 11. Rappresentazione schematica della posizione delle diverse matrici all'interno di un telaino da nido.

SCHEDA APENET

MODULO APIARIO APICOLTORE

LOCALITA' INDIRIZZO

COORDINATE GIS N° TOTALE ALVEARI DELL'APIARIO

TIPO DI ZONA: PIANURA COLLINARE MONTAGNA ZONA UMIDA

TERRITORIO (in %): AGRICOLO INDUSTRIALE URBANO NATURALE

COLTURE (in %): ORTICOLE FRUTTICOLE FORAGGIERE CEREALICOLE
 SERRE FLORICOLE SILVICOLE ALTRO

EPISODI DI MORTALITA'/SPOPOLAMENTI NEGLI ANNI PRECEDENTI: SI NO

Se SI: ANNO PERIODO ALVEARI COINVOLTI (in %)

CAUSE PRESUNTE O STABILITE

DATA/ORA CONTROLLO N° (1, 2, 3, 4, extra)

OSSERVAZIONI (es. condizioni meteo durante il controllo)

OSSERVAZIONI METEOROLOGICHE DEL PERIODO (nel 15 giorni antecedenti la data del controllo)

Normale (giornate di bel tempo intervallate da giornate con pioggia)
 Piovoso (molte giornate caratterizzate da pioggia e cielo nuvoloso)
 Siccitoso (molte settimane caratterizzate da assenza di pioggia)
 Freddo (molte giornate con basse temperature che inibivano il volo)
 Caldo afoso (molte giornate di alte temperature, presenza di 'barba')

OSSERVAZIONI AGRONOMICHE E VEGETAZIONALI DELLA ZONA

Pratiche agronomiche del periodo (nel 15 giorni antecedenti la data del controllo)

Coltura	<input type="text"/>	Pratica	<input type="text"/>	Trattamenti	<input type="text"/>
Coltura	<input type="text"/>	Pratica	<input type="text"/>	Trattamenti	<input type="text"/>
Coltura	<input type="text"/>	Pratica	<input type="text"/>	Trattamenti	<input type="text"/>
Coltura	<input type="text"/>	Pratica	<input type="text"/>	Trattamenti	<input type="text"/>
Coltura	<input type="text"/>	Pratica	<input type="text"/>	Trattamenti	<input type="text"/>

Specificare i principi attivi dei trattamenti (se conosciuti)

Principali specie botaniche (coltivate e/o spontanee) in FIORE presenti

Specie	Fenofase	Periodo
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Presenza di melata Specie botanica

Figura.12. Scheda relativa al modulo di rilevamento

MODULO		APIARIO		DATA/ORA			
ALVEARE N°		MORTALITA' *		Recente	<input type="checkbox"/>	Non recente	<input type="checkbox"/>
GESTIONE SANITARIA							
Ultimi trattamenti eseguiti:							
Data	Avversità	Intervento effettuato	Dose e modalità				
Ultima alimentazione fornita		Periodo					
OSSERVAZIONI SUL COMPORTEMENTO							
Rigurglio del contenuto della borsa melaria	<input type="checkbox"/>	Incapacità al volo	<input type="checkbox"/>	Maggiore aggressività	<input type="checkbox"/>		
Movimenti scoordinati (1)	<input type="checkbox"/>	Disorientamento (2)	<input type="checkbox"/>	Paralisi alle ali e/o agli arti	<input type="checkbox"/>		
Altro (specificare)							
ATTIVITA' DI VOLO *	<input type="checkbox"/>	BOTTINATRICI CON POLLINE *	<input type="checkbox"/>				
FORZA DELLA FAMIGLIA (metodo dei sest)							
	API	COVATA	UOVA	POLLINE	MIELE**	STATO SANITARIO	
Telaino 1						PESTE AMERICANA	
Telaino 2						<input type="checkbox"/>	
Telaino 3						PESTE EUROPEA	
Telaino 4						<input type="checkbox"/>	
Telaino 5						VIROSI	
Telaino 6						<input type="checkbox"/>	
Telaino 7						ACARIOSI	
Telaino 8						<input type="checkbox"/>	
Telaino 9						NOSEMIASI	
Telaino 10						<input type="checkbox"/>	
N° DI MELARI	<input type="checkbox"/>	ETA' REGINA	<input type="checkbox"/>			AVVELENAMENTO	
						<input type="checkbox"/>	
ALVEARE N°		MORTALITA' *		Recente	<input type="checkbox"/>	Non recente	<input type="checkbox"/>
GESTIONE SANITARIA							
Ultimi trattamenti eseguiti:							
Data	Avversità	Intervento effettuato	Dose e modalità				
Ultima alimentazione fornita		Periodo					
OSSERVAZIONI SUL COMPORTEMENTO							
Rigurglio del contenuto della borsa melaria	<input type="checkbox"/>	Incapacità al volo	<input type="checkbox"/>	Maggiore aggressività	<input type="checkbox"/>		
Movimenti scoordinati (1)	<input type="checkbox"/>	Disorientamento (2)	<input type="checkbox"/>	Paralisi alle ali e/o agli arti	<input type="checkbox"/>		
Altro (specificare)							
ATTIVITA' DI VOLO *	<input type="checkbox"/>	BOTTINATRICI CON POLLINE *	<input type="checkbox"/>				
FORZA DELLA FAMIGLIA (metodo dei sest)							
	API	COVATA	UOVA	POLLINE	MIELE**	STATO SANITARIO	
Telaino 1						PESTE AMERICANA	
Telaino 2						<input type="checkbox"/>	
Telaino 3						PESTE EUROPEA	
Telaino 4						<input type="checkbox"/>	
Telaino 5						VIROSI	
Telaino 6						<input type="checkbox"/>	
Telaino 7						ACARIOSI	
Telaino 8						<input type="checkbox"/>	
Telaino 9						NOSEMIASI	
Telaino 10						<input type="checkbox"/>	
N° DI MELARI	<input type="checkbox"/>	ETA' REGINA	<input type="checkbox"/>			AVVELENAMENTO	
						<input type="checkbox"/>	
* Indicare con: ++ = abbondante; + = medio/a; - = scarsa/o assente							
** Indicare: opercolato; non opercolato; no							
(1) Es. spasmi nervosi, api saltellanti, api che girano su se stesse; (2) Es. api incapaci di rientrare nell'alveare							

Figura 13. Scheda per l'inserimento dei dati relativi alle singole colonie dell'apiario

CAMPIONAMENTI														
MODULO	<input type="text"/>	APIARIO	<input type="text"/>	DATA/ORA	<input type="text"/>									
ANALISI DI ROUTINE (Da effettuare prelevando una parte del campione da tutti i 10 alveari)														
<i>API VIVE</i>														
ANALISI VIROLOGICHE	<input type="checkbox"/>											CODICE	<input type="text"/>	
ANALISI NOSEMA	<input type="checkbox"/>											CODICE	<input type="text"/>	
<i>POLLINE DAL FAVO</i>														
ANALISI RESIDUI AGROFARMACI	<input type="checkbox"/>											CODICE	<input type="text"/>	
ANALISI PALINOLOGICHE	<input type="checkbox"/>											CODICE	<input type="text"/>	
ANALISI STRAORDINARIE (Da effettuare solo in caso di necessità prelevando campioni su uno o più alveari)														
MATRICE	<input type="text"/>	APIARIO	ALV. 1	ALV. 2	ALV. 3	ALV. 4	ALV. 5	ALV. 6	ALV. 7	ALV. 8	ALV. 9	ALV. 10		
ANALISI *	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	CODICE	<input type="text"/>										
ANALISI *	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	CODICE	<input type="text"/>										
MATRICE	<input type="text"/>	APIARIO	ALV. 1	ALV. 2	ALV. 3	ALV. 4	ALV. 5	ALV. 6	ALV. 7	ALV. 8	ALV. 9	ALV. 10		
ANALISI *	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	CODICE	<input type="text"/>										
ANALISI *	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	CODICE	<input type="text"/>										
MATRICE	<input type="text"/>	APIARIO	ALV. 1	ALV. 2	ALV. 3	ALV. 4	ALV. 5	ALV. 6	ALV. 7	ALV. 8	ALV. 9	ALV. 10		
ANALISI *	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	CODICE	<input type="text"/>										
ANALISI *	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	CODICE	<input type="text"/>										
MATRICE	<input type="text"/>	APIARIO	ALV. 1	ALV. 2	ALV. 3	ALV. 4	ALV. 5	ALV. 6	ALV. 7	ALV. 8	ALV. 9	ALV. 10		
ANALISI *	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	CODICE	<input type="text"/>										
ANALISI *	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	CODICE	<input type="text"/>										
ATTENZIONE: Indicare con una croce nel riquadro corrispondente da quali alveari è stato prelevato il campione rispetto al tipo di analisi da effettuare. Il codice del campione verrà fornito automaticamente dal software durante l'inserimento dei dati e dovrà essere riportato su questo modulo come promemoria oltre che sul campione. In campo si suggerisce di utilizzare come codice temporaneo le indicazioni relativi all'apiario (o all'alveare), alla data, all'analisi da effettuare e alla matrice.														
<small>* Le analisi possibili sono: virologiche, palinologiche, chimiche (residui degli agrofarmaci), per la ricerca del nosema e per la ricerca della peste</small>														

Figura14. Scheda per i dati relativi ai campioni prelevati

Durante i controlli sono stati effettuati prelievi di campioni di api, cera e polline da sottoporre alle analisi per la ricerca di patogeni e pesticidi. In tabella 4 sono riportati i pesticidi ricercati. Le patologie ricercate sono le seguenti:

- *Nosema apis*
- *Nosema ceranae*
- Virus della covata a sacco (SBV)
- Virus della cella reale nera (BQCV)
- Virus delle ali deformi (DWV)
- Virus della paralisi acuta (ABPV)
- Virus della paralisi cronica (CBPV)
- Virus israeliano della paralisi acuta (IAPV)
- Virus Iridescente (AIV)
- Virus Kashmir (KBV)

Il protocollo prevedeva la raccolta di un campione di circa 50 api vive preferibilmente bottinatrici da prelevare sul predellino di volo da ognuna delle 10 famiglie della postazione. Il campione veniva quindi identificato da un codice prestabilito e conservato a -20° C sino al momento della spedizione. Il campione di cera costituito da un quadrato di 5x5 cm di cera di

opercolo veniva prelevato da uno dei favi centrali della famiglia e inserito in un contenitore comune con tutti i campioni dell'apiario. Per quanto riguarda il polline, anche in questo caso il campione risultava unico per l'intera postazione e poteva essere prelevato o dal fondo dell'arnia o direttamente dalle cellette del nido, quindi inserito in una provetta da 15 ml. In tabella sono riportati in dettaglio i campioni prelevati e i codici identificativi delle diverse matrici. I campioni così predisposti sono stati spediti ai laboratori dell'IZS sperimentale delle Venezie per le analisi secondo il protocollo riportato di seguito. Per la spedizione ci si è avvalsi dei servizi della TNT e di Medpac già predisposti con contenitori refrigerati con ghiaccio secco per garantire la conservazione del campione sino al momento dell'analisi.

SOSTANZA ATTIVA	TECNICA ANALITICA
Acetamiprid	LC-MS
Acibenzolar-S-Methyl	GC-NPD
Acrinatrina	GC-ECD
Alpha Endosulfan	GC-ECD
Azoxystrobin	LC-MS
Benalaxyl	LC-MS
Beta Endosulfan	GC-ECD
Bifenthrin	GC-ECD
Bitertanol	GC-NPD
Boscalid	GC-ECD
Bromopropilato	GC-ECD
Bupirimate	GC-NPD
Captan	GC-ECD
Carboxin	GC-NPD
Chlormequatchlorid	LC-MS
Chlorphenvinfos	GC-ECD
Chlorpyrifos	GC-NPD
Chlorpyrifos - Methyl	GC-NPD
Clofentezin	LC-MS
Clothianidin	LC-MS
Coumaphos	GC-ECD
Cyazofamid	GC-ECD
Cymoxanil	LC-MS
Cypermethrin	GC-ECD
Cyproconazol	LC-MS
Cyprodinil	GC-NPD
Deltamethrin	GC-ECD
Difenoconazol	LC-MS
Diiflubenzuron	LC-MS
Dimethoat	LC-MS
Dimethomorph Mixture	LC-MS
Dithianon	LC-MS
Dodemorph	LC-MS

Endosulfan Sulfate	GC-ECD
Esfenvalerate	GC-ECD
Ethoprophos	GC-NPD
Etofenprox	LC-MS
Etridiazol	GC-ECD
Femoxadon	LC-MS
Fenamidone	LC-MS
Fenamiphos	GC-NPD
Fenarimol	LC-MS
Fenazaquin	LC-MS
Fenbuconazole	LC-MS
Fenbutatin Oxide	LC-MS
Fenhexamid	LC-MS
Fenitrothion	GC-NPD
Fenoxycarb	LC-MS
Fenpropratin	GC-ECD
Fenpropidin	GC-NPD
Fenpropimorph	LC-MS
Fenpyroximate	LC-MS
Fipronil	GC-ECD
Flazasulfuron	LC-MS
Fluazinam	GC-ECD
Fludioxonil	LC-MS
Flumetrin	GC-ECD
Fluquinconazole	GC-ECD
Flutriafol	LC-MS
Fluvalinate	GC-ECD
Folpet	GC-ECD
Fosthiazate	LC-MS
Hexythiazox	LC-MS
Imazalil	LC-MS
Imidacloprid	LC-MS
Indoxacarb	GC-ECD
Iprodione	GC-ECD
Iprovalicarb	LC-MS
Kresoxim Methyl	GC-ECD
Lambda - Cyhalothrin	GC-ECD
Lambda - Cyhalothrin	GC-ECD
Lufenuron	GC-ECD
Metalaxyl	LC-MS
Metamitron	LC-MS
Methiocarb Sulfoxide	GC-NPD
Methomyl	LC-MS
Metrafenone	GC-ECD
Myclobutanil	GC-ECD
Nitempiran	LC-MS
Oxadiazon	GC-ECD
Oxamyl	GC-NPD
Pencicuron	LC-MS

Penconazolo	GC-ECD
Phosmet	GC-NPD
Piperonil Butossido	LC-MS
Pirimicarb	LC-MS
Pirimiphos Methyl	GC-NPD
Procimidone	GC-ECD
Procloraz	LC-MS
Propamocarb	LC-MS
Propiconazole	GC-ECD
Pyraclostrobin	LC-MS
Pyridaben	LC-MS
Pyrimethanil	LC-MS
Quinoxifen	GC-ECD
Rotenone	LC-MS
Tebuconazole	LC-MS
Tebufenozide	GC-ECD
Tebufenpirad	LC-MS
Teflubenzuron	LC-MS
Teflutrin	LC-MS
Tepraloxydim	LC-MS
Thiabendazole	LC-MS
Thiacloprid	LC-MS
Thiamethoxam	LC-MS
Thiophanate Methyl	LC-MS
Tolclofos Metile	GC-ECD
Triadimenol	LC-MS
Trifloxystrobin	GC-ECD
Triflumuron	LC-MS
Triticonazolo	LC-MS

Tabella 4 - pesticidi ricercati, suddivisi in base alla tecnica strumentale utilizzata

6.1.1. Analisi di laboratorio

Pesticidi. La metodica per la determinazione residuale di pesticidi in api morte, polline e cera prevede tre fasi di lavorazione. Nella prima il campione viene sottoposto a macinazione ed omogeneizzazione in un bagno di azoto liquido. Tali condizioni permettono una lavorazione del campione a bassissime temperature, mantenendo inalterate le molecole di pesticida eventualmente presenti ed un elevato livello di omogeneità dello stesso, facilitando notevolmente l'estrazione successiva. La seconda fase consta nell'estrazione dei residui dal campione sfruttando la tecnica Quechers, opportunamente adattata alla tipologia di matrice. Essa si basa su una estrazione in solvente, separabile dalla fase acquosa dopo l'aggiunta di sali e centrifugazione, e su una successiva purificazione dell'estratto attraverso una "dispersive SPE" con polveri adsorbenti quali PSA (primary secondary amine), C18 e carbone attivo. L'analisi strumentale, terza fase del processo analitico, viene svolta mediante tre diverse tecniche analitiche strumentali :

- Cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa;
- Gascromatografia con rilevatore a cattura di elettroni (ECD);
- Gascromatografia con rilevatore a fosforo-azoto (NPD).

L'applicazione allo stesso campione, di queste tre tecniche strumentali, consente di rilevare tutti i pesticidi elencati in tabella 2 a seconda delle loro caratteristiche chimiche-fisiche (idrofilicità, polarità, volatilità, presenza di particolari gruppi chimici) con un LOD di 2 ppb per i neonicotinoidi e di 5 ppb per tutti gli altri pesticidi.

Contenuto in azoto. I campioni di polline sono stati analizzati per valutarne il contenuto proteico od azoto proteico. L'analisi è stata condotta con il metodo Kjeldahl che consiste in una digestione del campione con acido solforico concentrato, usando il rame (II) solfato come catalizzatore. Tale reazione permette di convertire l'azoto organico in ioni ammonio che, previa distillazione, possono essere titolati con acido cloridrico.

Nosema. Per rilevare la presenza di spore di *Nosema* spp, i campioni di api sono stati sottoposti ad indagine microscopica, secondo quanto riportato nel manuale OIE (2008), che prevede di separare e macinare in un mortaio gli addomi delle api in un volume definito di acqua distillata. Dopo aver posto 3 gocce di tale sospensione su di un vetrino portaoggetti, averlo coperto con un vetrino coprioggetto, il campione viene esaminato al microscopio a 400 ingrandimenti. Per i campioni risultati positivi si è proceduto all'identificazione di specie *Nosema apis*/*Nosema ceranae* mediante PCR seguita da sequenziamento. Il DNA è stato estratto dallo stesso pestato di api impiegato per l'analisi microscopica utilizzando il QIAamp DNA mini kit (Qiagen), secondo il protocollo fornito dalla ditta produttrice, che prevede un'incubazione iniziale con l'enzima lisozima.

Per la corretta identificazione di specie, *N. apis* o *N. ceranae*, e per rilevare la presenza di eventuali coinfezioni sono state utilizzate due coppie di primer, in due reazioni di amplificazione distinte, di cui una specifica per *Nosema apis* (NosA For: 5' - CCG ACG ATG TGA TAT GAG ATG- 3'; NosA Rev: 5' - CAC TAT TAT CAT CCT CAG ATC ATA - 3') e l'altra in grado amplificare una regione conservata del gene che codifica per la subunità ribosomiale 16S di *Nosema apis* e *Nosema ceranae* (NOS For: 5' -TGC CGA CGA TGT GAT ATG AG- 3'; NOS Rev: 5' -CAC AGC ATC CAT TGA AAA CG- 3'). Il prodotto di amplificazione è stato sottoposto a corsa elettroforetica su gel di acrilamide al 7% e successivamente visualizzato mediante colorazione con nitrato d'argento. Il prodotto di amplificazione è stato quindi sequenziato e la sequenza è stata successivamente confrontata, mediante il software nucleotide-nucleotide BLAST, con le rispettive sequenze di *N. apis* e *N. ceranae* presenti in GeneBank.

Virus. Per le indagini virologiche (DWV, BQCV, SBV, AIV, ABPV, KBV, CPV, IAPV) i campioni di api sono stati inviati al FERA [The Food and Environment Research Agency, Sand Hutton, York (UK)] dove, dopo estrazione di RNA, viene utilizzata una One Step Real Time RT-PCR specifica per ciascuno dei virus da testare.

6.2. PROVA DI COMPARAZIONE; INDAGINE SULLA SOPRAVVIVENZA DELLE COLONIE

Al fine di valutare la diversa resistenza alle patologie e l'adattamento alle condizioni ambientali delle due sottospecie di *Apis mellifera* sono stati allestiti due apiari costituiti da 42 famiglie ciascuno, 21 di razza ligustica e 21 di razza siciliana, situati uno in Sicilia e l'altro in Emilia Romagna. Nel corso del presente studio è stato monitorato l'apiario siciliano, sito nel territorio del comune di Trabia, in provincia di Palermo. L'apiario è stato allestito posizionando pacchi di api di due kg all'interno del quale è stata successivamente inserita la regina marcata di colore verde (secondo la regola dei colori diversi per anno di nascita). I nuclei così costituiti sono stati posti all'interno di arnie dadant-Blatt inizialmente su cinque telaini, secondo le normali regole apistiche. Su ogni arnia è stata posta una scheda su cui annotare il ceppo della regina, la numerazione per l'identificazione della famiglia e le valutazioni relative ai parametri comportamentali (Fig. 15). Ciascuno dei due gruppi di api era costituito da tre diverse linee genetiche, cosicché risultavano presenti per ogni sottospecie sette famiglie per ciascun ceppo. Lo studio è iniziato nella primavera del 2009 e si è concluso nell'inverno 2011. Il protocollo operativo prevedeva un unico trattamento iniziale anti varroa circa una settimana dopo l'inserimento delle regine, a base di acido ossalico somministrato per gocciolamento in proporzione 100:1000:1000, per ottenere una condizione di uniformità nella infestazione di varroa all'interno delle famiglie oggetto di studio. Nel corso dei successivi anni di studio non è stato effettuato nessun tipo di trattamento anti varroa se non la rimozione dei favi di covata durante il periodo primaverile. In tabella 5 è riportato l'elenco delle famiglie. Con cadenza mensile sono stati effettuati controlli per la valutazione della forza delle famiglie e di alcuni parametri comportamentali quali docilità e tendenza alla sciamatura. In questo caso a ciascuna famiglia viene assegnato un punteggio da 1 a 4 secondo lo schema sottostante. Per la valutazione della forza delle famiglie viene valutata la quantità di api, covata, miele e polline utilizzando il metodo dei sestri che prevede di dividere idealmente il telaio in 6 settori e valutare quanti di questi risultano occupati come mostrato in figura. Per il controllo sanitario sono stati prelevati campioni di api per verificare la presenza di varroa e nosema. I campioni, costituiti da circa cento api adulte prelevate sui favi, vengono inseriti in vasetti di plastica e conservati a -20° sino a quando vengono esaminati. Per valutare

l'infestazione da varroa il campione viene pesato e successivamente inserito in un baratto di vetro e sottoposto a due successivi lavaggi con acqua e sapone per fare sì che le varroe presenti sul corpo degli insetti si stacchino. Quindi viene setacciato per separare gli acari dalle api e poterli così contare. Il risultato è espresso in numero di varroe per 10gr di api. Per verificare la presenza di nosema lo stesso campione viene pestato in un mortaio di porcellana con circa 200 ml di acqua, per favorire la fuoriuscita delle spore, quindi il surnatante è osservato al microscopio ottico (40X) per l'identificazione e conta delle eventuali spore presenti. Il risultato è espresso in milioni di spore per ape. Il miele prodotto è stato pesato e sottoposto ad analisi per la valutazione del grado di umidità. I dati rilevati sono stati annotati sulla scheda mostrata in tabella 10.

						DATA: _____
APIARIO DI: _____						ALVEARE N° _____
	Numero di api	Covata disop.	Covata operc.	Miele	Polline	Annotazioni o Melario
Parete a						
favo 1/a						
1/b						
favo 2/a						
2/b						
favo 3/a						
3/b						
favo 4/a						
4/b						
favo 5/a						
5/b						
favo 6/a						
6/b						
favo 7/a						
7/b						
favo 8/a						
8/b						
favo 9/a						
9/b						
favo 10/a						
10/b						
favo 11/a						
11/b						
Parete b						
TOTALE						

Figura 15. Scheda utilizzata per la valutazione della forza della famiglia

ALVEARE	RAZZA	CEPPO	ALVEARE	RAZZA	CEPPO
1S	Sicula	B	1L	Ligustica	P
2S	Sicula	B	2L	Ligustica	F
3S	Sicula	B	4L	Ligustica	F
4S	Sicula	B	5L	Ligustica	P
5S	Sicula	B	6L	Ligustica	F
6S	Sicula	B	7L	Ligustica	A
7S	Sicula	B	8L	Ligustica	P
8S	Sicula	B	9L	Ligustica	P
9S	Sicula	C	10L	Ligustica	F
10 S	Sicula	C	11L	Ligustica	F
11S	Sicula	B	12L	Ligustica	A
12S	Sicula	C	13L	Ligustica	A
13S	Sicula	L	14L	Ligustica	A
14S	Sicula	C	16L	Ligustica	P
15S	Sicula	C	17L	Ligustica	P
16S	Sicula	C	18L	Ligustica	P
17S	Sicula	L	20L	Ligustica	A
18S	Sicula	C	21L	Ligustica	F
19S	Sicula	C	22L	Ligustica	F
20S	Sicula	L	23L	Ligustica	P
21S	Sicula	C	24L	Ligustica	A

Tabella.5. Elenco delle famiglie oggetto dello studio.

6.3. INDAGINE SUL GRADO DI IBRIDAZIONE

6.3.1 Analisi elettroforetica

Per valutare il grado di ibridazione delle api presenti sul territorio regionale è stato utilizzato lo studio del polimorfismo enzimatico (*Badino et. al 1985*). Gli enzimi utilizzati sono la malatodeidrogenasi (MDH) e l'esterasi (EST). Secondo studi precedenti (*Biondo et al.1991*), infatti l'allele F dell' MDH e l'allele S dell'esterasi risultano essere marcatori specifici per discriminare la sottospecie siciliana. I campioni da sottoporre ad analisi sono stati raccolti, tra il 2008 e il 2010, da cinque diversi apiari situati nelle provincie di Palermo e Trapani (tab. 6) Sono inoltre stati analizzati alcuni campioni di api provenienti dalla Tunisia e presumibilmente afferibili alla sottospecie *A.m.intermissa* diffusa in quei territori. Da ciascuna famiglia sono state prelevate circa 20 api vive inserite in contenitori per il trasporto e quindi stoccate a -20° C sino al momento dell'esame. Secondo quanto previsto dal protocollo (*Badino*) per ogni famiglia sono state analizzate 10 api. La testa di ogni individuo, inserita in provette da 1,5 ml, viene pestata e frantumata con 100 µl di cloruro di Mg 0,0025 M e centrifugata per 10 minuti a 12.000 rpm. Quindi vengono prelevati 16 µl del surnatante colorati con 12 µl di simple buffer (blu di bromofenolo) e caricati su gel di poliacrilammide al

6%. per la migrazione. Dopo circa 40 minuti il gel è prelevato e posto nei tamponi per la colorazione delle bande secondo la metodica standard (*Richardson et al.,1986*). Per interpretare correttamente le bande elettroforetiche in ogni gel è stato utilizzato come marcatore un individuo di razza ligustica fornito dal CRA api di Bologna. Le bande così colorate permettevano di discriminare i diversi genotipi.

COMUNE	PROV.	X*	Y*	N°API ANALIZZATE
CORLEONE	PA	342000	4188000	261
LASCARI	PA	398000	4208000	207
PALERMO	PA	340000	4224000	45
CALTAVUTURO	PA	388000	4187000	18
CASTELVETRANO	TP	306000	4170000	36
SAN VITO LO CAPO	TP	304000	4224000	81
TUNISIA				39

Tabella 6. Elenco delle zone di campionamento.

7. RISULTATI

7.1. MONITORAGGIO DEI FENOMENI DI MORTALITÀ E SPOPOLAMENTO

7.1.1. Risultati del primo anno di studio 2009

MODULO SCL1-1



Figura. 16. Apiario 1 del modulo SCL-1 della postazione di Lascari



Figura. 17. Paesaggio della postazione SCL1-1 Lascari (PA)

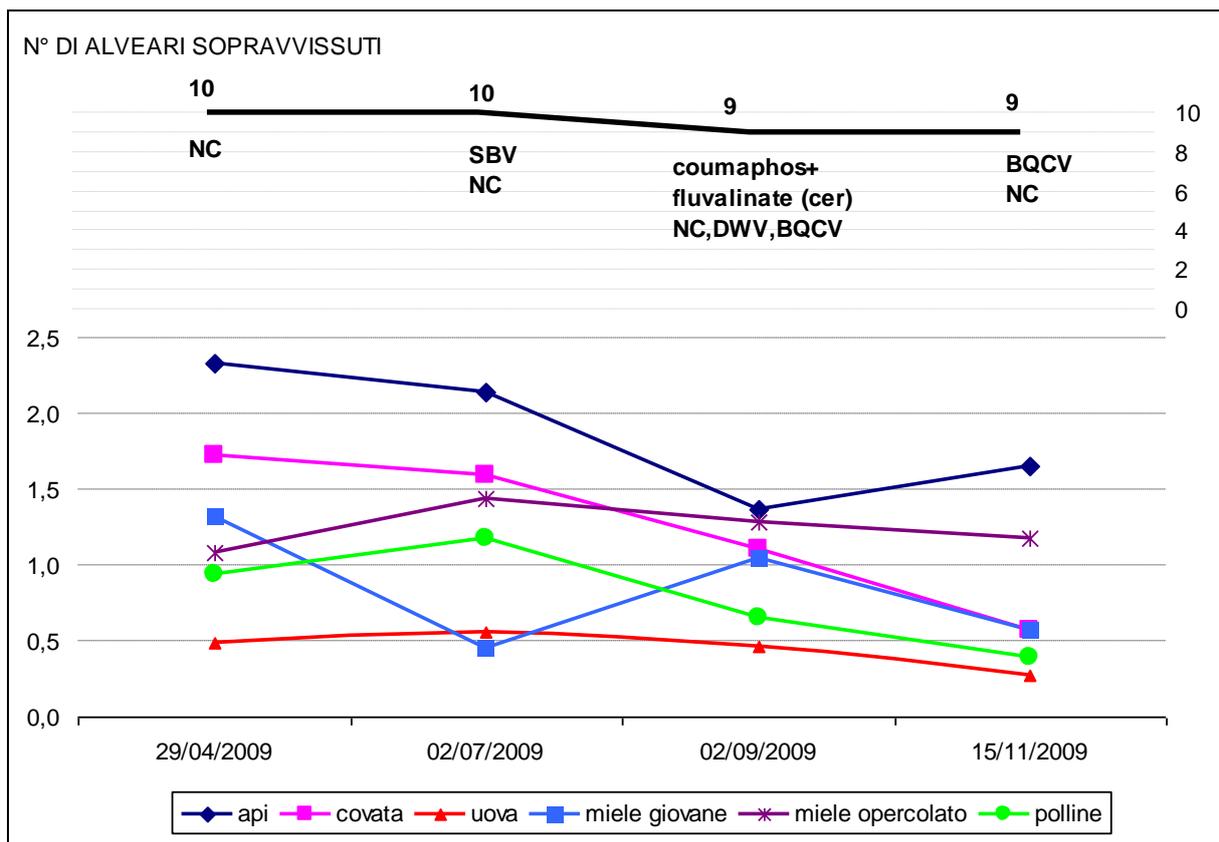


Grafico 1. Grafico riassuntivo relativo alla postazione SCL1. Legenda: APBV virus della paralisi acuta; BQCV virus della cella reale nera; CPBV virus della paralisi cronica; DWV virus delle ali deformi; SBV virus della covata a sacco;

1° Sopralluogo

La postazione SCL1-1 ricade nel territorio del comune di Lascari in provincia di Palermo. L'apiario oggetto dello studio si trova all'interno di un'azienda agricola che opera in biologico le cui principali colture sono il carrubo l'ulivo gli agrumi e in minor parte colture orticole.

La vegetazione spontanea è caratterizzata da piante erbacee tipiche della zona mediterranea e da vegetazione dunale poiché l'area è prossima alla zona costiera costituita da un esteso litorale sabbioso. Il primo sopralluogo è stato effettuato durante il periodo primaverile, come previsto dal protocollo operativo. Le fioriture presenti, per quanto riguarda le essenze spontanee, erano rappresentate da specie per lo più erbacee quali *Silene sp.*, *Crisanthemum sp.*, *Galactites sp.*, *Centaurea sp.* Dall'analisi delle gabbie underbasket non è stata rilevata alcuna particolare mortalità né tanto meno è stato riferito dall'apicoltore alcun fenomeno di spopolamento o moria sospetta. Il controllo della famiglia ha consentito di rilevare la presenza di covata in quantità media e di un consistente numero di api. Le scorte, costituite da miele giovane, miele opercolato e polline erano presenti in quantità adeguate in relazione al periodo.

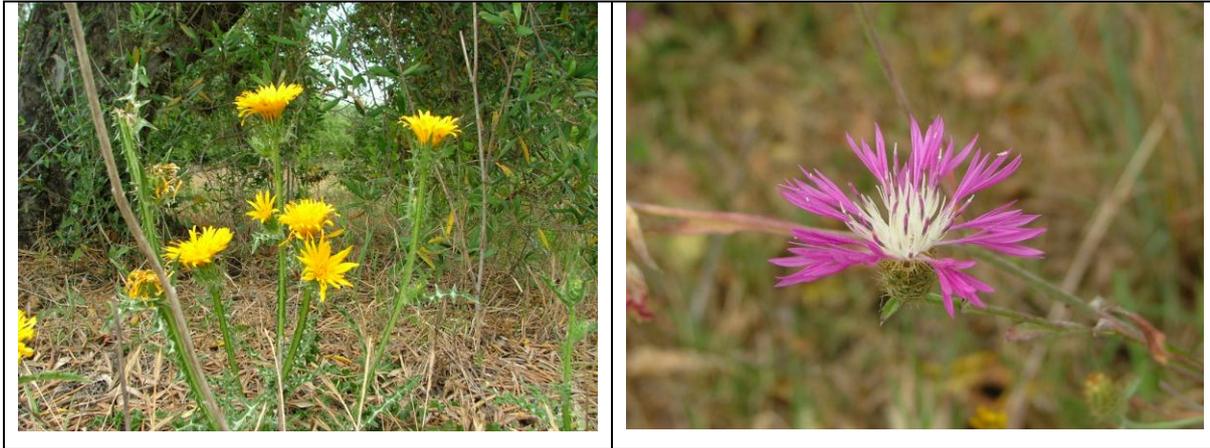


Figura. 18. Alcune fioriture caratteristiche della flora spontanea nella stazione di Lascari

L'analisi approfondita dei telaini di covata non ha rivelato tracce di patologie conclamate, ad eccezione della ormai ubiquitaria varroasi.

2° Sopralluogo

Il secondo controllo previsto dal protocollo è stato effettuato nel periodo estivo inoltrato. In questo caso non erano presenti fioriture spontanee a causa dell'aridità del periodo, né erano presenti colture agrarie in fiore. Anche in questo caso non sono state evidenziate mortalità sospette né segni di spopolamento delle famiglie. Tutte le dieci famiglie previste dal progetto erano presenti alla data del secondo controllo. Tuttavia una delle 10 famiglie (alveare n°2) è stato eliminato poiché la regina ha perso la capacità di deporre covata feconda e da luogo esclusivamente a covata maschile (famiglia fucaiola) determinando l'esaurimento della famiglia stessa. In generale le covate e le api erano ancora presenti in quantità media sebbene chiaramente più ridotte rispetto al precedente controllo. Le scorte di miele opercolato e polline presenti nel nido si sono mantenute a livelli sufficienti con un leggero incremento rispetto al valore precedente. Il miele giovane appare in quantità minore rispetto al precedente sopralluogo in relazione al posizionamento del melario che ha determinato lo spostamento del miele raccolto dal nido al melario. Non sono stati riscontrati sintomi evidenti di patologie.

3° sopralluogo

E' stato condotto nel periodo pre-autunnale alla fine della stagione estiva. Non erano presenti fioriture né spontanee né coltivate. L'assenza di raccolto ha chiaramente determinato una contrazione nello sviluppo delle famiglie. Tutte le matrici analizzate hanno mostrato valori di presenza più bassi rispetto al precedente controllo ad esclusione del miele giovane che risulta presente in quantità maggiore. Questo dato è da mettere in relazione con la relativa diminuzione di api e covata da alimentare. Non sono state evidenziate patologie né mortalità sospette.

4° sopralluogo

L'ultimo controllo del primo anno di studio è stato effettuato nel periodo autunnale, prima dell'invernamento delle famiglie. Esclusa la famiglia n° 2 perduta durante il 2° controllo, non si sono verificate ulteriori perdite di alveari. Anche in questo caso non sono state rilevate mortalità né vi sono state segnalazioni di spopolamenti da parte dell'apicoltore. La fioritura presente in questo periodo, pressoché esclusiva è *Oxalis pes-caprae* in fase iniziale. Si riscontra un incremento nel numero di api presenti in controtendenza con tutte le altre matrici (covata, il miele giovane, polline e uova) (Grafico 1) che mostrano un ulteriore calo in relazione all'andamento stagionale. A parte la diminuzione di consistenza quantitativa, non sono state riscontrate patologie visibili né altre particolari problematiche da segnalare.

MODULO SCL1-2



Figura 19. Paesaggio della stazione SCL1-2 Castelluzzo (TP)



Figura 20. Apiario della postazione SCL1-2 Castelluzzo (TP)

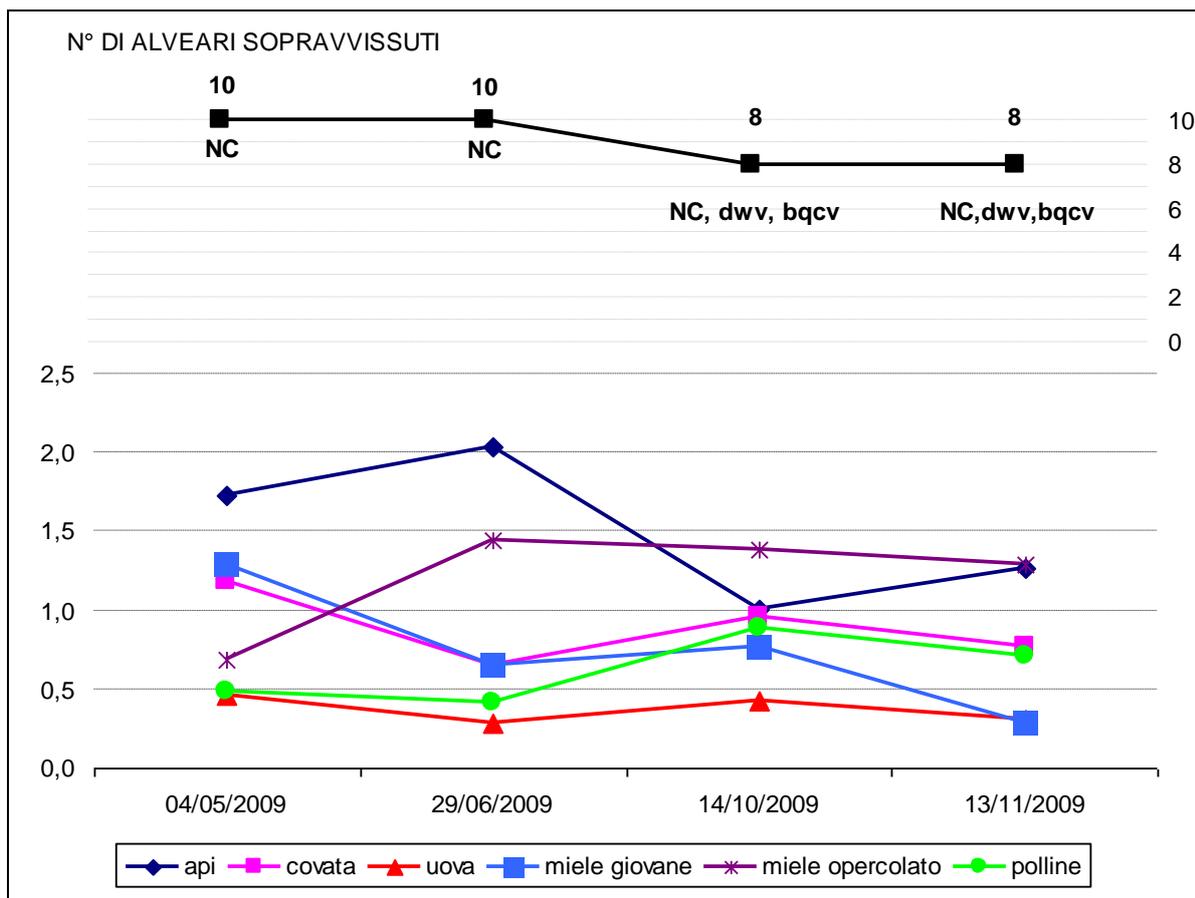


Grafico 2. Grafico riassuntivo relativo alla postazione SCL1-2. Legenda: APBV virus della paralisi acuta; BQCV virus della cella reale nera; CPBV virus della paralisi cronica; DWV virus delle ali deformi; SBV virus della covata a sacco;

1° sopralluogo.

La postazione numero 2, è situata nel territorio del comune di Castelluzzo, in provincia di Trapani. Ricade all'interno di un terreno privato di proprietà dell'apicoltore. La zona è nel complesso piuttosto brulla e arida e presenta le caratteristiche dei terreni calcarei tipici della zona. Il terreno si trova a pochi m sul livello del mare ed è delimitato posteriormente da un massiccio di natura carbonatica che ospita essenze vegetali tipiche della macchia mediterranea. L'unica coltura presente è l'ulivo, e la rimanente superficie è occupata da incolto con essenze tipiche della macchia mediterranea (*Chamaerops umilis*, *galactites*, *Clalicotome sp*, *Genista sp.*, *Euphorbia dendroides*)

Il sopralluogo primaverile è stato condotto nel mese di maggio. In questo periodo le fioriture presenti, erano costituite da flora spontanea come *Galactites tomentosa*, *Calycotome spp*, *Cytisus sp*. Nel corso del sopralluogo non sono state evidenziate tracce di mortalità e l'analisi delle famiglie non ha consentito di rilevare sintomatologie manifeste di patologie. In genere le famiglie erano mediamente popolate da api adulte e le covate abbastanza sviluppate (classe di

abbondanza media). Le scorte di miele e polline erano presenti in quantità limitata in relazione alle ridotte fioriture presenti nella zona.

2° sopralluogo

Durante il secondo controllo, effettuato nel periodo estivo, l'analisi degli alveari ha evidenziato un incremento nella presenza di api adulte e scorte di miele opercolato, mentre si nota un crollo della covata e delle scorte di miele giovane e polline. Anche la presenza di uova è ridotta rispetto al periodo precedente. Nelle gabbie underbasket non sono state evidenziate mortalità sospette e l'analisi dei telaini del nido non ha messo in evidenza la presenza di sintomi visibili legati alle patologie. Non erano presenti fioriture di interesse apistico della flora spontanea. Le 10 famiglie esaminate erano tutte presenti al momento del controllo. L'alveare n° 4, mostrava le caratteristiche di una famiglia priva di regina feconda che diviene fucaiola (assenza di covata femminile e presenza di sola covata maschile) e per tale motivo viene escluso dalla prova. Le condizioni di estrema aridità e la totale assenza di fonti nettariere rende estremamente complicato effettuare il controllo di routine a causa dei fenomeni di saccheggio che si determinano.

3° Sopralluogo.

Il sopralluogo autunnale mette in evidenza una riduzione del numero di api adulte mentre si evidenzia un incremento della presenza delle altre matrici analizzate. La covata, le uova e le scorte di miele e polline sono presenti in quantità maggiore rispetto a quanto rilevato nel precedente controllo. Non si evidenziano particolari fenomeni di mortalità né patologie manifeste o spopolamenti. La famiglia n°1 all'analisi del nido risulta fucaiola e viene eliminata. Nel terzo controllo risultano quindi perduti complessivamente due alveari. Nella zona sono presenti fioriture relative a essenze quali *Dittrichia viscosa* e *asparagus sp.*

4° Sopralluogo.

L'ultimo controllo del primo anno è stato eseguito nel mese di novembre. In questo periodo la presenza di fonti nettariere nella zona è piuttosto limitata, l'unica fioritura presente è infatti quella di *Oxalis pes-caprae* comunque in fase iniziale. Delle 10 famiglie iniziali sono sopravvissuti complessivamente otto alveari. Durante il controllo non si rilevano mortalità nelle gabbie underbasket e l'analisi del nido non evidenzia particolari patologie. Complessivamente si nota un generale incremento del numero di api mentre la covata, le uova e le scorte di miele giovane e polline sono presenti in quantità minore rispetto al precedente controllo. Il miele opercolato si mantiene in quantità pressoché costante negli ultimi tre controlli.



Figura 21. Particolare di una famiglia di *A. mellifera siciliana* durante il momento della sciamatura



Figura 22. Regina di *A.m.siciliana* attorniata dalle operaie

MODULO SCL1-3



Figura 23. Apiario della postazione SCL1-3 Montemaggiore (PA)



Figura.24. Particolare delle Gabbie under-baskett per la raccolta delle api morte.

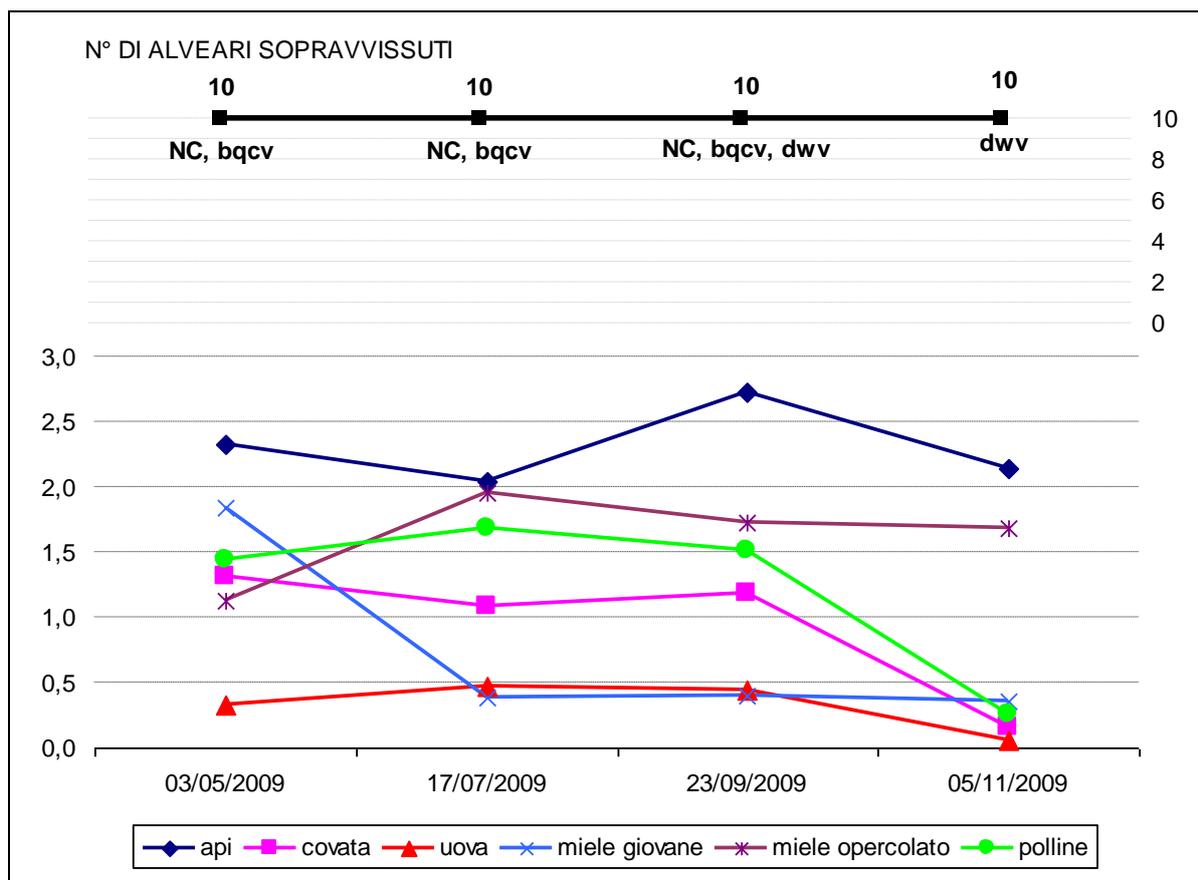


Grafico 3. Grafico riassuntivo relativo alla postazione SCL1-3. Legenda: APBV virus della paralisi acuta; BQCV virus della cella reale nera; CPBV virus della paralisi cronica; DWV virus delle ali deformi; SBV virus della covata a sacco;

1° Sopralluogo.

La terza postazione inserita nel progetto è stata individuata nel territorio del comune di Montemaggiore Belsito in zona collinare a circa 480 m s.l.m., in provincia di Palermo. L'apiario costituito da circa 60 famiglie, è situato all'interno di un'azienda agricola le cui principali colture sono di tipo cerealicolo e foraggiero. Sono presenti anche agrumi ed eucalipti che rappresentano la principale fonte nettariana per le api presenti. Le zone non coltivate sono ricche di vegetazione spontanea per lo più di tipo erbaceo tra cui principalmente ombrellifere come la visnaga (*Amni visnaga*), la ferula (*Ferula communis*) e il finocchio selvatico (*Foeniculum vulgare*), composite tra cui *Chrysanthemum sp* e *Galactites tormentosa* e crucifere principalmente afferibili al genere *Brassica*.

Il primo controllo è stato effettuato nel mese di maggio, periodo in cui le fioriture dominanti sono rappresentate da sulla (*Edysarum coronarium*) e agrumi (*Citrus sp.*).

Le famiglie mostravano un elevato numero di api adulte, covate molto sviluppate e una discreta presenza di uova. All'interno del nido le scorte erano presenti in quantità media e si è riscontrata una abbondante quantità di polline. Non sono state rilevate mortalità o

spopolamenti e non è stato riferito dall'apicoltore alcun fenomeno particolare. L'analisi dei telaini di covata non ha messo in evidenza sintomatologie riferibili alle comuni patologie apistiche.

2° Sopralluogo

Durante il secondo controllo, effettuato nel periodo estivo, tutte le famiglie sono state trovate in buone condizioni. Non sono state rilevate mortalità né fenomeni di spopolamento. La quantità di api e la covata erano in quantità leggermente inferiore rispetto al precedente controllo così come le scorte di miele giovane. In quantità maggiore era presente il miele opercolato e il polline. Le uova erano presenti in quantità pressoché costante. Anche in questo caso non erano presenti sintomi visibili di patologia. L'assenza di fioritura e quindi di pascolo per le api ha causato un deciso incremento nei comportamenti aggressivi e nei fenomeni di saccheggio tra le famiglie che hanno reso particolarmente complicato effettuare il controllo.

3° Sopralluogo

Il controllo autunnale, eseguito nel mese di settembre, ha messo in evidenza un deciso incremento nel numero di api adulte presenti e un leggero aumento nell'estensione delle covate, mentre le altre matrici mostrano una riduzione rispetto al periodo precedente. Le scorte di miele giovane e polline sono presenti in quantità limitata mentre la quantità di miele opercolato presente nel nido risulta perlopiù costante così come la quantità di uova deposte. L'analisi delle gabbie underbasket non ha rivelato particolari morie e non sono stati riscontrati fenomeni di spopolamento. Il controllo del nido non ha messo in evidenza particolari patologie fatta eccezione per la onnipresente varroa. In questo periodo non sono presenti nella zona fioriture di interesse apistico.

4° Sopralluogo

Nel mese di novembre è stato condotto l'ultimo controllo del primo anno di studio previsto dal protocollo. Le fioriture presenti erano limitate a *Oxalis pes-caprae*, *Dittrichia viscosa*, *Alissum sp.* e alcune liliacee del genere *Allium*. Tutte le famiglie sono sopravvissute nel corso del primo anno e non sono state registrate perdite di alveari. La quantità di api adulte era sempre medio-abbondante in leggero calo rispetto al precedente controllo, mentre la covata le uova e le scorte risultavano in notevole riduzione mostrando in generale una presenza decisamente scarsa. Le scorte di miele opercolato erano presenti in quantità costante negli ultimi sopralluoghi. Non sono state rilevate mortalità né spopolamenti e l'analisi dei favi di covata non ha evidenziato particolari patologie.

MODULO SCL1-4



Figura 25a. Apiario della postazione SCL1-4 Castelvetrano (TP)



Figura 25b. Paesaggio della postazione SCL1-4 Castelvetrano (TP)

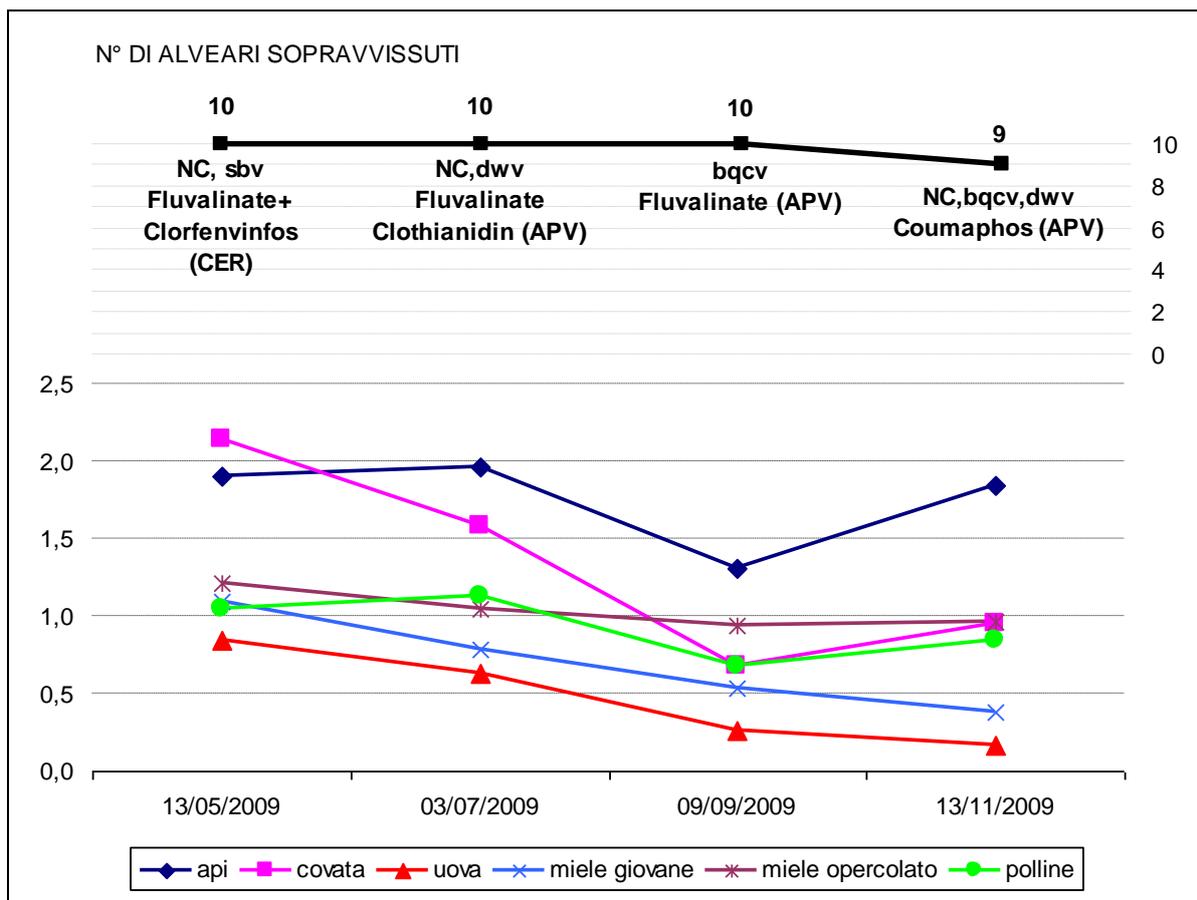


Grafico 4. Grafico riassuntivo relativo alla postazione SCL1-4. Legenda: APBV virus della paralisi acuta; BQCV virus della cella reale nera; CPBV virus della paralisi cronica; DWV virus delle ali deformi; SBV virus della covata a sacco;

La quarta postazione prevista dal progetto è situata nel comune di Castelvetrano in provincia di Trapani, sul livello del mare. L'apiario è costituito da 40 famiglie e si trova all'interno di un'azienda agricola che produce principalmente olio, vino, orticole e in minor parte agrumi. La flora spontanea è costituita principalmente da rosmarino e ampelodesma (*Rosmarinus officinalis*, *Ampelodesmus mauritanicus*) ed essenze erbacee come *Galactites tomentosa*, *Chrysanthemum* e *Tarassaco*. Il controllo primaverile è stato condotto nel mese di maggio ed ha evidenziato la presenza di famiglie con un numero di api adulte medio abbondante e covate molto sviluppate con buona presenza di uova e covata appena deposta. In quantità media anche le scorte di miele e polline. Non sono stati riferiti dall'apicoltore casi di mortalità e spopolamenti e l'analisi delle gabbie underbasket non ha evidenziato particolari morie. Dall'analisi dei telaini del nido non è emersa nessuna criticità e non sono stati rilevati sintomi di patologie. Le principali fioriture presenti sono la *Galactites tomentosa*, il *Tarassacum officinalis* e il *Chrysanthemum coronarium*.

2° Sopralluogo

Il secondo controllo, effettuato nel periodo estivo, ha evidenziato una ancora abbondante presenza di api adulte e una leggera diminuzione dello sviluppo delle covate e delle uova deposte. Si nota anche una leggera riduzione nella quantità di scorte di miele sia giovane che opercolato mentre c'è un incremento delle scorte di polline, rispetto a quanto emerso dal precedente controllo. Non sono presenti mortalità sospette né spopolamenti e non vengono evidenziati sintomi patologici dall'analisi del nido. Non sono presenti fioriture né spontanee né coltivate.



Figura 26. *Galactites tormentosa*.

3° Sopralluogo.

Durante il controllo autunnale, sono presenti ancora tutti gli alveari oggetto di studio ma una delle famiglie, la numero 2 risulta essere orfana a causa della perdita della regina per ragioni non evidenziabili. Dall'analisi delle gabbie underbasket non si rilevano mortalità particolari e non vengono evidenziati casi di spopolamento delle famiglie. Il controllo del nido mette in evidenza una diminuzione consistente del numero di api adulte presenti e dell'estensione della covata che appare notevolmente ridotta rispetto al precedente periodo. Si nota una consequenziale diminuzione nella quantità di uova presenti e di scorte di miele giovane e polline. La quantità di miele opercolato rimane invece pressoché costante. Non si evidenziano patologie né particolari criticità. Data la mancanza di precipitazioni non sono presenti fioriture nella zona.

4° Sopralluogo

L'ultimo controllo del primo anno di studio mette in evidenza un aumento deciso nella quantità di api adulte, covata e scorte di polline, mentre continuano a diminuire rispetto al precedente controllo le quantità di uova e scorte di miele giovane. Il miele opercolato è presente in quantità costante durante tutto l'anno di campionamento. Anche in questo caso non si rilevano mortalità, spopolamenti né patologie particolari emergono dall'analisi dei telaini del nido. La famiglia numero due è deceduta nel periodo compreso tra i due controlli e pertanto sono presenti complessivamente nove alveari. Le fioriture presenti sono rappresentate principalmente da *Rosmarinus officinalis*, crocifere del genere Brassica e *Tarassacum officinalis*

MODULO SCL-5



Figura 27. Apiario della postazione SCL1-5 Montepellegrino (PA).

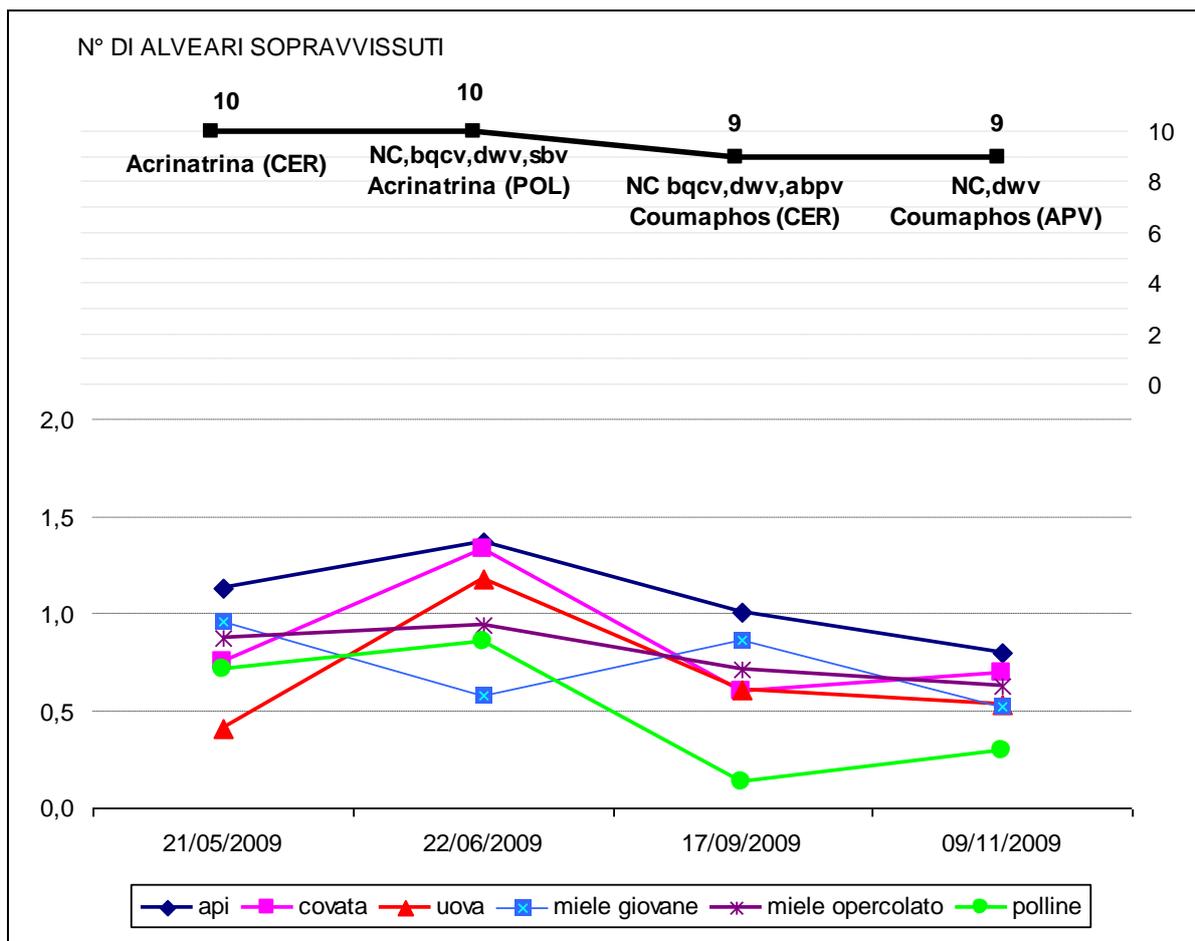


Grafico 5. Grafico riassuntivo relativo alla postazione SCL1-5. Legenda: APBV virus della paralisi acuta; BQCV virus della cella reale nera; CPBV virus della paralisi cronica; DWV virus delle ali deformi; SBV virus della covata a sacco;

La stazione numero 5 si trova nel territorio del comune di Palermo all'interno della Riserva Naturale Orientata Monte Pellegrino a circa 400 m s.l.m. L'apiario è collocato in zona rimboschita con conifere (*Pinus sspp.*) ed eucalpti (*Eucalyptus sspp.*). La flora di interesse apistico, oltre al già citato eucalyptus, comprende essenze erbacee quali *Galactites tomentosa*, il *Tarassacum officinalis* *Oxalis pes-caprae*, *Dittrichia viscosa*, *Asphodelus sp.* ecc.

1° Sopralluogo:

Il primo controllo ha evidenziato famigli in condizioni non ottimali con scarsa presenza di api adulte e covate poco sviluppate. In generale si nota una scarsa presenza anche di uova e scorte di miele e polline. L'apicoltore non ha riferito fenomeni di spopolamento e mortalità e l'analisi delle gabbie underbasket non ha messo in evidenza particolari morie. L'analisi del nido non evidenzia particolari patologie se si esclude la presenza di varroa e uno scarso sviluppo delle covate. Le fioriture presenti sono quelle tipicamente primaverili come *Galactites tomentosa*, il *Tarassacum officinalis* e *Acanthus mollis*.

2° Sopralluogo:

il controllo condotto nel periodo estivo mostra una generale ripresa delle famiglie in cui si nota un generale incremento sia di api adulte che nello sviluppo delle covate e nella quantità di uova. Le scorte di polline ed il miele opercolato sono presenti in quantità scarsa ma comunque maggiore rispetto al precedente controllo mentre la quantità di miele giovane risulta diminuita. Sono presenti tutte le famiglie inserite nello studio e non si rilevano spopolamenti e mortalità. E' ancora presente un'esigua fioritura di *G. tomentosa* in fase finale.

3° Sopralluogo:

Durante il controllo pre-autunnale nella postazione viene evidenziata la presenza di *Vespa orientalis* che esercita una notevole predazione ai danni delle famiglie di api. Uno degli alveari, il numero 4 è infatti deceduto e all'interno del nido sono presenti esclusivamente le vespe predatrici. Il controllo delle famiglie mostra un decremento complessivo nelle quantità di api adulte, covata e scorte di polline e miele. Non sono rilevate patologie né morie all'interno delle gabbie Underbaskett. L'unica fonte nettarifera è rappresentata dalla fioritura, ormai in fase finale, dell'eucaliptus.

4° Sopralluogo:

L'ultimo controllo viene effettuato nel mese di novembre e mostra una leggera riduzione nella presenza di api adulte rispetto al precedente controllo, e di uova, mentre la covata in generale è presente in quantità poco maggiore. Si nota una presenza in crescita del polline presente nel nido. Le scorte di miele giovane e miele opercolato sono in leggero calo ma in quantità adeguate al periodo. Non si rilevano tracce di patologie né di mortalità o spopolamenti. Non sono morte altre famiglie quindi sono presenti complessivamente nove alveari.

7.1.2. Analisi di laboratorio

PRESENZA DI INQUINANTI E PATOLOGIE

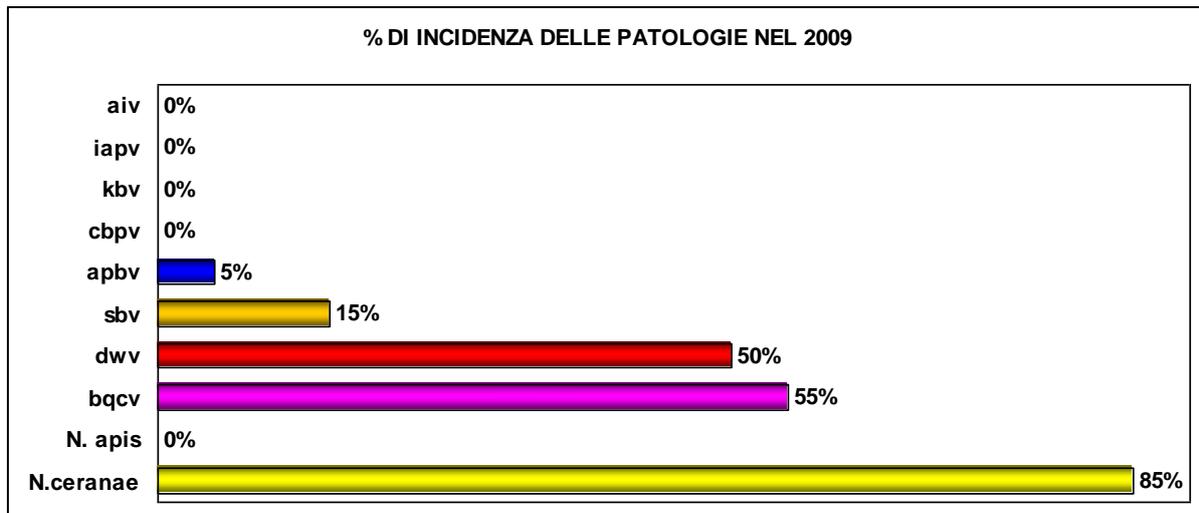


Grafico 6. Percentuale di incidenza delle patologie nel primo anno di studio.

SCL1-1 I risultati delle analisi di laboratorio relativi alle patologie hanno rilevato la presenza del *Nosema ceranae* in tutti i campioni analizzati mentre risulta assente il *N.apis*. Sono stati individuati tre degli 8 virus ricercati, in particolare il virus della covata a sacco (SBV) era presente nei campioni relativi al secondo sopralluogo mentre risulta assente nel precedente e nei successivi. Nel terzo controllo è presente il virus delle ali deformi (DWV), assente in tutti gli altri mentre nel terzo e quarto campionamento viene rilevato il virus della cella reale nera (BQCV). Per quanto riguarda i principi attivi, in un solo campione di cera (III controllo) viene riscontrata la presenza di due acaricidi, Coumaphos e Fluvalinate.

SCL1-2 Anche nella seconda postazione analizzata il *N.Cerane* è presente nel 100% dei campioni analizzati durante tutto l'arco dell'anno e risulta assente il *N.apis*. Solamente due tipi di virus vengono rilevati dalle analisi biomolecolari e sono il virus delle ali deformi (DWV) e il virus della cella reale nera (BQCV) entrambi presenti in associazione nel terzo e quarto controllo. Durante il primo anno di studio in questa postazione non sono stati ritrovati principi attivi in nessuno dei campioni analizzati.

SCL1-3. In questo caso il *N. ceranae* è presente nei campioni relativi al I-II-III controllo e risulta assente nel IV. Assente il *N. apis*. Sono ritrovati, presenti in tutti i campioni, due degli otto virus ricercati, il virus delle ali deformi III-IV campionamento, il virus della cella reale nera I-II-III campionamento. Nel corso del primo anno di monitoraggio non è stata riscontrata la presenza di alcuna sostanza attiva

SCL1-4 Nella quarta postazione è stato ritrovato il *N. ceranae* in tre dei quattro campionamenti ed in particolare nel I-II-IV sopralluogo. I virus ritrovati sono quelli ritrovati

nelle altre postazioni, il virus della covata a sacco, il virus della cella reale nera e il virus delle ali deformi, presenti in diverse associazioni in tutto l'arco dell'anno. SBV viene ritrovato nei campioni primaverili mentre non si ritrova successivamente, BQCV è presente nel terzo e quarto campionamento mentre il virus delle ali deformi lo si ritrova nel II e IV sopralluogo. Il N.apis anche in questo caso non viene mai ritrovato.

L'analisi dei principi attivi ha evidenziato la presenza di più sostanze nei vari periodi dell'anno. In particolare nel I campionamento il campione di cera risulta contaminato da due acaricidi, Fluvalinate (25 ppb) e Clorfenvinphos (63ppb). Il campionamento estivo (II controllo) mette in evidenza su un campione di api la presenza del Fluvalinate (53ppb) e di un neonicotinoide, il clothianidin (103ppb) non più ritrovato nei campioni successivi. un campione di api risulta contaminato da un neonicotinoide e un acaricida, rispettivamente Clothianidin e Fluvalinate. Nel III campionamento è ancora presente il fluvalinate su un campione di api ma non sono riscontrati altri principi attivi e nel controllo autunnale è presente solo un acaricida non riscontrato nei precedenti campionamenti, il coumaphos (70ppb).

SCL1-5. Nella postazione n°5 Il *Nosema ceranae* è presente nel II-III e IV campionamento mentre risulta assente nel primo campionamento. Il *N. apis* anche in questo caso è assente. Per quanto riguarda la presenza di virus, nei due campionamenti estivi si evidenzia la presenza di tre degli otto virus ricercati, BQCV, DWV e SBV nel II, nel III compare il virus della paralisi acuta (ABPV) e non viene ritrovato quello della covata a sacco (SBV). Nell'ultimo campionamento è presente solamente il virus delle ali deformi (DWV). L'analisi dei pesticidi ha messo in evidenza la presenza di una sostanza attiva non riscontrata nelle altre postazioni, un acaricida il cui uso non è lecito in apicoltura, l'acrinatrina. Questa viene ritrovata in un campione di cera relativo al primo sopralluogo e nel campione di polline del II campionamento. Non risulta presente nei campioni successivi. Nel III e IV sopralluogo viene rilevata la presenza di Coumaphos nel campione di cera (III 102ppb) e di api (IV 54ppb)

7.1.3. Risultati anno 2010

Il secondo anno di studio ha avuto inizio con il campionamento primaverile. Delle cinque postazioni iniziali una è andata perduta a causa del furto di tutti gli alveari presenti nella postazione. Sono stati condotti complessivamente due controlli, quello primaverile e quello estivo. Durante il primo controllo si è provveduto a sostituire le famiglie perdute durante l'inverno in modo da iniziare nuovamente i controlli con 10 famiglie per apiario. Complessivamente sono state sostituite nove famiglie, sulle 50 presenti all'inizio del progetto.

MODULO SCL1-1

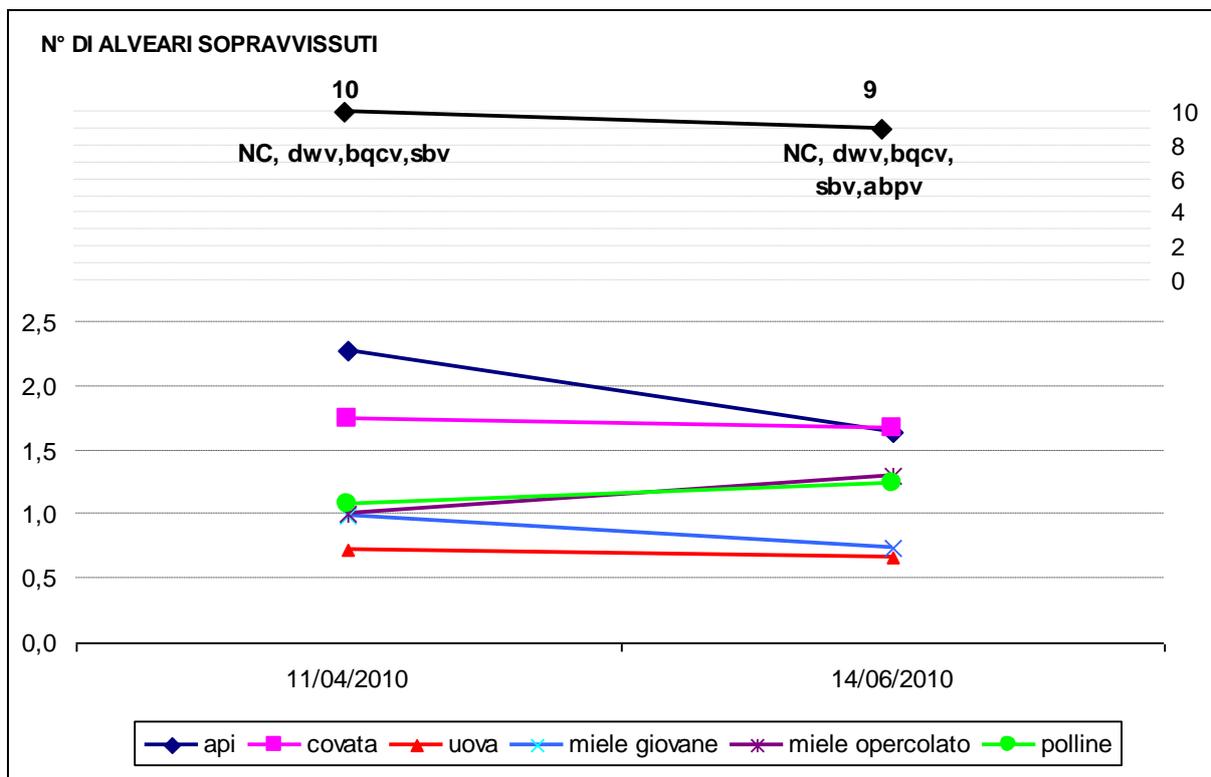


Grafico 7. Grafico riassuntivo relativo alla postazione SCL1-1. Legenda: APBV virus della paralisi acuta; BQCV virus della cella reale nera; CPBV virus della paralisi cronica; DWV virus delle ali deformi; SBV virus della covata a sacco;

Nella postazione SCL1-1 durante il primo anno di studio sono stati persi complessivamente tre alveari che quindi vengono sostituiti durante il primo controllo del secondo anno. Durante il periodo invernale comunque non si sono subite particolari perdite. È presente un'abbondante fioritura di *Oxalis pes-caprae*, *Alissum* sp., *Citrus* sp., *Chrysanthemum coronarium*, *Galactites tomentosa*, *Linum* sp. che rappresentano tutte buone fonti di pascolo per le api. Il controllo dei nidi permette di rilevare in generale la presenza medio-abbondante di api adulte e una quantità media di covata. Tutte le altre matrici esaminate, uova, miele giovane, miele opercolato e polline sono presenti in quantità scarsa o medio scarsa. Tutte le matrici comunque sono

presenti in quantità correlabili a quelle del primo controllo del precedente anno di studio. Non vengono rilevate tracce di particolari patologie né fenomeni di mortalità e spopolamenti sospetti.

Il secondo controllo viene eseguito nel mese di giugno, come previsto dal protocollo. Le fioriture presenti sono scarse a causa dell'aridità del periodo e si limitano ad essenze quali il fiordaliso (*Centaurea calcitrapa*), la ginestra (*Spartium junceum*) e alcune borraginacee come *Echium plantagineum*. Una delle famiglie è sciamata durante il periodo primaverile quindi il controllo viene effettuato su nove alveari. Nelle famiglie si nota un calo nella quantità di api adulte, mentre le covate e le uova sono presenti in quantità costanti rispetto al precedente controllo. Si nota un leggero incremento nella quantità di scorte di miele opercolato e polline e un calo in quelle di miele giovane legato alla presenza dei melari. Non Vi sono tracce di patologie né di mortalità o spopolamenti.

MODULO SCL1-2

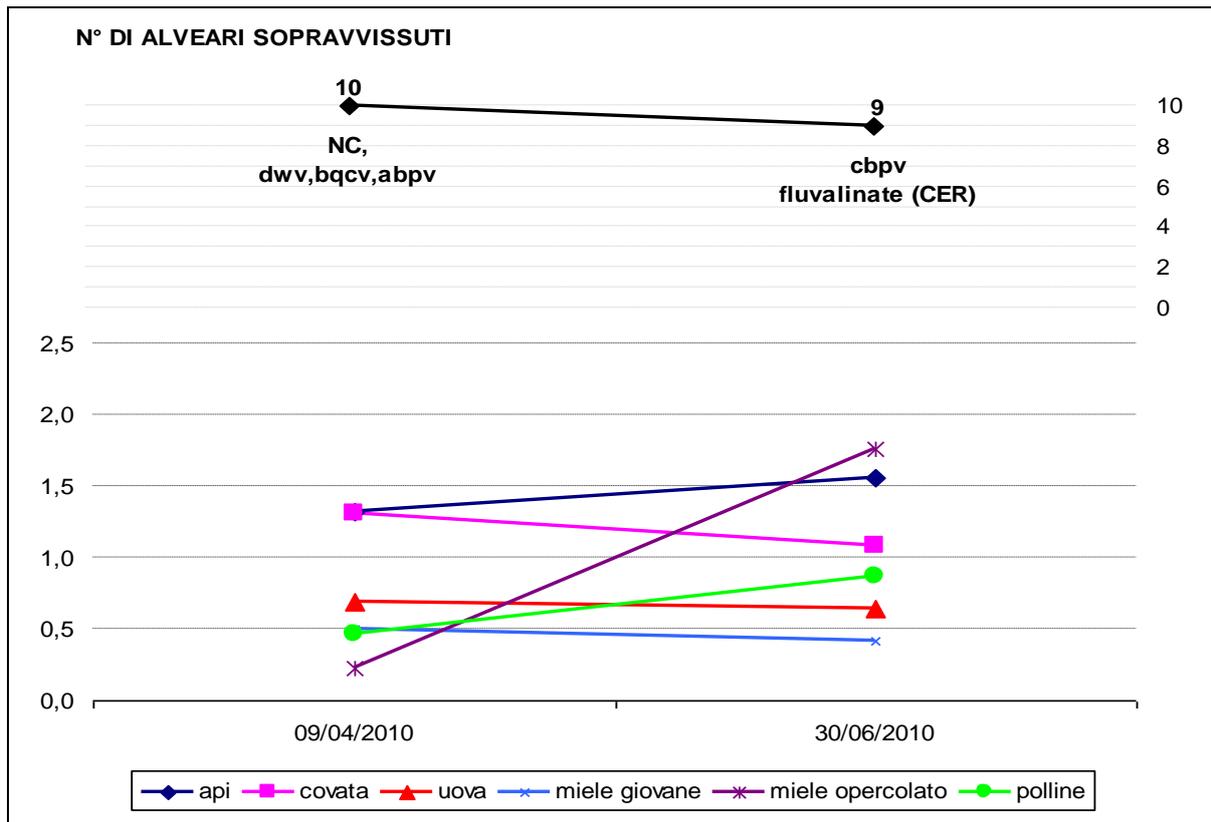


Grafico 8. Grafico riassuntivo relativo alla postazione SCL1-2. Legenda: APBV virus della paralisi acuta; BQCV virus della cella reale nera; CPBV virus della paralisi cronica; DWV virus delle ali deformi; SBV virus della covata a sacco;

La seconda postazione ha subito complessivamente la perdita di 2 famiglie nel corso del primo anno di studio. Durante il periodo invernale non ci sono state perdite di alveari. Il primo controllo del secondo anno di studio, mostra delle famiglie in condizioni paragonabili a quelle del precedente anno, con quantità scarse di api adulte e covate e scarse scorte di miele e polline. E' presente un abbondante fioritura di *Galactites tormentosa*, *Borago officinalis*, *Psoralea bituminosa*, *Tarassacum officinalis*, *Chrysanthemum coronarium*, *Oxalis pes-caprae*. Nelle gabbie underbaskett non si evidenziano segni di mortalità e l'analisi del nido non rivela la presenza di particolari patologie.

Il controllo estivo permette di constatare un generale miglioramento nelle condizioni delle famiglie che presentano un aumento nel numero di api adulte e una presenza pressoché costante nella quantità di covata e uova presenti nel nido. Le scorte di miele opercolato sono in quantità media e nettamente superiori rispetto al precedente controllo così come quelle di polline. Il miele giovane non mostra variazioni rilevanti. Dato il periodo e la notevole aridità della zona non è presente alcun tipo di fioritura. Non vengono evidenziate patologie evidenti e non sono presenti fenomeni di mortalità o spopolamenti.

MODULO SCL1-3

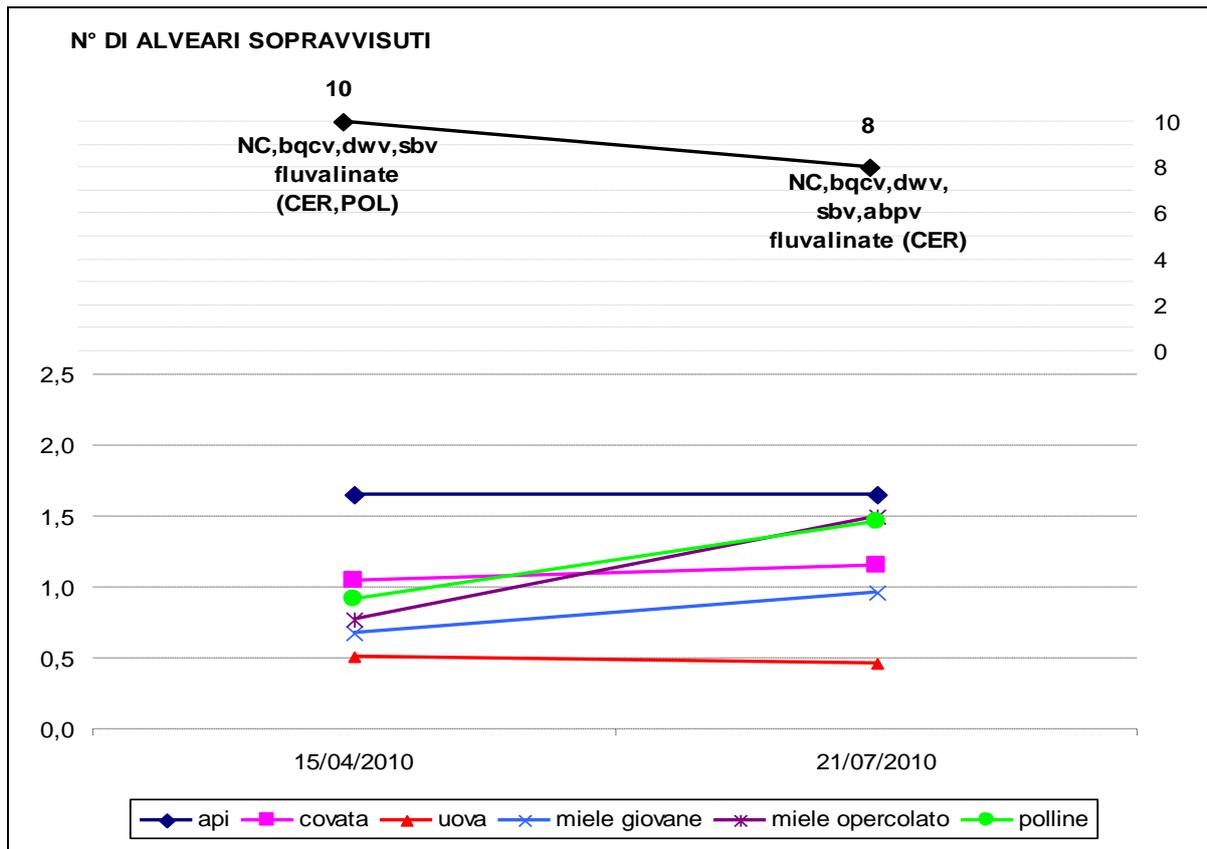


Grafico 9. Grafico riassuntivo relativo alla postazione SCL1-3. Legenda: APBV virus della paralisi acuta; BQCV virus della cella reale nera; CPBV virus della paralisi cronica; DWV virus delle ali deformi; SBV virus della covata a sacco;

Nella terza postazione non è stata registrata la perdita di alcuna famiglia né nel corso del primo anno del progetto né durante il periodo invernale. Tuttavia durante il primo controllo due delle famiglie analizzate sono sciamate e quindi andranno perdute. Il primo controllo del secondo anno di studio viene effettuato nel mese di aprile durante la fioritura degli agrumi (*Citrus sp.*) e della sulla (*Edysarum coronarium*). Sono presenti inoltre le tipiche fioriture primaverili della flora spontanea come la visnaga (*Amni visnaga*), Il crisantemo (*Chrysanthemum coronarium*) e la *Galactites tomentosa*. Dall'analisi dei nidi risulta una presenza media di api adulte e uno sviluppo ancora limitato delle covate. Le scorte di miele e polline sono in quantità scarsa e le uova sono presenti in buone quantità. Non si evidenziano patologie, mortalità né spopolamenti.

Il secondo controllo previsto viene effettuato nel mese di luglio in piena estate. L'unica fioritura presente è quella del rovo in fase finale e dell'eucaliptus mentre come fonte nettarifera si segnala anche la presenza di abbondante melata di agrumi. L'analisi delle Famiglie evidenzia la perdita complessiva di due famiglie, sciamate nel periodo primaverile, e la presenza di una famiglia orfana. Generalmente non si evidenziano variazioni rilevanti

rispetto al precedente controllo, in nessuna delle matrici analizzate. Un leggero incremento si nota nella quantità di polline e miele opercolato. Dall'analisi dei nidi non emergono segni evidenti di patologie e l'esame delle gabbie underbasket non rivela tracce di mortalità.

MODULO SCL1-4

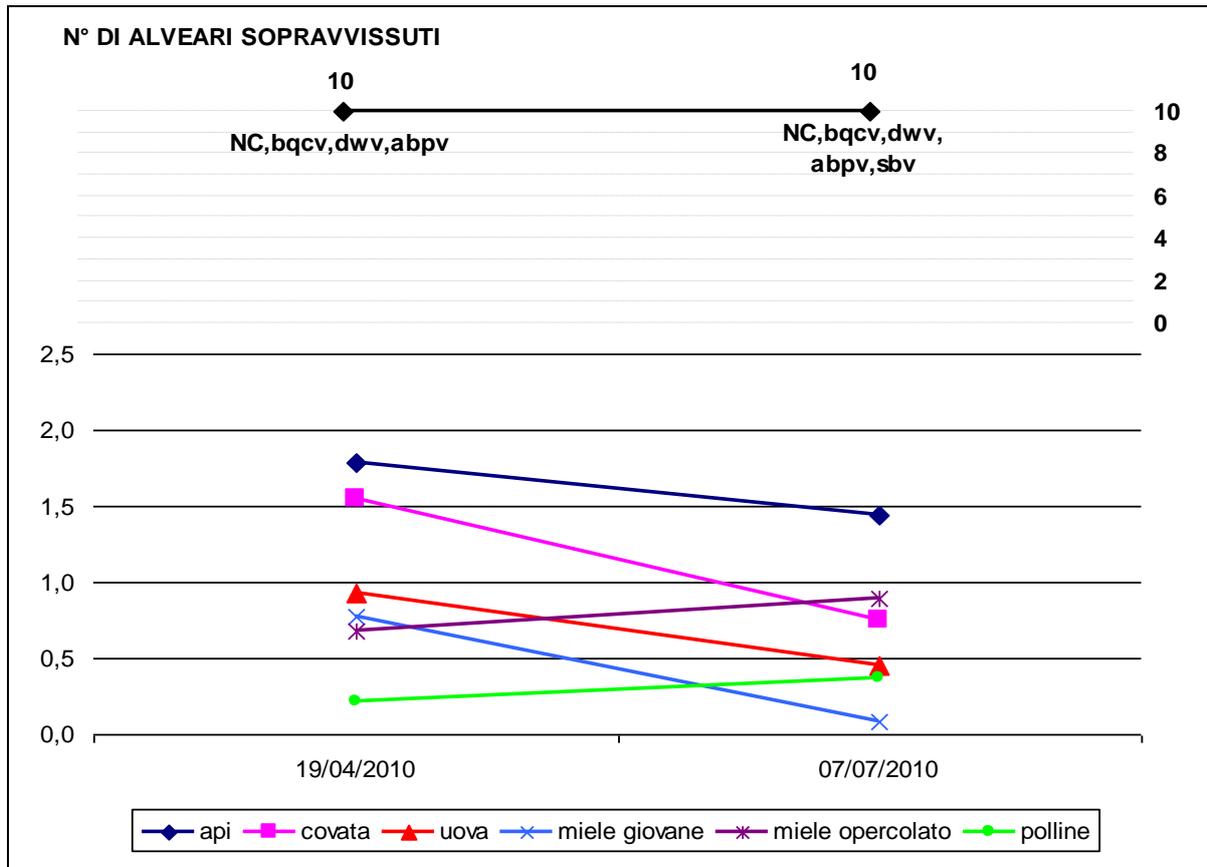


Grafico 10. Grafico riassuntivo relativo alla postazione SCL1-4. Legenda: APBV virus della paralisi acuta; BQCV virus della cella reale nera; CPBV virus della paralisi cronica; DWV virus delle ali deformi; SBV virus della covata a sacco;

Nella quarta postazione vengono sostituite tre famiglie, di cui due perdute durante il periodo invernale. Nel corso del primo controllo sono presenti alcune tipiche fioriture primaverili (*Galactites tormentosa*, *Echium plantagineum*, *Silene sp.* *Chrysanthemum coronarium*). Le famiglie appaiono in ripresa dopo il periodo invernale e presentano una quantità media di api adulte e covata ed una presenza rilevante di uova. Le scorte di polline e miele risultano in generale piuttosto scarse. Non vengono rilevate tracce di mortalità né segni visibili di patologie o spopolamenti.

Durante il secondo controllo sono presenti tutte le dieci famiglie dello studio. Il controllo estivo eseguito nel mese di luglio evidenzia un calo nella quantità di api adulte, covata uova e scorte di miele giovane, rispetto al precedente controllo. Praticamente quasi costanti sono le scorte di polline e miele opercolato. Non vengono evidenziati fenomeni di spopolamenti o mortalità e dall'analisi del nido non si notano segni evidenti di patologie. Non sono presenti fioriture e di conseguenza mancano fonti nettariifere per il pascolo delle api.

7.1.4. Analisi di laboratorio

PRESENZA DI INQUINANTI E PATOLOGIE

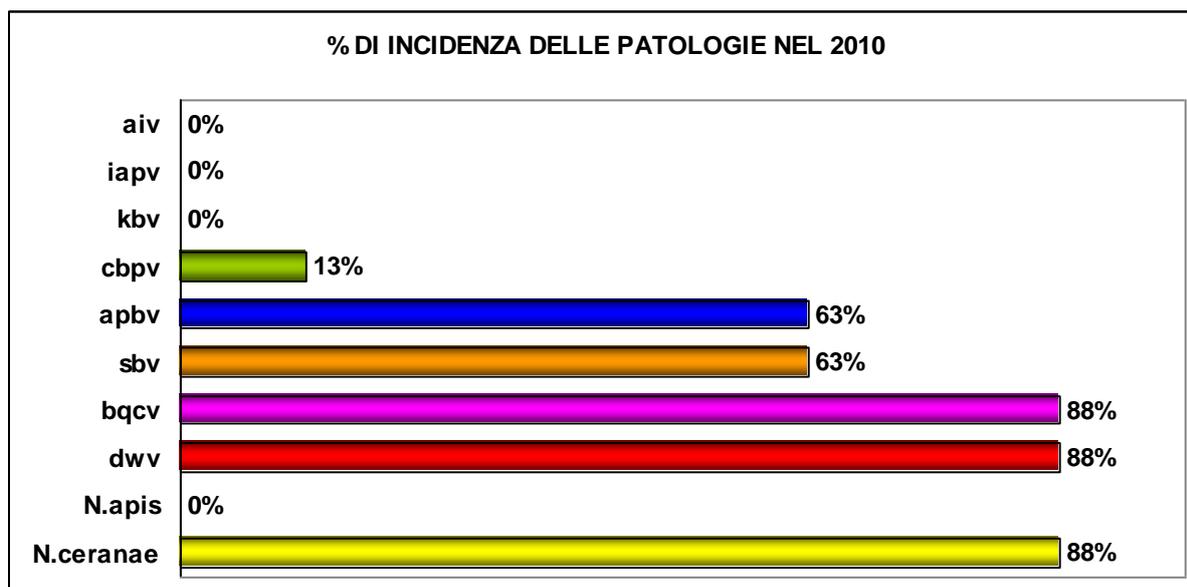


Grafico 11. Percentuale di incidenza delle patologie durante il secondo anno di studio.

SCL1-1: Dal punto di vista sanitario i campioni relativi al primo sopralluogo sono risultati positivi al *Nosema ceranae* ed a tre degli otto virus ricercati, il virus delle ali deformi (DWV), della cella reale nera (BQCV) e della covata a sacco (SBV). È assente il *N.apis*.

Nei campioni del secondo sopralluogo è ancora presente il *N. ceranae*, assente il *N. apis* e ai tre virus trovati in precedenza si aggiunge il virus della paralisi acuta (ABPV).

L'analisi chimica per la ricerca di pesticidi e neonicotinoidi, non ha rilevato tracce di contaminanti in nessuno dei campioni analizzati.

SCL1-2: I campioni relativi al primo controllo sono positivi al *N.ceranae* e ai virus delle ali deformi (DWV), della cella reale nera (BQCV) e al virus della paralisi acuta (ABPV). È assente il *N. apis*. Nel secondo controllo non si rileva presenza di nosema e viene ritrovato solo il virus della paralisi cronica (CPBV).

All'analisi chimica è risultato positivo un campione di cera relativo al secondo sopralluogo in cui viene ritrovato Fluvalinate in concentrazione pari a 8ppb.

SCL1-3: Entrambi i campioni dei due controlli sono risultati positivi al *N. ceranae* e negativi al *N. apis*. Nei campioni relativi al primo sopralluogo sono presenti i virus delle ali deformi (DWV), della cella reale nera (BQCV) e della covata a sacco (SBV), mentre in quelli del secondo campionamento oltre ai tre già citati si ritrova anche il virus della paralisi acuta (ABPV).

Per quanto riguarda la presenza di pesticidi, nei campioni primaverili si ritrova il fluvalinate sia nel campione di cera che in quello di polline con concentrazioni rispettivamente di 15ppb e 67ppb. Nei campioni estivi risulta positivo solo il campione di cera sempre al fluvalinate ma con concentrazioni decisamente più elevate, pari a 3000ppb.

SCL1-4: Anche in questo caso tutti i campioni analizzati risultano positivi al *N.ceranae* e negativi al *N. apis*. Nel caso dei virus, si ritrovano il virus delle ali deformi (DWV), della cella reale nera (BQCV) e il virus della paralisi acuta (ABPV) nei campioni del primo controllo e gli stessi più il virus della covata a sacco (SBV) nei campioni estivi.

L'analisi chimica non ha rilevato tracce di inquinanti in nessuno dei campioni esaminati.

Modulo	SCL 1 (2009) (4 campionamenti)					SCL 1 (2010) (2 campionamenti)				
Postazione	1	2	3	4	5	1	2	3	4	
Neonicotinoidi	Camp. neg.	Camp. neg.	Camp. neg.	1 Camp. api pos a Clo 103 ppb (II);	Camp. neg.	Camp. neg.	Camp. neg.	Camp. neg.	Camp. neg.	
Pesticidi	1 Camp. cera pos. a Fluva 20 ppb (III) 1 Camp. api pos. a Cou 218 ppb (III)			1 Camp. cera pos. a Chv 63 ppb, Fluva 25 ppb (I); 3 Camp. api pos. a, Fluva 53 ppb (II); Fluva 50 ppb (III); Cou 70 ppb (IV)	2 Camp. cera pos. a Acr 33 ppb (I); Cou 102 ppb (III); 1 Camp. api pos. a Cou 54 ppb (III) 1 Camp. polline pos. a Acr 325 ppb (II)		1 Camp. cera pos. a Fluva 8 ppb (II)	1 Camp. polline pos. a Fluva 67 ppb (I) 2 Camp. cera pos. a Fluva 15 ppb (I); Fluva 3000 ppb (II);		
<i>Nosema apis</i>	Camp. neg.	Camp. neg.	Camp. neg.	Camp. neg.	Camp. neg.	Camp. neg.	Camp. neg.	Camp. neg.	Camp. neg.	
<i>Nosema ceranae</i>	4 Camp. pos. (I, II, III, IV)	4 Camp. pos. (I, II, III, IV)	3 Camp. pos. (I, II, III)	3 Camp. pos. (I, II, IV)	3 Camp. pos. (II, III, IV)	2 Camp. pos. (I, II)	1 Camp. pos. (I)	2 Camp. pos. (I, II)	2 Camp. pos. (I, II)	
Virus	SBV (II); DWV, BQCV (III); BQCV (IV)	DWV, BQCV (III); DWV, BQCV (IV)	BQCV , (I); BQCV , (II) DWV, BQCV , (III) DWV, (IV)	SBV (I); DWV (II); BQCV (III); DWV, BQCV (IV)	DWV, BQCV , SBV (II); DWV, BQCV , APBV (III); DWV (IV)	DWV, BQCV , SBV (I); DWV, BQCV , SBV, ABPV (II);	DWV, BQCV , APBV (I); CBPV (II)	DWV, BQCV , SBV (I); DWV, BQCV , SBV, ABPV (II)	DWV, BQCV , APBV (I) DWV, BQCV , SBV, APBV (II)	

Valore prot. polline (% N)	19,43 (I)	20,75 (III)	22,85 (I, II, III)	17,69 (I, II, III)	23,56 (II)	19,03 (I, II)	22,12 (I)	22,31 (I, II)	No Dati	
TOTALE alveari morti (m) o spopolati (s).	1 f.II, m, III 2 m, Inv	2 f II, m, III		1, orf. III, m IV 2 m Inv	1,m III <i>V.orientalis</i>	1, sc.II	1 m II	2 sc II		

Tabella 7 - Risultati delle analisi di laboratorio effettuate nel 2009 e 2010. **Acr**= Acrinatrina **Chv**= chlorpheninfos; **Clo**= Clothianidin; **Cou**= coumaphos; **Fluva**= fluvalinate. **(I)**= 1° controllo; **(II)**= 2° controllo; **(III)**= 3° controllo; **(IV)**= 4° controllo; **(Inv.)**= periodo invernale. **BQCV**= virus della cella reale nera; **DWV**= virus delle ali deformi; **SBV**= virus della covata a sacco; **APBV**= virus della paralisi acuta. Per Virus, *Nosema ceranae* e pesticidi sono riportati solo i dati dei campioni positivi.

Parametro	2009 (4 campionamenti)	2010 (2 campionamenti)
Virus (tipi di e frequenza)	Rinvenuti 4 tipi diversamente presenti nell'80% dei campioni analizzati	Rinvenuti 5 tipi diversamente presenti nell'100% dei campioni analizzati
<i>Nosema ceranae</i>	Positivi l'85% dei campioni analizzati	Positivi l'87,5% dei campioni analizzati
Principi attivi	Riscontrati 5 diversi p.a. (coumaphos, chlorpheninfos, clothianidin, fluvalinate, acrinatrina) in 10 campioni positivi [cera: 25% (4 su 16) campioni pos. sul totale analizzati; api: 25% (5 su 20) campioni pos. sul totale analizzati; polline: 20% (1 su 5) campioni pos. sul totale analizzati]	Riscontrato 1 p.a. (fluvalinate) in 4 campioni positivi [cera: 50% (3 su 6.) campioni pos. sul totale analizzati; api: 0% (0 su 10) campioni pos. sul totale analizzati; polline: 25% (1 su 4) campioni pos. sul totale analizzati]
Valore proteico polline (% media di N)	20,86	21,15
Tot. Alveari morti o spopolati	9 morti	4 morti

Tabella 8 – Dati riassuntivi

	2009						2010					
	API	%	CERA	%	POLLINE	%	API	%	CERA	%	POLLINE	%
TOTALE CAMPIONI ANALIZZATI	20		16		6		8		6		4	
P.A	4	20	4	25	1	16,7	0	0	3	50	1	25
N.cerane	17	85					7	87,5				
Virus	15	75					8	100				

Tabella 9. totale dei campioni delle diverse matrici analizzati nel corso dei due anni di studio.

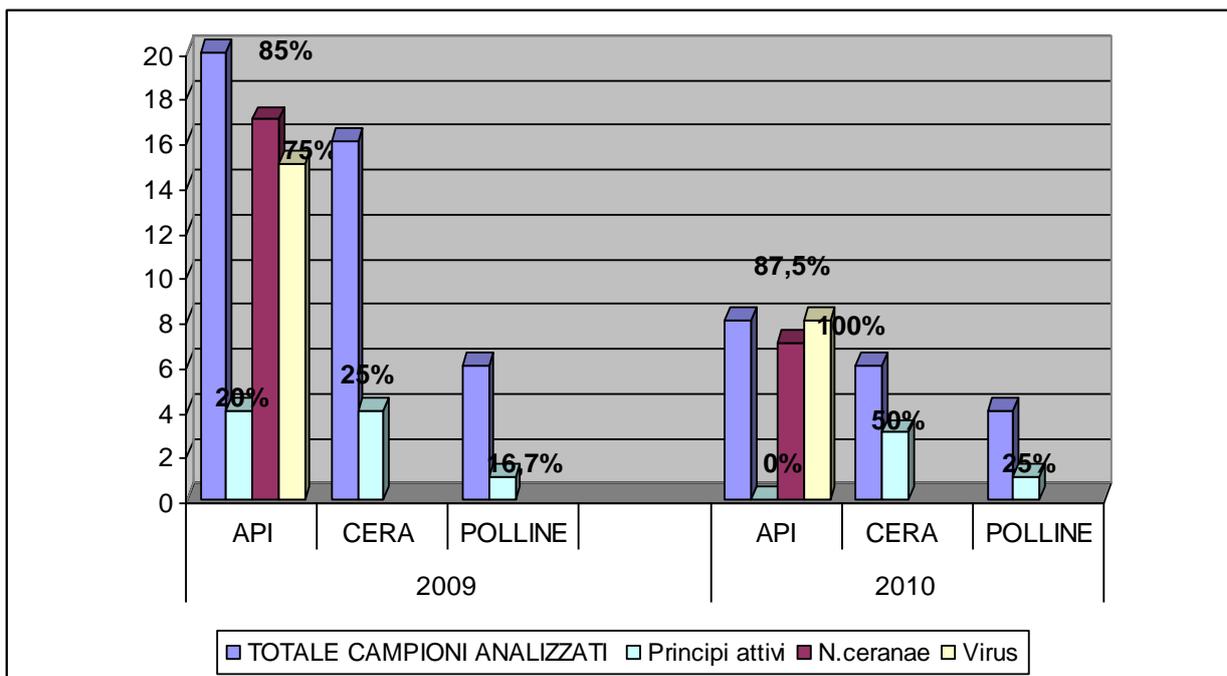


Grafico 12. percentuali di positività dei campioni analizzati.

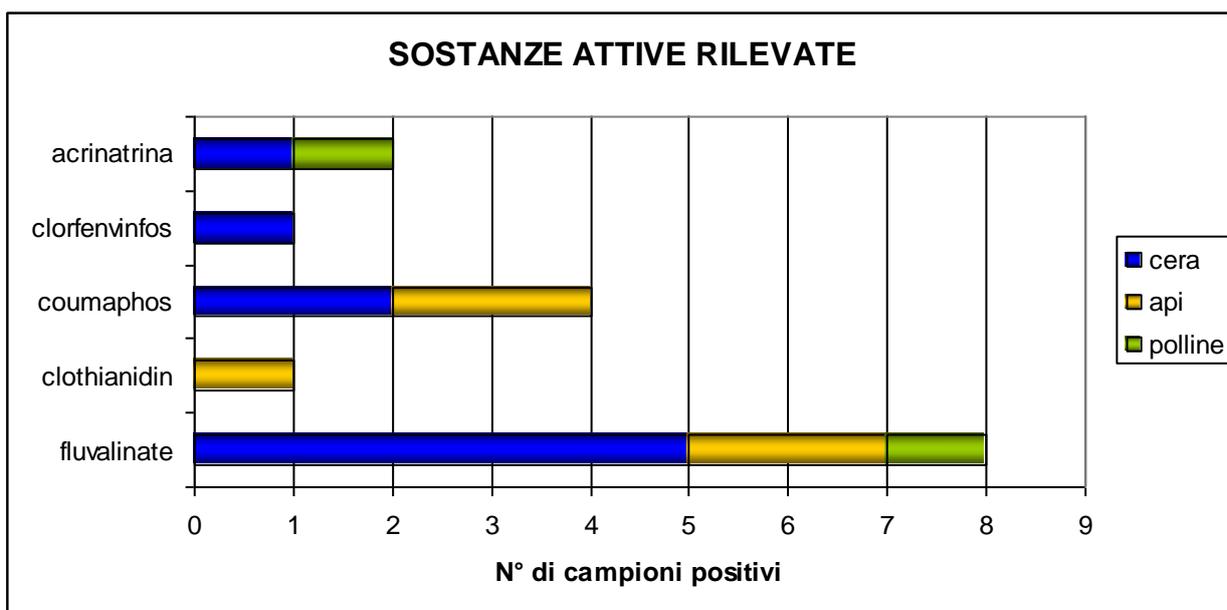


Grafico 13. Sostanze attive rilevate dalle analisi di laboratorio nei due anni di studio

7.1.5 DISCUSSIONI

Nel corso del primo anno di studio i dati sulla valutazione della forza della famiglie hanno messo in evidenza andamenti pressoché sovrapponibili sia per le diverse matrici che per le singole postazioni. La quantità di api adulte presenti nel nido mostra generalmente dei valori medi durante il periodo primaverile che tendono a diminuire con l'avanzare della stagione estiva, sia a causa della riduzione di covata legata al diminuire delle fioriture, sia in relazione al fatto che la durata media della vita dell'insetto adulto è minore nel periodo di attività a causa della maggiore attività. In quasi tutte le postazioni si nota infatti un generale incremento nella popolosità delle famiglie durante il controllo autunnale. I sopralluoghi effettuati nel periodo primaverile hanno evidenziato in generale alte percentuali di covata e api in tutte le postazioni visitate. Lo sviluppo della covata e di conseguenza la presenza delle uova un picco primaverile che tende a decrescere gradualmente sino ad un minimo di presenza in concomitanza del periodo estivo quando, a causa della mancanza di fonti nettariifere le famiglie vanno in blocco di covata e la regina smette di deporre. Successivamente infatti il controllo autunnale mette in evidenza generalmente una ripresa dell'attività di deposizione delle uova ed un conseguente incremento della quantità di covata presente. Le scorte di polline e miele giovane seguono l'andamento della covata oltre che ovviamente la presenza di fonti di pascolo. Infatti spesso nel periodo di maggiore sviluppo delle covate all'interno del nido si ritrovano quantità limitate di tali scorte a causa dell'elevato consumo sia per l'alimentazione delle larve che delle api adulte. La quantità di miele opercolato tende invece a mantenersi perlopiù costante nel corso dell'anno con dei valori minimi alla fine del periodo invernale quando appunto vi è un consumo delle scorte del nido non compensato da nuove importazioni.

Benché nel secondo anno di studio siano stati effettuati solamente due campionamenti è comunque possibile notare come l'andamento generale degli alveari rilevato nei primi due campionamenti dell'anno sia sovrapponibile a quello del precedente anno. Si nota infatti una generale diminuzione delle api adulte e dello sviluppo delle covate e della quantità di uova che al massimo rimangono in quantità costante e un lieve incremento della quantità di scorte dovuto sia all'importazione che al minore consumo effettuato. La matrice miele opercolato anche in questo caso rimane tendenzialmente costante tranne nel caso della postazione SCL1-2 in cui si passa da una quantità pressoché nulla nel periodo primaverile ad una quantità media nel controllo successivo. Questo è da mettere in relazione con il fatto che non essendo stati posizionati i melari sulle famiglie le api hanno accumulato il miele all'interno dei telaini da nido. Oltre a ciò nel caso di questa postazione influisce anche il fatto che le fioriture

nettariifere sono notevolmente limitate sia in quantità che nella durata temporale poiché l'unica vera fioritura abbondante è rappresentata dalla *Galactites tomentosa* che già a fine maggio è in fase finale. Successivamente a questa sono presenti solamente rare e sporadiche fioriture che non possono certo consentire di riempire i telaini di scorta. Pertanto già nel controllo estivo è presente una notevole quantità di miele che essendo stato raccolto in primavera è già stato opercolato.

Per quanto riguarda le mortalità, in entrambi gli anni di studio non sono stati evidenziati e rilevati fenomeni di mortalità o spopolamenti e da nessuno dei cinque apicoltori è stato segnalato un fenomeno sospetto. Complessivamente durante il primo anno sono state perse 9 famiglie (vedi tabella) ma nessuna di queste ha presentato sintomatologie correlabili a fenomeni di avvelenamento o alla sindrome da spopolamento degli alveari (CCD). Infatti quattro di queste famiglie sono morte a causa del fatto che hanno perduto la regina e di conseguenza sono diventate fucairole (SCL1-1, SCL1-2, SCL1-4) e si sono estinte, quattro sono morte durante il periodo invernale (SCL1-1, SCL1-4) probabilmente a causa di elevata infestazione da *nosema* e *varroa* e virus correlati, ed una ha subito una massiccia predazione ad opera della *V.orientalis* (SCL1-5) e non è stata in grado di reagire.

Anche nel secondo anno di lavoro, benché i dati non siano completi, non sono stati rilevati fenomeni di mortalità e spopolamenti. Complessivamente sono morte 4 famiglie di cui tre a causa della sciamatura e una perché si è orfanizzata.

Dal punto di vista sanitario durante il primo anno l'85% dei campioni analizzati è risultato positivo al *N. ceranae*, mentre risulta assente il *N.apis* e il 75% dei campioni è risultato positivo ai virus presenti in varie combinazioni. In particolare il virus più diffuso è il virus della cella reale nera presente nel 55% dei campioni e il virus delle ali deformi nel 50% dei casi. Il virus della covata a sacco interessa invece il 15% dei campioni e solo nel 5% viene ritrovato il virus della paralisi acuta. Tuttavia la presenza di tali infezioni non era stata rilevata in campo a causa della assenza di una sintomatologia evidente. Se si considera però il fatto che la maggior parte delle perdite è stata causata dalla orfanizzazione delle famiglie risulta plausibile mettere in relazione la presenza massiccia del virus *bqcv* che può avere determinato nelle famiglie infestate, l'incapacità di sostituire la propria regina e si siano quindi estinte. Per quanto riguarda il secondo virus più diffuso il *dwv*, essendo legato alla presenza della *varroa* negli apiari, non stranizza che sia presente nella metà dei campioni perché comunque malgrado i trattamenti effettuati, l'acaro è sempre presente all'interno delle famiglie. Va rilevato il fatto che malgrado la presenza di tali patologie le famiglie non hanno mostrato segni di sofferenza e non sono state registrate perdite rilevanti negli apiari monitorati. Questo

lascia presupporre che esse comunque non causino particolari problematiche o che comunque le famiglie stesse riescano a gestire e contenere le infezioni che rimangono latenti all'interno dell'alveare.

Nel corso del secondo anno le analisi di laboratorio hanno evidenziato un generale incremento nella presenza delle patologie. In particolare il *N.ceranae* è presente nell'88% dei campioni e il 100% di essi risulta contaminato da virus in diverse combinazioni.

Il virus delle ali deformi è presente nell'88% dei casi così come il virus della cella reale nera, mentre si riscontra un notevole incremento nella presenza del virus della covata a sacco e nel virus della paralisi acuta entrambi presenti nel 63% dei campioni. Inoltre è presente anche il virus della paralisi cronica (13%) che non era stato rilevato nei campioni del 2009. Il *N. apis* è praticamente stato soppiantato dal *N.ceranae*. e non viene ritrovato in nessuno dei campioni analizzati. Non è stata rilevata la presenza di KBV, IAPV e AIV.

Dai dati ottenuti dall'analisi chimica per pesticidi e neonicotinoidi nelle api, emerge come nel primo anno di monitoraggio in un numero molto limitato di campioni controllati (4/20) siano state rilevate tracce residuali di alcuni principi attivi, il fluvalinate e il coumaphos due acaricidi normalmente utilizzati in apicoltura per la gestione della varroasi. In un solo campione relativo alla postazione SCL1-4 sono stati riscontrati residui di neonicotinoidi (clothianidin) sebbene in campo non si siano verificati fenomeni visibili di avvelenamento. La presenza limitata di contaminazione sulle api è da mettere in relazione anche con il fatto che difficilmente il principio attivo permane a lungo sull'insetto e che per evidenziarlo è necessario che la campionatura sia effettuata subito dopo la contaminazione.

Nel secondo anno di monitoraggio in nessuno degli otto campioni di api inviati per le analisi sono state ritrovate tracce di contaminanti.

Per quanto riguarda le analisi effettuate sui campioni di cera, dei 16 campioni analizzati durante il primo anno quattro (25%) risultano contaminati da residui. Nella maggior parte dei casi si tratta di farmaci normalmente utilizzati in apicoltura nella lotta alla varroasi (coumaphos e fluvalinate) e presenti sempre in basse concentrazioni. Si evidenzia che in alcuni casi sono state rilevate quantità di acrinatina e clorfenvinfos, principi attivi di farmaci non autorizzati in apicoltura, ma di uso diffuso presso gli apicoltori. Tale uso innalza il livello di rischio di contaminazione con sostanze tossiche dei prodotti apistici, con una ricaduta non solo sui futuri consumatori, ma anche per api e operatori che li utilizzano. In oltre la presenza di sostanze inquinanti nella matrice cera indica comunque una contaminazione più profonda e prolungata dell'ambiente alveare, proprio perché la sostanza assorbita dalla cera persiste per un periodo maggiore all'interno dei favi.

Nel successivo anno di campionamenti, il 50% dei campioni analizzati (3 su 6) era contaminato da residui. Tuttavia in questo si trattava sempre di sostanze lecite (Fluvalinate) peraltro in basse concentrazioni. In un solo caso, nella stazione SCL1-3 sono presenti alte concentrazioni di tale principio attivo (3000 ppb) spiegabili con un probabile fenomeno di accumulo dovuto a trattamenti prolungati nel tempo.

La matrice polline, è risultata contaminata nel 17% (1 su 6) dei casi il primo anno e nel 25% (1 su 4) il secondo anno. Le sostanze rilevate sono nel primo campione l'acrinatrina, nel secondo il fluvalinate. La contaminazione del polline può avere due diversi significati, da un lato può indicare una contaminazione ambientale con cui l'ape entra in contatto durante l'attività di bottinamento sui fiori e che viene così introdotta nel nido, ovvero una più profonda contaminazione dell'ambiente interno all'alveare. In questo caso, poiché si tratta di una sostanza acaricida che non ha un largo utilizzo in agricoltura, e poiché tale sostanza viene già precedentemente ritrovata in un campione di cera prelevato nella stessa stazione, è plausibile ritenere che si tratti di una contaminazione più legata all'ambiente interno all'arnia che non al contesto esterno.

Anche nel caso del secondo campione di polline contaminato relativo al secondo anno, possono valere le medesime considerazioni poiché anche in questo caso la contaminazione interessa anche la matrice cera.

7.2. PROVA DI COMPARAZIONE

7.2.1. Risultati

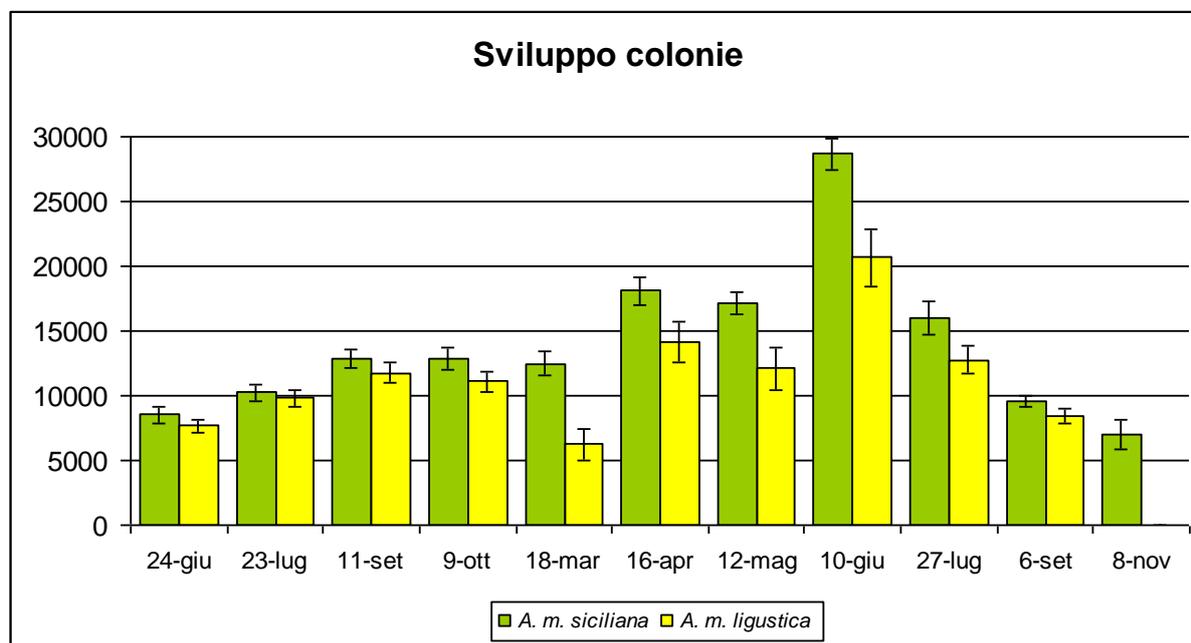


Grafico 14. Andamento dello sviluppo delle colonie di api durante il periodo di studio espresso come numero di api presenti.

Il numero di api presenti all'interno delle famiglie varia nell'arco dell'anno seguendo l'andamento stagionale ed è caratterizzato da una crescita graduale a partire dal periodo primaverile sino a raggiungere dei picchi estivi con valori anche superiori alle 20.000 api per famiglia che iniziano gradualmente a decrescere per arrivare ai valori minimi che si rilevano nel periodo invernale quando le famiglie si contraggono e risultano composte da poche migliaia di api. Lo sviluppo delle colonie di entrambi gli apiari segue un andamento di questo tipo come si può vedere nel grafico. Dai dati rilevati in campo per quello che riguarda lo sviluppo delle famiglie, durante tutto il periodo di studio il numero di api presenti risulta generalmente maggiore nelle colonie di *Apis mellifera siciliana* rispetto a quelle di *A. m. ligustica* con picchi più significativi nel periodo estivo.

Oltre tutto il numero complessivo di famiglie perdute nel corso dell'anno è decisamente maggiore nel caso delle api italiane poiché alla fine del secondo anno vengono perdute tutte le 24 famiglie inizialmente presenti.

Per quanto riguarda lo sviluppo della covata, anche in questo caso è possibile notare il classico andamento sinusoidale legato all'andamento stagionale. Durante i primi controlli effettuati nel primo anno di studio si nota un complessiva uniformità nella quantità di covata presente nelle famiglie di entrambe le sottospecie esaminate che si mantiene sino al periodo primaverile. Successivamente è possibile notare un generale incremento nello sviluppo delle

covate di entrambe le sottospecie e l'ape siciliana mostra dei valori significativamente superiori solo in concomitanza del periodo primaverile quando raggiunge valori notevoli di circa 60.000 celle di covata. Successivamente la differenza tra le due api non risulta significativa (grafico 14)

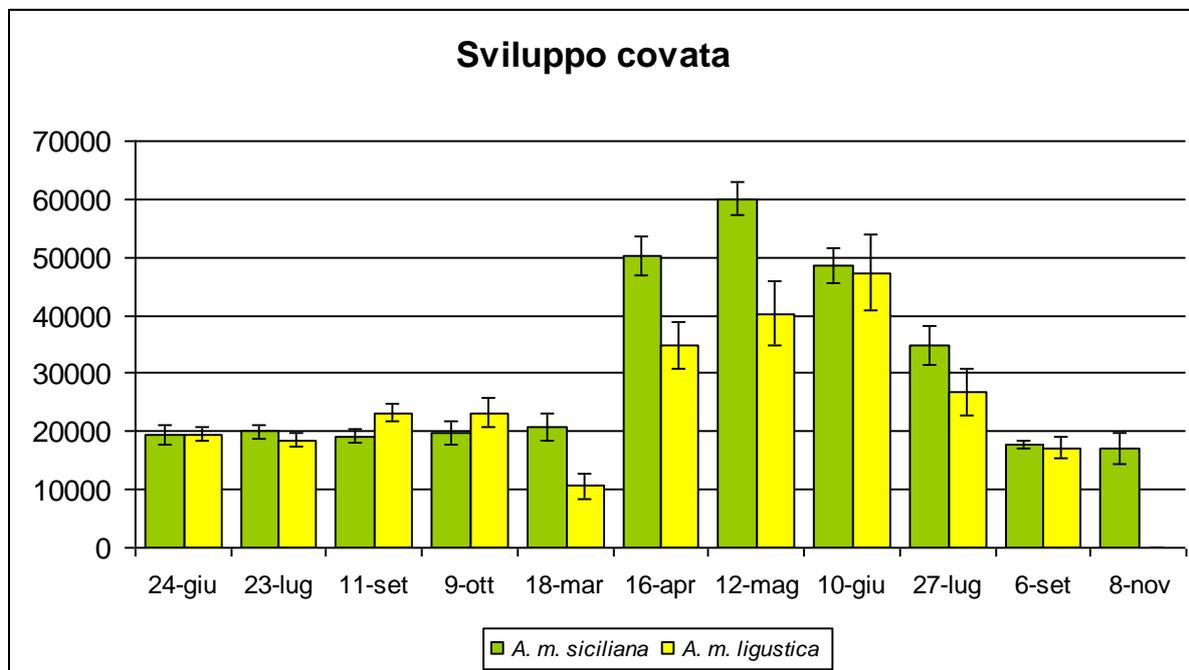


Grafico 15. Andamento dello sviluppo della covata espresso come numero di celle di covata, nelle due sottospecie oggetto di studio.

La quantità di miele presente all'interno del nido è risultata assolutamente paragonabile tra le due sottospecie oggetto dello studio con differenze decisamente poco accentuate e un andamento anche in questo caso legato all'andamento stagionale. Nel corso del secondo anno la sottospecie ligustica presenta una quantità leggermente ma costantemente maggiore di miele rispetto alla sottospecie siciliana.

Nel caso del polline l'andamento risulta meno omogeneo nel corso dell'anno e le differenze tra le due sottospecie meno uniformi. In generale si nota un maggiore accumulo di polline durante il periodo estivo autunnale nella sottospecie italiana mentre nella siciliana si ha una maggiore presenza di polline nel nido durante il periodo primaverile. Infatti il picco massimo di circa 12 sestini di miele per la siciliana viene rilevato durante uno dei controlli primaverili (18 marzo 2009) mentre per la ligustica lo si rileva il 27 luglio nel pieno della stagione estiva. Tuttavia anche in questo caso le differenze tra le due sottospecie non risultano particolarmente significative sia in relazione alle quantità assolute che al generale andamento durante il corso dell'anno.

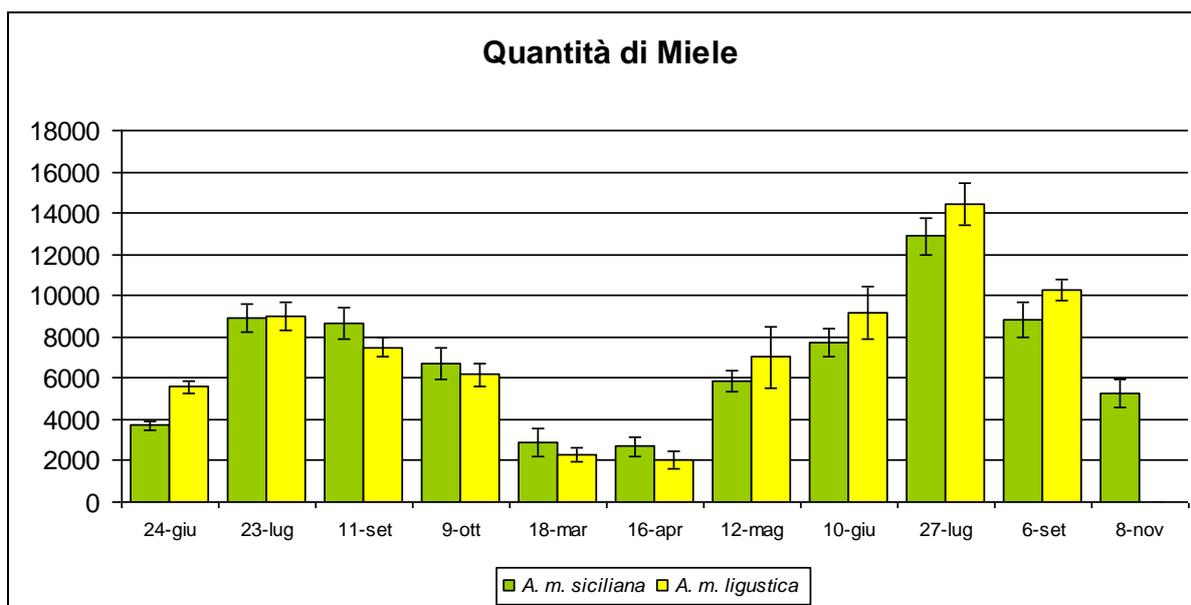


Grafico 16. Quantità di miele presente nel nido durante il corso dei due anni di ricerca.

Anche nel caso delle scorte di polline, i dati raccolti dai controlli in sesti non rilevano significative differenze tra le due sottospecie di ape. La quantità di polline presente all'interno del nido varia in relazione alla stagione e alla disponibilità di fioriture e presenta un picco in corrispondenza del periodo primaverile in cui ha inizio l'importazione con un successivo calo dovuto allo sviluppo della covata ed al conseguente aumento di consumo di tale matrice per l'allevamento delle larve. Successivamente viene registrato un secondo picco durante il periodo estivo che corrisponde non tanto ad un incremento di importazione, poiché in tale periodo le fioriture risultano scarse o assenti, quanto più ad una diminuzione nel consumo di quello precedentemente importato legato alla contrazione delle covate nel periodo estivo.

In generale comunque i dati mostrano un andamento sovrapponibile tra le due sottospecie nella variazione della quantità di polline presente all'interno del nido nel corso del periodo di studio poiché le occasionali differenze nelle quantità incamerate dall'una o dall'altra sottospecie non sono costanti e non si ripetono in maniera uniforme nel corso dell'anno.

Dall'analisi del grafico si nota come la sottospecie siciliana abbia mediamente una quantità di polline maggiore durante il periodo primaverile mentre la sottospecie ligustica tenda a mantenere quantità superiori durante il periodo estivo-autunnale.

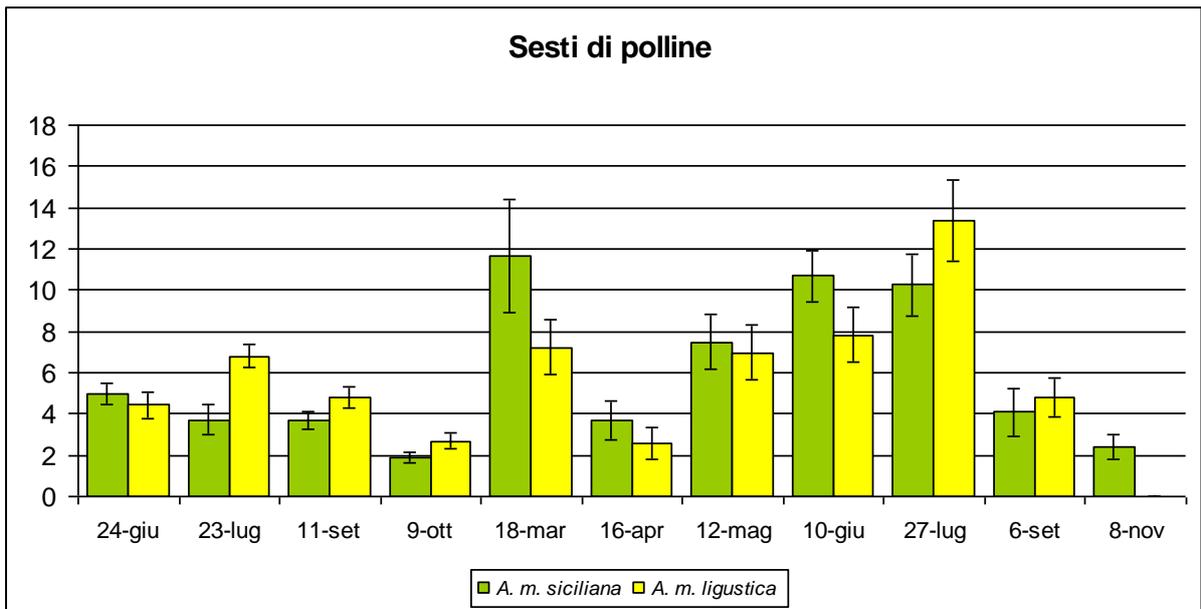


Grafico 17. Quantità di polline presente nel nido espressa in sesti di polline

Nel corso del periodo di studio, come si evince dal grafico, è stato possibile riscontrare una sostanziale differenza nella sopravvivenza delle famiglie di api delle due sottospecie. Infatti dopo il primo inverno nelle api della sottospecie ligustica si sono riscontrate ingenti perdite poiché durante il periodo invernale sono andate perdute quasi la metà delle famiglie, mentre ciò non si è verificato nel caso delle api siciliane. La mortalità si è poi mantenuta pressoché costante nel periodo primaverile-estivo in entrambe le sottospecie sino a quando durante il successivo autunno sono andate perdute tutte le famiglie di *A.m.ligustica* presenti nell'apiario. Nel caso delle sottospecie siciliana non sono state registrate perdite paragonabili poiché sono andate perdute complessivamente 9 famiglie.

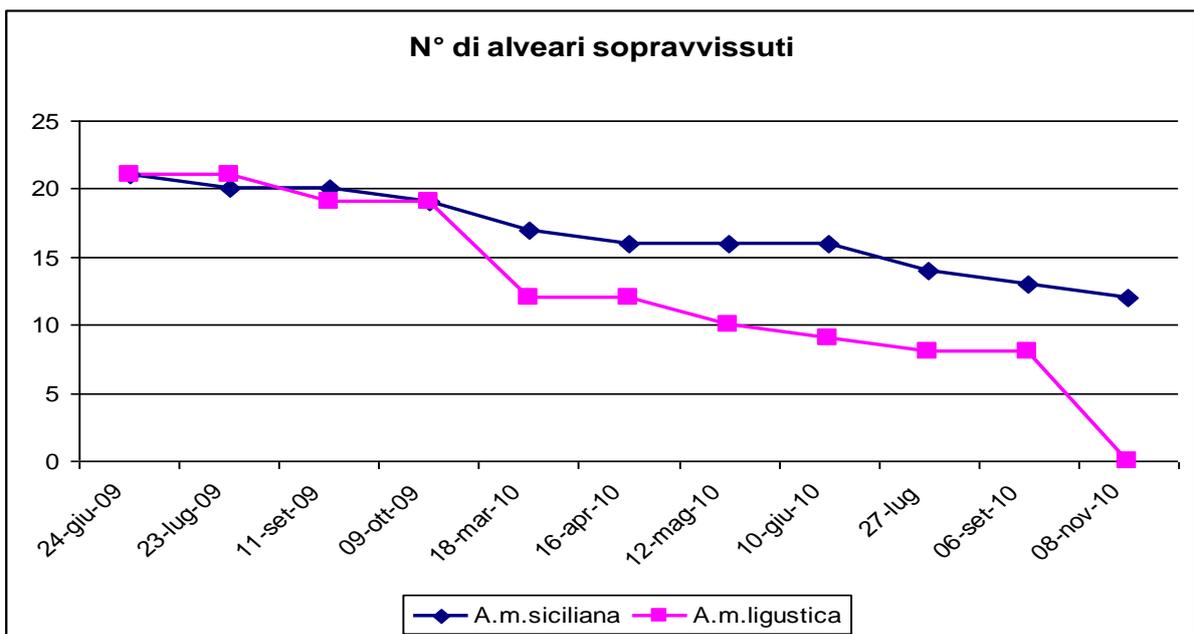


Grafico 18. Andamento della sopravvivenza delle colonie di api.

A.m. siciliana					
				UMIDITA'	
	FAMIGLIA	KG	N° MELARI	DISOPERCOLATO	OPERCOLATO
giugno	3SB	66,6	4	16,6	16
	7SB	64	4	19	20
	10SC	87,5	5	19,3	18,1
	17SL	68,5	4	21	21,2
	20SL	76,6	4	17	15,5
	15SC	45,6	3	17,2	15,8
	2SB	102,5	5	17,5	16
	18SC	48,5	3	18	19
	5SB	36,2	2	16,5	17,1
	8SB	40,5	3	19,2	17,5
	1SB	80,5	5	17,4	18,2
	19SC	68,5	4	18,3	16,8
	14SC	100,4	6	18,3	17,8
	4SB	128,4	8	17,5	16
	6SB	13	2	20,3	
luglio	3SB	17	1		17,9
	7SB	14,5	1		16
	10SC	18	1		17
	17SL	10	1		19
	20SL	6	1		19,5
	15SC	14	1		19,5
	2SB	16	1		18,2
	18SC	9	1		19
	5SB	11	1		18,1
	8SB	12,5	1		14,8
	1SB	12,5	1		17
	19SC	13,5	1		15,5
	14SC	16	1		16,9
	4SB	22	1		18,2
	6SB	10	1	20,2	
totale		1229,3	77		
media		41,0			

Tabella 10. Quantità di miele prodotta dalla sottospecie *A.m.siciliana*

<i>A.m. ligustica</i>					
				UMIDITA'	
	FAMIGLIA	KG	N° MELARI	DISOPERC.	OPERC.
giugno	5LP	50,4	3	21,9	17,2
	20LA	31,5	2	22,9	20,8
	13LA	98,2	5	20,3	19,4
	21LF	39,3	3	22	17,3
	6LF	11,3	1		
	8LP	88,6	5	19,1	18
	4LF	82,6	5	22,8	16
luglio	5LP	15,2	1		18,9
	20LA	8,2	1		19,2
	13LA	19	1		18,7
	21LF	17	1		19
	12LA	10,3	1		21,5
	6LF	VUOTO	1		
	8LP	16,6	1		22,5
	4LF	15	1		21,1
totale		471,6	32		
media		35,9			

Tabella 11. quantità di miele prodotta da *A.m. ligustica*.

La quantità media di miele prodotta nell'arco della stagione produttiva dai due apiari è risultata paragonabile poiché complessivamente sono stati prodotti 35,9 kg di miele per famiglia dalla sottospecie ligustica e 41 kg dalla sottospecie siciliana. Analizzando i valori assoluti si nota come in entrambi i casi le produzioni varino notevolmente da famiglia a famiglia mostrando valori minimi che nel caso della ligustica è di 8 kg e nel caso della siciliana è pari a 6 kg. Il valore massimo di produzione è di 128,4 kg per la sottospecie siciliana e di 98,2 kg per la sottospecie ligustica. Complessivamente sono stati riempiti 77 melari dalle api siciliane e 32 da quelle italiane con una media rispettivamente di 5,1 e 4,6 melari per famiglia.

Per quanto riguarda la resistenza ai patogeni, nel caso della varroa rilevata su campioni di api adulte, è possibile notare come in una prima fase le api italiane mostrino livelli di infestazione decisamente maggiori rispetto alle api siciliane con valori pari al 2% per la sottospecie siciliana e del 6% per la sottospecie ligustica (autunno 2009). Successivamente si nota un calo nei valori di infestazione per entrambe le sottospecie intorno ai valori dell'1% durante il periodo primaverile. I valori di infestazione crescono nel successivo controllo estivo e sono pari al 6% in *A.m. siciliana* e del 5% circa per *A.m. ligustica*. Il successivo controllo autunnale mostra una crescita elevata dei valori di infestazione pari al 10% in entrambe le sottospecie di api.

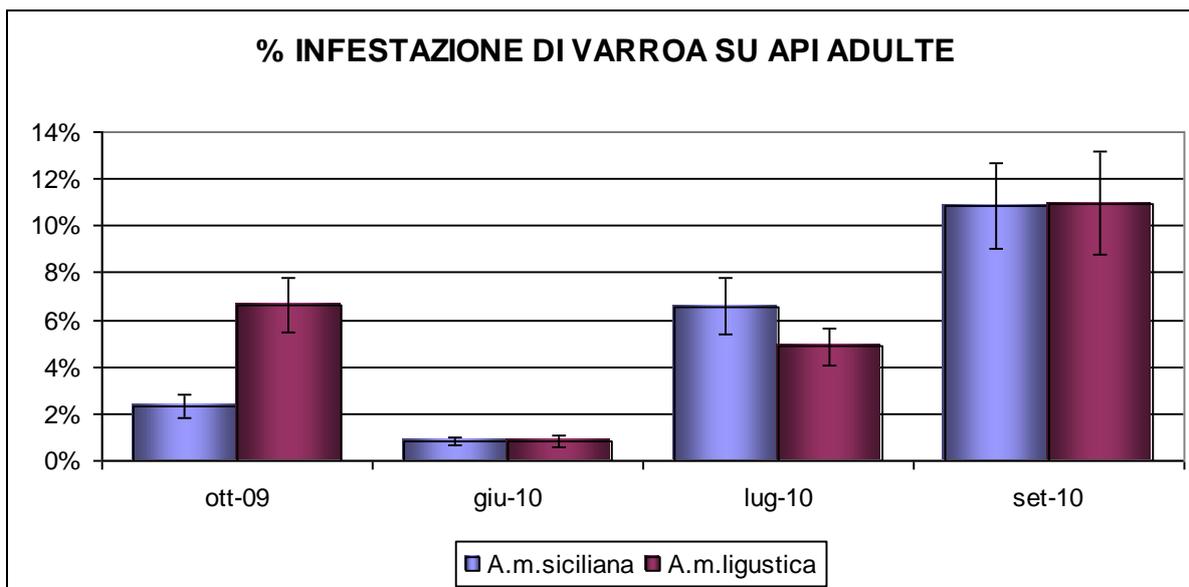


Grafico 19. Percentuale di infestazione da varroa nei due apiari oggetto di studio

Nel caso del *Nosema sp.* la percentuale di famiglie infestate segue un andamento gaussiano nel corso dell'anno in entrambi i casi di studio, infatti il campione estivo rileva valori del 30% circa nelle api siliane e del 40% nel caso delle api ligustiche, per passare al 75% per le siciliane e 55% per le ligustiche periodo primaverile. Successivamente nel campione autunnale le percentuali di famiglie colpite dalla patologia sono pari al 40% circa delle api siciliane e del 10% per quelle italiane. Escluso il primo campionamento le api siciliane hanno mostrato maggiori infestazioni da *nosema* nel corso dell'anno di studio.

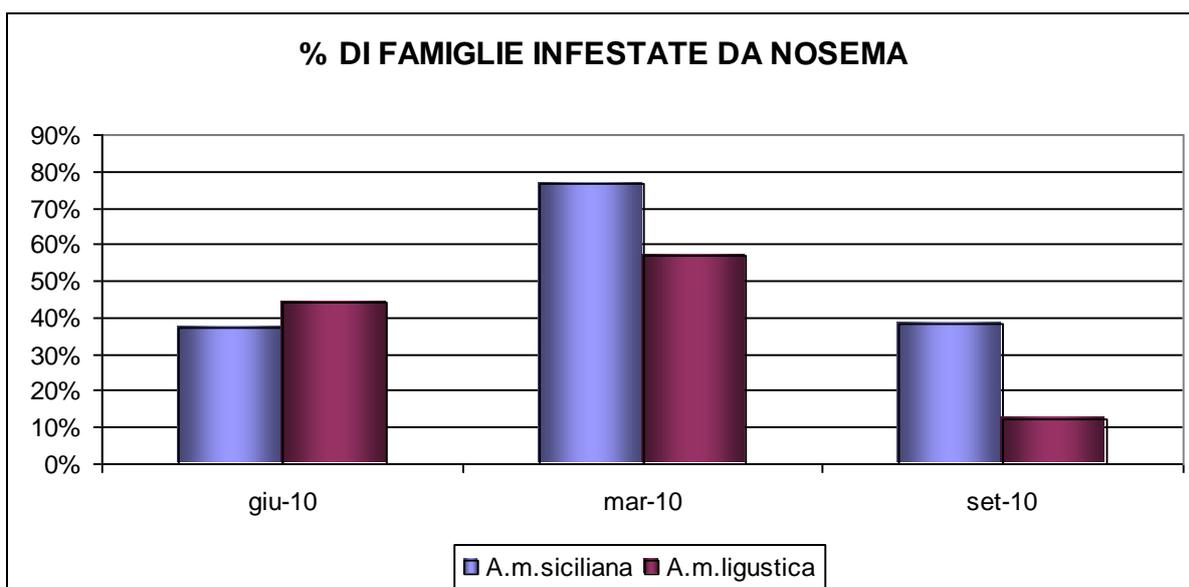


Grafico 20. Percentuale di famiglie infestate da *Nosema sp.* nei due apiari

Anche per quanto riguarda il numero medio di spore per ape i dati mostrano un livello di infestazione maggiore nel caso delle api siciliane che nel periodo primaverile mostrano un picco di più di 4 milioni di spore per ape. Nel caso delle api Italiane il valore medio di spore per ape è al massimo di un milione. In entrambi i casi il picco massimo di infestazione da nosema è rilevato durante il controllo primaverile.

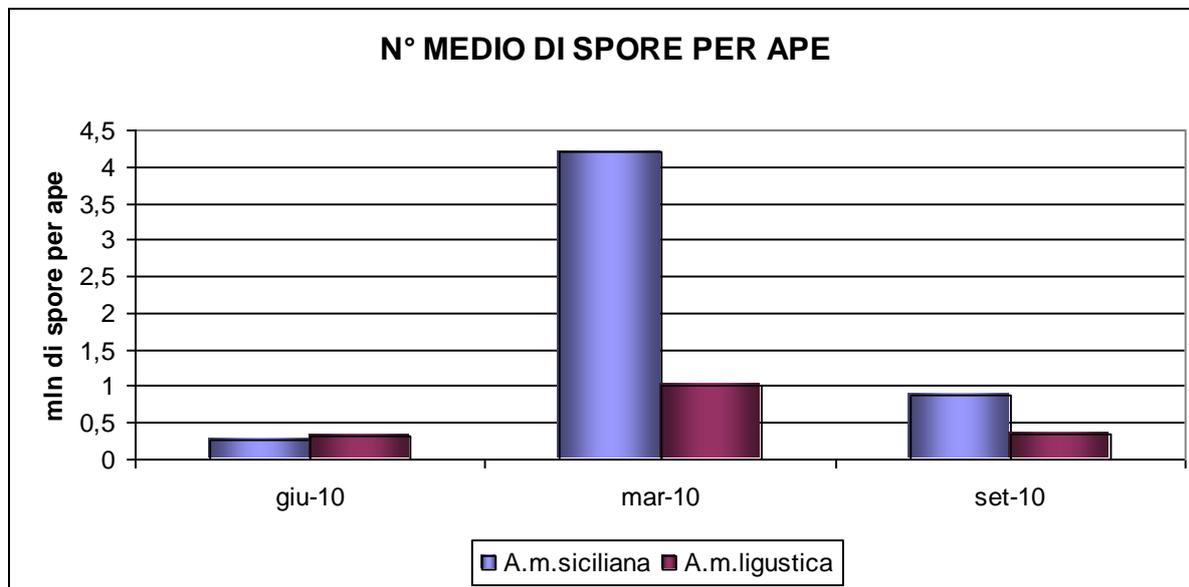


Grafico 21. N° medio di spore di *Nosema sp.* osservate per campione di api.

7.2.2. Discussioni

L'analisi dei dati ottenuti tramite la valutazione in sesti dei diversi parametri mostra come non vi siano differenze sostanziali tra le due sottospecie di *Apis mellifera* esaminate. In generale le colonie di *A.m.siciliana* risultano più popolose delle famiglie di *A.m.ligustica* durante tutto l'arco dell'anno con picchi significativamente più elevati durante il periodo primaverile.

Tali differenze non emergono analizzando lo sviluppo delle covate che mostrano invece andamenti assolutamente paragonabili tra le due sottospecie e lo stesso dicasi per la quantità delle scorte di miele nel nido. Il grafico relativo alla quantità di polline mostra alcune differenze che tuttavia risultano di difficile interpretazione a causa dei diversi parametri che influenzano la presenza di tale matrice all'interno dei telaini del nido. Tuttavia sembra emergere una differenza nel periodo di massimo accumulo di tale tipologia di scorta che mentre nelle api siciliane risulta essere quello primaverile per le api italiane sembra essere quello estivo. Tale osservazione appare essere in relazione con lo sviluppo delle covate poiché si nota come il picco di maggiore accumulo di polline per le api siciliane si abbia durante il controllo di inizio primavera quando le covate risultano ancora poco sviluppate come si evince dal grafico. Lo stesso può dirsi per le api ligustiche in cui il picco di massimo accumulo si ha durante il periodo estivo inoltrato e coincide con un minore sviluppo della covata. Considerazioni simili possono essere fatte anche nel caso delle scorte di miele che mostrano andamenti inversamente proporzionali rispetto allo sviluppo della covata e alla conseguente popolosità delle famiglie. Tuttavia in questo caso non emergono significative differenze tra le due sottospecie di api.

Per quanto riguarda la presenza di patologie nel caso delle infestazioni da *Varroa* l'analisi dei dati rilevati mette in evidenza una sostanziale uniformità nella percentuale di infestazione delle api adulte se si esclude il campione relativo al primo controllo effettuato. Inoltre l'andamento di tale infestazione è anch'esso da mettere in relazione con il ciclo biologico dell'acaro che segue lo sviluppo delle covate. Infatti è possibile notare come il picco massimo di infestazione sulle api adulte coincida con il periodo autunnale quando le covate sono in riduzione e la maggior parte degli acari sono circolanti e quindi sulle api adulte. Di contro il minimo valore nella percentuale di infestazione si riscontra nel periodo primaverile prefestivo quando si ha il massimo sviluppo delle covate e gli acari si trovano quasi tutti all'interno delle celle di covata. Tra le due sottospecie non sembrano tuttavia emergere particolari differenze nella quantità di infestazione né nell'andamento di questa nel corso dell'anno.

Diverso il caso dell'infestazione da Nosema in cui il picco di maggiore contaminazione, sia per quanto riguarda il numero di famiglie colpite sia per la quantità di spore per ape, si ha nel periodo di inizio primavera proprio alla fine del periodo invernale. Tali valori tendono a diminuire col progredire della stagione estiva. In questo caso tuttavia tra le due diverse sottospecie di *A. mellifera* si notano significative differenze sia nella percentuale di famiglie colpite dal problema sia nella quantità media di spore per ape. In questo caso le api di razza siciliana risultano essere maggiormente colpite dal problema sia come percentuale di famiglie infette sia nella quantità media di spore che contaminano il campione che arriva a valori decisamente notevoli e di molto superiori rispetto a quelli rilevati nelle api di razza ligustica. Una valutazione diversa va fatta nel caso della sopravvivenza delle famiglie, poiché è stato possibile notare come le api di razza ligustica abbiano subito ingenti perdite già dopo il primo inverno per arrivare alla scomparsa totale della popolazione nell'autunno del secondo anno di studio, mentre ciò non si è verificato nella popolazione siciliana in cui complessivamente sono andate perdute 9 famiglie (43%). Tale dato risulta decisamente interessante se correlato con i dati relativi alle infestazioni da patogeni. Infatti benché le api autoctone abbiano mostrato infestazioni maggiori rispetto a quelle ligustiche soprattutto per quanto riguarda il nosema, non hanno tuttavia subito fenomeni di mortalità come avvenuto invece nelle api italiane. Questo porterebbe a pensare che la sottospecie autoctona riesca a gestire meglio la patologia e a sopravvivere con livelli di infestazione maggiori rispetto alle altre api che pur presentando minori quantità di spore non sono riuscite a superare naturalmente la patologia. Tale conclusione richiede tuttavia il supporto di ulteriori studi ed approfondimenti per essere correttamente validata.

7.3. INDAGINE SUL GRADO DI IBRIDAZIONE

7.3.1. Risultati

Nel corso dei due anni di studio sono stati raccolti e analizzati complessivamente 648 campioni da 6 diverse località della Sicilia occidentale ricadenti nei territori delle province di Palermo e Trapani (tabella).

Sono inoltre stati analizzati 39 campioni provenienti dalla Tunisia e presumibilmente appartenenti alla sottospecie *A.m.intermissa*. Le analisi della variabilità enzimatica eseguite hanno consentito di determinare la distribuzione genotipica dei due loci analizzati, nel campione esaminato, come riportato in tabella. Per quanto riguarda il locus MDH-1 il genotipo più frequente è risultato il genotipo omozigote per l'allele F in tutte le stazioni analizzate e risulta presente nel 100% dei campioni tunisini. Il genotipo eterozigote riscontrato con maggiore frequenza in tutte le stazioni è FS mentre sporadicamente si ritrovano i genotipi SM e SS.

DISTRIBUZIONE GENOTIPICA DEL LOCUS MDH-1							
LOCALITA'							
PALERMO	N°	FF	FS	FM	SM	SS	MM
CORLEONE	261	178	74	6		3	
LASCARI	207	176	30	1			
PALERMO	45	18	15	6		6	
CALTAVUTURO	18	16	1	1			
TRAPANI							
CASTELVETRANO	36	24	3	9			
SAN VITO LO CAPO	81	59	19			3	
TUNISIA	39	39					

Tabella 12. Distribuzione genotipica per il locus MDH-1 nei campioni analizzati

Per il locus EST il più frequente è il genotipo omozigote per l'allele S tranne nelle stazioni di Castelvetro dove è presente nel 31% dei campioni e di Caltavuturo dove lo si ritrova nel 33% dei casi. Il genotipo eterozigote più comune è risultato essere il genotipo SM mentre raramente vengono ritrovati SF ed FM. Nel campione africano il genotipo omozigote per l'allele S è presente nel 26% degli individui analizzati. Dalle distribuzioni genotipiche sono state ricavate le frequenze alleliche dei due loci analizzati nel campione di api. Tali frequenze sono riportate in tabella. In particolare le frequenze più elevate per l'allele F del locus Mdh-1 si riscontrano nei campioni provenienti da Caltavuturo con valori del 94,4% e le frequenze minime si registrano nella stazione di Palermo (63%). In generale nelle stazioni analizzate si ha una frequenza media del 84% per l'allele F. Per quanto riguarda l'allele S del locus Est, le frequenze più elevate si hanno nel campione di Corleone e di San Vito con valori

rispettivamente del 86% e del 83%. Nelle altre stazioni la frequenza di tale allele varia tra il 50% della stazione di Caltavuturo e il 67% di Lascari. L'allele M è presente con frequenze che variano tra il 13% del campione di Corleone e il 38% del campione di Palermo. L'allele F è presente nella metà delle stazioni analizzate con frequenze inferiori all'1%. Solamente nelle stazioni di Caltavuturo, Lascari e Corleone. in sporadici casi viene ritrovato l'allele raro S1 descritto da Badino et.al. Nel campione proveniente da Tunisi la frequenza allelica per l'allele S è del 51% e del 49% per l'allele M mentre non viene ritrovato l'allele F.

DISTRIBUZIONE GENOTIPICA DEL LOCUS EST										
LOCALITA'	N°	SS	SM	MM	FM	FF	SF	S1S	S1S1	S1M
PALERMO										
CORLEONE	261	193	56	5	1		4	2		
LASCARI	213	105	66	27	4		10	1		
PALERMO	45	20	14	9	2					
CALTAVUTURO	18	6	6	2					2	2
TRAPANI										
CASTELVETRANO	36	11	24	1						
SAN VITO LO CAPO	81	55	24	2						
TUNISIA	39	10	20	9						

Tabella 13. Distribuzione genotipica per il locus EST-6 nei campioni analizzati

LOCALITA'	ESTERASI							MDH-1						
	N°	S	M	F	S1	Ha	Ho	N°	F	S	M	Ha	Ho	
PALERMO														
CORLEONE	261	0,858	0,128	0,010	0,004	0,25	0,24	261	0,835	0,153	0,011	0,33	0,31	
LASCARI	213	0,674	0,291	0,033	0,002	0,46	0,38	207	0,925	0,072	0,002	0,15	0,15	
PALERMO	45	0,600	0,378	0,022	0,000	0,50	0,36	45	0,633	0,300	0,067	0,69	0,47	
TRAPANI														
CALTAVUTURO	18	0,500	0,333	0,000	0,167	0,61	0,56	18	0,944	0,028	0,028	0,11	0,11	
CASTELVETRANO	36	0,639	0,361	0,000	0,000	0,46	0,67	36	0,833	0,042	0,125	0,32	0,33	
SAN VITO	81	0,827	0,173	0,000	0,000	0,29	0,30	81	0,846	0,154	0,000	0,31	0,23	
TUNISIA	39	0,513	0,487	0,000	0,000	0,50	0,51	39	1,000	0,000	0,000	0,00	0,00	

Tabella 14. Frequenze alleliche dei due loci analizzati

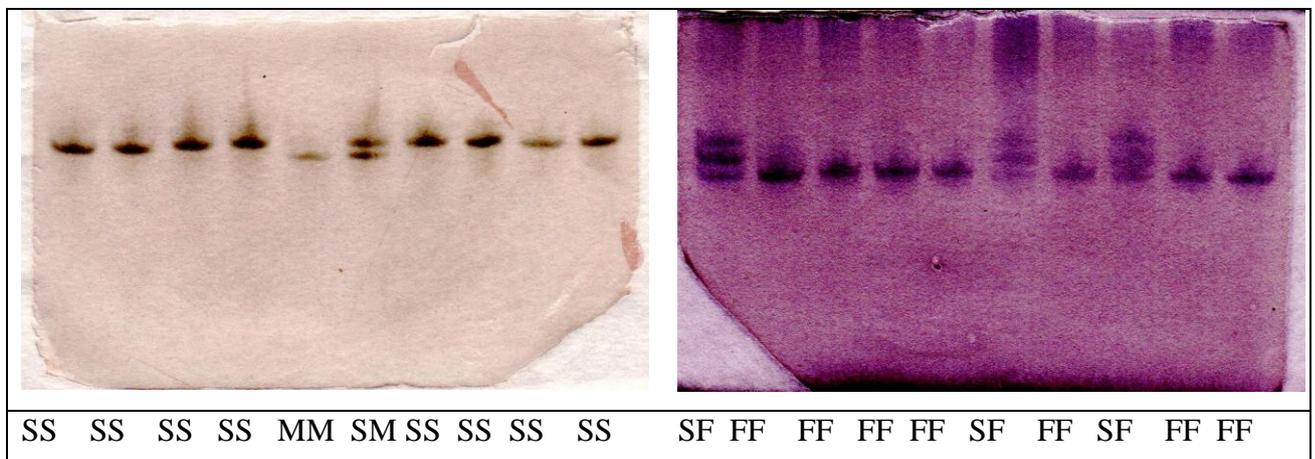


Figura. 28. Gel di poliacrilammide su cui sono evidenziate le bande enzimatiche e i genotipi corrispondenti

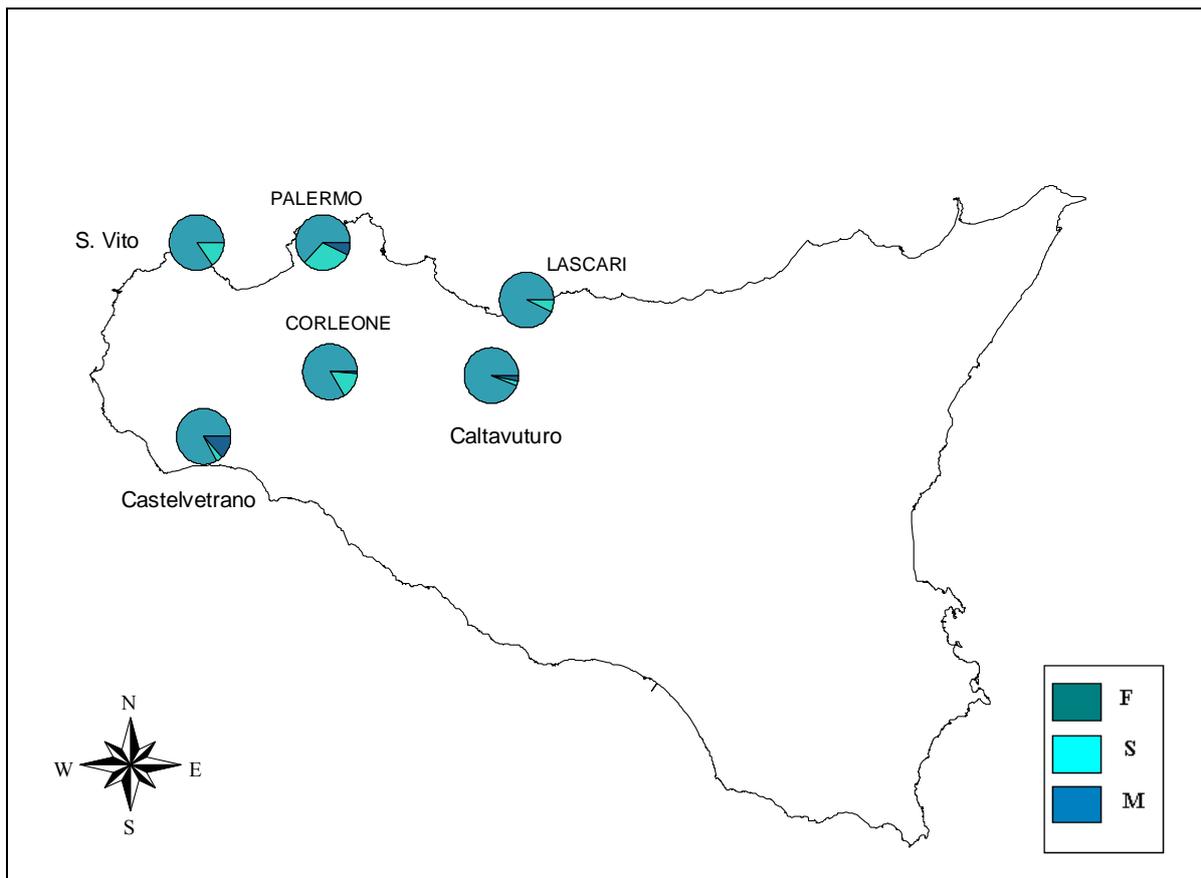


Figura 29. Distribuzione delle frequenze alleliche del locus MDH-1 nelle aree di studio

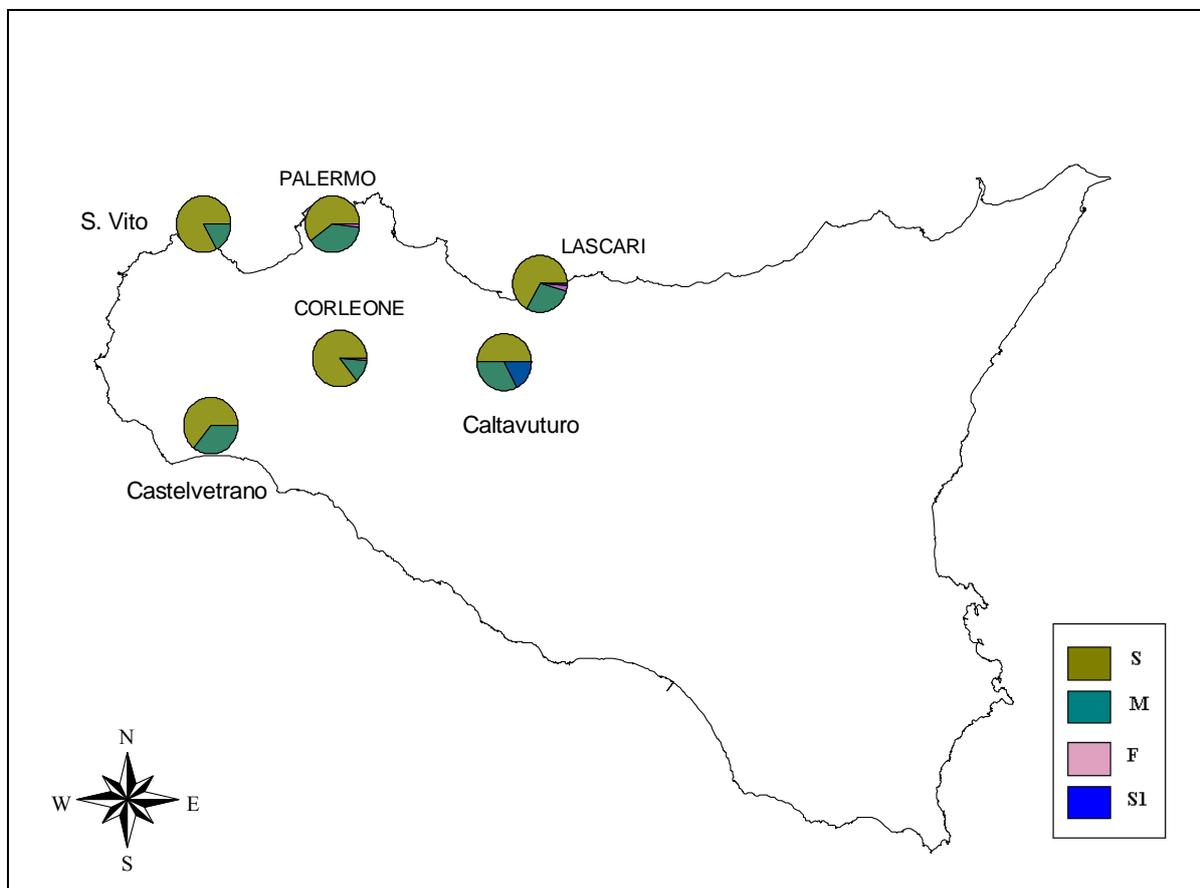


Figura. 30. Distribuzione delle frequenze alleliche del locus EST-6 nelle aree di studio.

7.3.2. Discussioni

Secondo quanto riportato in bibliografia (*Badino G. et al., 1985; Biondo S. et al. 1991*) le popolazioni di *A.m.siciliana* sono caratterizzate dalla presenza, con valori prossimi a quelli di fissazione, dell'allele F per il locus Mdh1 e dell'allele S per il locus EST-6. Sulla base di quanto emerso dalle analisi effettuate appare evidente che tutte le popolazioni analizzate mostrano un grado più o meno elevato di ibridazione testimoniato dalla presenza con frequenze variabili di alleli diversi caratteristici della sottospecie ligustica. Tale livello di ibridazione risulta più accentuato nella stazione di Palermo in cui entrambi gli alleli dei due loci analizzati sono presenti con frequenze del 60% circa. Al contrario le stazioni che mostrano il minore grado di ibridazione sono quelle di S.Vito e Corleone dove le frequenze degli alleli per entrambi i loci sono intorno all'80-85%. Tuttavia tali frequenze registrate a S.Vito sono frutto del lavoro di selezione genetica effettuato dall'apicoltore che gestisce l'apiario, nel caso della postazione di Corleone le api campionate derivano da famiglie allevate da anni in quella zona senza che esse siano state sottoposte a selezione e senza che vi sia stata da parte dell'apicoltore immissione di materiale genetico estraneo. Questo fa ritenere che nella zona del Corleonese le popolazioni di api risentano in maniera minore dell'inquinamento genetico causato dalle popolazioni di ligustica importate dagli apicoltori. In effetti questo conferma il dato riportato in bibliografia relativo ai precedenti studi effettuati secondo cui il grado di ibridazione delle popolazioni autoctone è maggiore nelle aree orientali dell'isola e minore nelle zone occidentali.

Una considerazione a parte va fatta per il campione Tunisino, poiché sulla base delle analisi della variabilità enzimatica è risultato praticamente indistinguibile dagli ibridi di *A.m.siciliana* e *A.m.ligustica*. I dati emersi sono infatti in disaccordo con quanto riportato in bibliografia poiché badino et al. riportavano come marcatore esclusivo della sottospecie siciliana l'allele S del locus EST. Averlo ritrovato nei campioni di api africane fa decadere quanto precedentemente affermato e contemporaneamente rappresenta un'ulteriore conferma della vicinanza genetica delle api siciliane e africane, come già emerso da recenti studi sul DNA mitocondriale. (*Frank P. et al., 2000*) Tuttavia appare chiara la necessità di approfondire e ampliare tali studi estendendo le analisi ad un più consistente campione di api.

8. CONCLUSIONI

Sulla base di quanto emerso dalle indagini effettuate durante i tre anni di studio è possibile concludere, per quanto riguarda la prova di monitoraggio delle mortalità che, nelle zone oggetto di studio, non sono emerse particolari criticità né legate fenomeni di mortalità o spopolamento né a particolari contaminazioni ambientali. Il fatto che durante i tre anni della ricerca non siano stati rilevati macroscopici fenomeni di mortalità porterebbe a confermare il dato secondo cui i fenomeni legati alla scomparsa delle api siano correlati più a contaminazioni ambientali da pesticidi che a particolari patologie. In effetti i risultati ottenuti hanno mostrato che in tutti gli apiari esaminati è stata riscontrata la presenza di diversi patogeni. Oltretutto analizzando i dati ottenuti emerge anche un discreto incremento delle patologie di tipo virale nel corso dei due anni di monitoraggio ma a questo non corrisponde un incremento nei tassi di mortalità. Vi sono due ordini di fattori che possono essere valutati per dare una spiegazione a queste osservazioni. Innanzitutto il fatto che comunque l'indagine effettuata è stata condotta limitatamente alla porzione occidentale dell'isola poiché tutti gli apiari oggetto di studio ricadevano nei territori provinciali del palermitano e del trapanese. Va sottolineato che tali aree nel complesso non sono interessate da agricoltura intensiva escluse zone di territorio limitate. Inoltre le postazioni ricadevano in aree naturali o comunque all'interno di aziende agricole che in taluni casi operavano in biologico. Questo può chiaramente spiegare il perché del fatto che le contaminazioni rilevate siano principalmente legate alle pratiche apistiche stesse e perché non siano state rilevate mortalità accentuate o casi espliciti di avvelenamenti. Tuttavia resta il fatto che in questi apiari benché non sia stata rilevata una sintomatologia evidente erano presenti patologie di vario tipo spesso associate ai classici fenomeni di mortalità come appunto le virosi e la noseemia. Per spiegare ciò ci si può riferire al secondo ordine di fattori, di cui sopra, che si ricollega alla peculiarità genetica della popolazione apistica presente negli apiari monitorati. In base a quanto emerso dall'indagine sulla variabilità enzimatica delle popolazioni di api presenti nella Sicilia occidentale risulta che tali zone siano popolate principalmente da popolazioni ibride di *Apis mellifera* in cui, a seconda delle zone, c'è una maggiore o minore prevalenza dei genotipi della sottospecie locale o di quella estranea.

Pertanto, a differenza di quanto avviene su tutto il territorio nazionale in cui è diffusa quasi esclusivamente un'unica sottospecie, in Sicilia si assiste alla presenza contemporanea di diverse linee genetiche appartenenti a ecotipi differenti che determina la presenza di un ibrido dalle caratteristiche chiaramente molto variabili. Tale natura ibrida delle popolazioni locali potrebbe forse spiegare la maggiore resistenza o comunque la minore suscettibilità alle

patologie determinando una complessiva maggiore vitalità. I dati relativi alla prova comparata potrebbero confermare tale ipotesi poiché, sebbene dalle valutazioni sulla produttività non siano emerse particolari differenze, sia per quanto riguarda la popolosità delle famiglie che la sopravvivenza assoluta, la sottospecie locale ha mostrato dei valori superiori rispetto alla sottospecie italiana. Infatti mentre le colonie di *ligustica* si sono completamente estinte le famiglie di api siciliane sono sopravvissute pur con livelli di infestazioni parassitarie superiori. Questo avvalorerebbe l'ipotesi che gli ecotipi locali essendo naturalmente selezionati per esistere in un dato territorio, risultano sicuramente più adatte a sopravvivere in quel contesto rispetto a sottospecie alloctone. Questo migliore adattamento si esplica non tanto in una minore tendenza o suscettibilità a contrarre la patologia quanto più in una maggiore capacità di reazione e gestione della stessa che si traduce in una maggiore sopravvivenza. Un'ulteriore considerazione può essere fatta anche per quanto riguarda il fatto che i ceppi di *A.m.ligustica* sono ormai da decenni soggetti a forti pressioni antropiche legate alle tecniche di selezione e miglioramento genetico mirate all'ottenimento di migliori performance produttive e comportamentali. Questo può avere inevitabilmente determinato una perdita di informazione genetica a causa dell'aumento di consanguineità dei ceppi allevati che inevitabilmente rende i soggetti più vulnerabili e meno reattivi nei confronti delle criticità, siano esse di natura patologica che ambientale. Nel caso della sottospecie siciliana tutto ciò non è avvenuto poiché le colonie attualmente allevate in purezza derivano da colonie ferali presenti sul territorio e successivamente isolate per mantenerne la purezza. Esse conservano quindi buona parte del primitivo patrimonio genetico che deriva da millenni di selezione naturale. Per quanto riguarda l'ibrido, proprio per sua natura non possiede caratteristiche ben definite e connotazioni stabili, e proprio per tale ragione derivando da incroci naturali di popolazioni diverse, possiede sicuramente un pool genetico certamente più vario che ha consentito di rispondere in maniera più variegata alle diverse problematiche.

Tali considerazioni nascendo dai risultati di uno studio comunque limitato nel tempo e nello spazio, necessitano comunque di ulteriori approfondimenti sia per quanto riguarda l'indagine sulle caratteristiche genetiche della popolazione siciliana sia per la prova di comparazione che per il monitoraggio delle mortalità.

Per tale ragione sarebbe auspicabile per quanto riguarda il monitoraggio dei fenomeni legati alla SSA, protrarre lo studio ampliando il territorio di indagine a tutto il contesto regionale inserendo zone con problematiche ambientali sicuramente differenti e in molti casi più accentuate come le aree più marcatamente agricole del catanese e del nisseno o le zone serricole e industriali della costa meridionale. Per quanto riguarda la prova di comparazione

risulta chiaro che quanto emerso è limitato ad un breve arco temporale di osservazione e ad un unico apiario sperimentale. Risulterebbe certamente utile protrarre l'indagine per un periodo di tempo maggiore e in un contesto spaziale più ampio, predisponendo un numero maggiore di postazioni da monitorare in contesti ambientali diversificati.

BIBLIOGRAFIA

- Alber M. A., 1970- *Apifotogrammetria*.- L'Apicoltore moderno, 8-9:178-182.
- Badino G., Celebrano G., Manino A., 1982 – Genetic variability of *Apis mellifera ligustica* Spinola in a marginal area of its geographical distribution. – *Experientia*. 38: 540-541.
- Badino G., Celebrano G., Manino A., 1983 – Population structure and Mdh-1 locus in *Apis mellifera ligustica*.- *The Journal of Heredity*,74: 443-446.
- Badino G., Celebrano G., Manino A., 1984 – Population genetics of Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica* Spin.) and its relationships with neighboring subspecies. – *Boll. Mus. Reg. Sci. Nat Torino*, 2: 571-584.
- Badino G., Celebrano G., Manino A., Longo S., 1985 – Enzyme polymorphism in the Sicilian honeybee. – *Experientia*, 41:752-754.
- Biondo S., Genduso P., Pirrone A. M., 1991 – Identificazione di *Apis mellifera sicula* Grassi mediante studi di loci polimorfici. – *Atti XVI Congresso nazionale italiano di Entomologia*. Bari – Martina Franca (Ta) 23/28 settembre. 851-856.
- Biondo S., Genduso P., Pirrone A. M., 1994 – Genetica di popolazione di colonie di *Apis mellifera* L. residenti nelle zone centro-occidentali della Sicilia e isolamento di *Apis mellifera sicula* Grassi.- *Apicoltura*, 9.
- Giaravini I., 1953- Ricerche bioetriche e morfometriche sui caratteri razziali di *Apis mellifera sicula* Grassi .- *Mem. Soc. Ent.It.*, 32:129-139.
- Grassi B.,1881 – Saggio di una monografia di api d'Italia.- *Apicoltore*, 14: 277-281.
- Manino A., Marletto F., 1984- Il sistema enzimatico Mdh in popolazioni di *Apis mellifera* l. della valle d'Aosta.- *L'Apicoltore moderno*, 75: 89-94.
- Marinaro G., Sinacori A., 1999 – Indagine elettroforetica su *Apis mellifera* in Sicilia occidentale.- *Atti del congresso APILOMBARDIA 1998*
- Montagano G., 1911 – V Congr. Int. Apic.Turin: 26.
- Monticelli T., 1845 – Del trattamento delle api in Favignana. G. Silvestri , Milano .
- Richardson B. J., Baverstock P. R., Adams M., 1986 – *Allozyme Electrophoresis – A handbook for animal systematic and population Studies*. – Acc. Press, inc. San Diego, California.
- Ruttner F., 1986 – Geographical variability and classification in “Bee Genetics and Breeding”.- *Accademic Press Inc.*: 23-56.
- Sinacori A., Rinderer T. E., Lancaster V., Sheppard S. W., 1998- A Morphological and mitochondrial assessment of *Apis mellifera* from Palermo, Italy.- *Apidologie*, 29: 481-490.

- Vecchi A., 1927.- Sulla distribuzione geografica dell'Apis mellifica ligustica Spin.in Italia.-
Boll.Zool.gen.agr.Portici, 20: 150-168.
- Franck P, Garnery L, Celebrano G, Solignac M, Cornuet JM. -Hybrid origins of honeybees
from italy (*Apis mellifera ligustica*) and sicily (*A. m. sicula*). Mol Ecol. 2000
Jul;9(7):907-21.
- González, R. (2007). Crisis Apícola Argentina: se estima más de 1.450.000 colmenas
muertas. [WWW document].URL <http://www.noticiasapicolas.com.ar>.
- Higes, M., Martín, R., and Meana, A. (2006). Nosema ceranae, a new microsporidian parasite
in honeybees in Europe. J Invertebr Pathol 92: 93–95.
- Stokstad, E. (2007). The case of empty hives. Science Magazine. [WWW document]. URL
<http://www.sciencemag.org/cgi/reprint/316/5827/970.pdf>. DOI: 10.1126/science.316.
5827.970.
- Higes M., Martín-Hernández R., Botías C., Garrido Bailón E., González-Porto A. V., Barrios
L., del Nozal M. J., Bernal J. L., Jiménez J. J., García Palencia P., Meana A. (2008).
How natural infection by Nosema ceranae causes honeybee colony collapse.
Environmental Microbiology 10, 2659–2669.
- Cox-Foster D.L., Conlan S., Holmes E., Palacios G., Evans J.D., Moran N.A. et al. (2007). A
metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. Science 318:
283–287.
- a b «Honey Bee Die-Off Alarms Beekeepers, Crop Growers and Researchers», Penn State
University College of Agricultural Sciences, 29 gennaio 2007.
- Gaëlle Dupont, Les abeilles malades de l'homme, Le Monde, 29 August 2007
- Petra Steinberger. «Das spurlose Sterben», sueddeutsche.de, 12 marzo 2007.
- Paul Molga, La mort des abeilles met la planète en danger, Les Echos, 20 August 2007
- Amy Sahba. «The mysterious deaths of the honeybees», CNN Money, 29 marzo 2007.
- Andrew C. Refkin. «Virus Is Seen as Suspect in Death of Honeybees». The New York Times,
7 settembre 2007.
- JR Minkel. «Mysterious Honeybee Disappearance Linked to Rare Virus». Science News,
Scientific American, 7 settembre 2007.
- Geoffrey Lean and Harriet Shawcross. «Are mobile phones wiping out our bees?», The
Independent, 15 aprile 2007.
- GE and bee Colony Collapse Disorder -- science needed!". 21 marzo 2005.
- Watanabe, M.. «Pollination worries rise as honey bees decline.», Science, vol. 265, 26 agosto
1994, p. 1170.

- A. Ognibene. «Moria di api : Confermata la Tesi sulla Carenza di Polline», sueddeutsche.de, 12 marzo 2007.
- Decourtye, A., Devillers, J., Cluzeau, S., Charreton, M., and Pham-Delègue, M. (2004). Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicol Environ Saf* 57, 410-9.
- Chen, Y. P., and Evans, J. D. (2007). Historical presence of Israeli acute paralysis virus in the United States. *Am Bee J* 147, 1027-1028.
- Grillini. R. 2004. Uso dei medicinali apistici- rischi e pericoli di inquinamento.- *Apitalia* 6 2004.
- Longo A. Branca P. Determinazione simultanea di insetticidi neonicotinoidi mediante HPLC/MS/MS.- 7° Convegno Nazionale Fitofarmaci e Ambiente Torino dicembre 2007
- Gallina A., Mulinelli F. 2008. - L'utilizzo di chlorfenvinfos e acrinatrina:un problema per l'apicoltura italiana.- *Apitalia online* 13 maggio 2008
- Van Engelsdorp, D., Underwood, R., Caron, D., and Hayes, J. (2007). An estimate of managed colony losses in the winter of 2006-2007: A report commissioned by the apiary inspectors of America. *Am Bee J* 147, 603.
- Dall'Olio R. Marino A., Lodesani M., Moritz R.F.A., “Estimating introgression in *Apis mellifera siciliana* populations: are the conservation islands really effective?” – EurBee – Belfast 7-11 september 2008).
- De la Rúa et al. 2009 “Biodiversity, conservation and current threats to European Honeybees” - *Apidologie* 40 (2009) 263–284
- Dall'Olio R., Marino A., Lodesani M., Moritz R.F.A. (2007) Genetic characterization of Italian honeybees, *Apis mellifera ligustica*, based on micro satellite DNA polymorphisms, *Apidologie* 38, 207–217.