



Università degli Studi di Napoli Federico II

DOTTORATO INTERNAZIONALE DI RICERCA

“INSECT SCIENCE AND BITOTECHNOLOGY”

XXVII ciclo

Tesi di dottorato

IMMUNOMODULAZIONE DELL'APE E INTERAZIONI SIMBIOTICHE FRA VARROA E DWV (Deformed Wing Virus)

Coordinatore

Chiar.mo Prof.

Francesco Pennacchio

Relatore

Chiar.mo Prof.

Francesco Pennacchio

Candidata

Marina Margiotta

Anno Accademico 2014 - 2015

ABSTRACT	4
PREMESSA.....	6
INTRODUZIONE	7
Il collasso delle colonie di api e le possibili cause.....	7
Il sistema immunitario delle api.....	11
Modello di interazione Varroa/DWV	29
SCOPI DELLA TESI	35
MATERIALI E METODI	36
1. Scelta del materiale biologico: Api e Varroe	36
2. Saggi di immunocompetenza e immunosoppressione.....	37
Dissezioni di larve di ape.....	37
Conta emocitaria	38
Immuno-stimolazione con impianti di nylon	39
Indice di incapsulamento e di melanizzazione.....	40
Prove d'infestazione artificiale con Varroa.....	42
Intossicazione sub-letale con insetticidi.....	43
Interferenza del DWV e gene Amel\102.....	44
Prova di prolificità della Varroa	45
3. Analisi molecolari e bioinformatiche.....	47
Isolamento e caratterizzazione del gene Amel\102.....	47
Preparazione del dsRNA.....	48
Estrazione dell'RNA totale.....	48
Scelta dei primer	49
RT-PCR convenzionale	51
Sequenziamento	52
CYBR-Green Real-Time RT-PCR (qRT-PCR)	52
Quantificazione relativa (metodo del $\Delta\Delta CT$).....	54
Quantificazione assoluta (Curva standard assoluta).....	55
4. Analisi statistica.....	56
RISULTATI.....	58
1. Immunocompetenza a DWV e/o Varroa.....	58
Conta emocitaria	58
Indice di incapsulamento e melanizzazione.....	59
2. Immunosoppressione indotta da DWV e/o Varroa	62

Isolamento e caratterizzazione del gene Amel\102.....	62
Espressione del gene Amel\102 nei tessuti dell'ape.....	65
Amel\102 e infezione da DWV.....	66
Amel\102 e infestazione da Varroa.....	67
Amel\102 e attivazione di Nf-KB.....	70
Interferenza del gene Amel\102 e del DWV.....	72
3. Infezione virale e riproduzione della Varroa.....	72
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	76
BIBLIOGRAFIA.....	85

ABSTRACT

The honeybee colony losses, often denoted as colony collapse disorder (CCD), have been widely reported throughout the Northern hemisphere in the last few years. There is a large consensus that this is a multifactorial syndrome, with many stress agents involved in its induction. Among these, the parasitic mite *Varroa destructor* associated with Deformed Wing Virus (DWV) plays a key-role. The delicate balance of the silent DWV infections is disrupted by the Varroa feeding, which further depletes the limited pool of an important transcription factor (NF- κ B) activating and regulating a number of stress, both biotic and abiotic, and immune responses. Therefore, any stress factor triggering a response NF- κ B dependent may lower the immune barriers and promote the proliferation of silent viral infections.

This PhD program aims to further analyze the complex interplay between the Varroa-DWV interaction and the bee immune system.

Initially, interest was pointed on a honeybee immune gene (Amel\102), that in other insects is involved in cellular immune response. It resulted that the transcription level of Amel\102 was negatively influenced by combined exposure to Varroa and DWV. This negative effect was largely due to DWV infection, and was depended on the virus load. In fact when a critical threshold of viral infection was exceeded, very high viral loads resulted in a marked transcriptional down-regulation of Amel\102.

Moreover, the encapsulation and melanization response, induced with an implantation of a nylon “pseudoparasite” were negatively correlated with DWV infection. Finally, to test if the viral pathogen could have a positive influence on mite feeding and, as a consequence, on its reproduction, the reproductive success of isolated mites placed on host individuals with different levels of DWV infection were monitored. The results indicated that high viral loads of DWV were associated with an increase of mite reproduction.

The results of this study represent an attempt to measure honeybee immune-suppression at phenotypic level, rather than inferring a reduced immune competence on the basis of transcriptional data. Here we show that honeybees with increasing DWV loads have a lower reaction to immune challenges, both at humoral and cellular level. Indeed, the expression of an immune gene, controlling the encapsulation and melanization reactions is negatively associated with DWV loads and is under NF- κ B control. The study also shows that there is a positive effect of DWV infection on mite reproduction. The basal level of infertility in Varroa mite populations can be quite high and may vary for reasons not completely understood, but apparently related to undefined host factors. We suggest that the presence and the level of infection by DWV might account for part of this variation as a consequence of different levels of honeybee immunosuppression.

PREMESSA

Il presente lavoro di Dottorato di Ricerca è stato svolto in stretta collaborazione con l'Università di Udine (Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali), nell'ambito di progetti nazionali ed internazionali comuni.

INTRODUZIONE

Il collasso delle colonie di api e le possibili cause

L'importanza strategica delle api per l'agricoltura è universalmente riconosciuta. Basti pensare che l'80% circa delle piante, nell'ambito delle più importanti monoculture, beneficiano del fondamentale servizio di impollinazione delle api (Klein et al., 2007).

Laddove l'apicoltura sia stata praticata da secoli in maniera più o meno razionale, perdite estese di alveari sono state registrate periodicamente (950, 992 e 1443 “the great mortality of bees” in Irlanda; 1960-1970 “the disappearing disease” negli USA; 1980-1990 “bee parasitic mite syndrome” in Europa) (Moritz et al., 2010). Il caso più famoso e documentato di estese morie di alveari risale a circa un secolo fa (1906), quando gli apicoltori dell'Isola di Wight (Gran Bretagna) denunciarono la morte misteriosa di numerose colonie d'api (Oldroyd, 2007).

Fu nel 2007, in USA, che Stokstad riportò per la prima volta una serie di misteriosi casi di collassi di alveari, caratterizzati da sintomi peculiari. Questo fenomeno venne battezzato Colony Collaps Disorder (CCD) (van Engelsdorp et al. 2009) e fu considerato una nuova emergente “malattia” delle api. A questo allarme seguirono numerose segnalazioni di perdite di alveari in tutto l'emisfero settentrionale, seppure gli specifici sintomi del CCD non vennero sempre riportati altrove (Neumann and Carreck,

2010). Solo recentemente è stato segnalato il primo caso ufficiale di CCD in Europa (Dainat et al., 2012).

Per definizione (van der Zee et al., 2013) ci si trova davanti ad un caso di CCD quando: si osserva nella colonia affetta una rapida perdita di operaie, fenomeno evidenziato dalla presenza di molta covata relativamente agli adulti presenti in colonie deboli o morte (vanEngelsdorp et al., 2009); una rilevante assenza di operaie morte nei pressi dell'alveare; un ritardo nell'invasione di parassiti dell'alveare (ad es. *Aethina tumida* Murray (Neumann et al., 2013) e *Galleria mellonella* L (Ellis et al., 2013) e del fenomeno del kleptoparassitismo sulle colonie affette da parte di colonie vicine (Cox-Foster et al., 2007); l'assenza di *Varroa* e *Nosema* a livelli considerati causa di danno economico (vanEngelsdorp et al., 2009).

Il problema del CCD si inquadra, comunque, in una più ampia problematica che riguarda il declino degli Apoidei impollinatori a livello mondiale che sta assumendo proporzioni sempre più allarmanti (Potts et al., 2010). In effetti la diffusione e la velocità del declino degli alveari a cui stiamo assistendo nell'ultimo decennio è probabilmente senza precedenti (Floris e Satta, 2013). Il fenomeno del collasso delle colonie in Europa, inteso in senso generale e non esclusivamente causato da CCD, comporta annualmente perdite nell'ordine del 20-30% degli alveari (Neumann and Carreck, 2010).

Sono numerosissimi gli studi che hanno cercato di inquadrare una correlazione significativa tra il fenomeno della perdita delle colonie e le sue le possibili cause. La maggior parte di questi studi ha teso a correlare le condizioni di colonie collassate, campionate in una vasta gamma di condizioni ambientali, con la presenza di potenziali fattori di rischio. La capacità di indurre attivamente il collasso delle colonie è stata attribuita nei primi studi effettuati a tutta una serie di fattori di stress, quali i virus (Cox-Foster et al., 2007), i pesticidi (Henry et al., 2012; Lu et al., 2012), e il fungo patogeno *Nosema ceranae* (Higes et al., 2008). Studi successivi hanno però rivelato che nonostante questi fattori siano coinvolti non possono essere considerati i soli responsabili del fenomeno. Un esempio è quello dello studio di Cox-Foster et al. 2007, basato sul confronto dell'analisi metagenomica di colonie collassate ed in buono stato di salute, che sembrava indicare una stretta relazione tra la presenza dell' *Israeli Acute Paralysis Virus* (IAPV) e l'innescarsi del collasso. Il più approfondito studio successivo di vanEngelsdorp et al. (2009) smentì questa ipotesi, dimostrando l'assenza di correlazione diretta tra i due fenomeni, e suggerì per primo l'ipotesi di una origine multifattoriale del collasso. Questa ipotesi postula che il declino delle colonie ed il loro eventuale collasso possa essere indotto da una varietà di fattori di stress che mostrano spesso interazione tra loro. I maggiori agenti di questi stress multipli identificati fino ad ora sono: *Deformed*

Wing Virus (DWV; Picornavirales, Iflaviridae), un virus a singolo filamento che quando è presente ad alte cariche causa deformità e ridotta sopravvivenza delle api (de Miranda and Genersch, 2010); l'acaro parassita *Varroa destructor* (Acari, Varroidae), che si nutre dell'emolinfa delle api causando sia danni diretti che l'attivazione e la diffusione di virus delle api (Rosenkranz et al., 2010); il già citato patogeno sporigeno unicellulare *Nosema ceranae* (Microsporidia, Nosematidae) che infetta i ventricoli delle api adulte (Fries, 2010); altri virus a singolo filamento delle api (Picornavirales, Iflaviridae, e Dicistroviridae) che causano un vasta gamma di sintomi (Chen and Siede 2007); diverse classi di agrofarmaci, in particolare pesticidi neonicotinoidi ed acaricidi utilizzati per il controllo della Varroa, che possono indurre effetti sia letali che sub letali (Boncristiani et al., 2012; Godfray et al., 2014); la frammentazione ed il deterioramento del paesaggio che ha causato la perdita di molte specie vegetali spontanee e la diffusione delle monoculture, fenomeni che hanno avuto ripercussioni sia sulla continuità dell'approvvigionamento delle risorse alimentari che sulla qualità della dieta delle api (Potts et al., 2010).

Nonostante l'origine multifattoriale del declino delle colonie sia ampiamente diffusa nella comunità scientifica i meccanismi molecolari che sottintendono a questo fenomeno sono tuttora largamente sconosciuti.

Il sistema immunitario delle api

Il largo consenso che ha accolto l'ipotesi di una origine multifattoriale CCD e la frequente associazione con alte cariche di parassiti e patogeni ad esso associate, indicano che la modulazione del sistema immunitario ha un'importanza centrale nello sviluppo del fenomeno, che può essere influenzato da numerosi fattori di stress. Prima di analizzare come questi agenti agiscano sinergicamente tra loro è bene dare una approfondita descrizione dell'attuale stato dell'arte riguardante le difese immunitarie negli insetti in generale e nelle api in particolare.

L'altissima densità di individui che convivono, le condizioni ambientali relativamente statiche all'interno del nido e la presenza di risorse alimentari stivate nel nido rendono gli insetti sociali particolarmente suscettibili agli agenti delle malattie (Schmid-Hempel, 1998). Questi insetti hanno sviluppato, oltre alle difese immunitarie a livello individuale, cellulare e molecolare (**immunità innata**), un sistema di difesa a livello di colonia, comunemente definito **immunità sociale**. Uno dei classici esempi di immunità sociale nelle api è il “comportamento igienico”, descritto per la prima volta da Rothenbuhler, 1964. Le operaie infatti normalmente riconoscono ed allontanano dalla covata sana le larve morte o affette da virus per evitare la diffusione della malattia. Altri esempi di immunità sociale nelle api possono essere l'utilizzo di sostanze antimicrobiche, come la propoli, per la costruzione del nido

(Simone et al., 2009), l'allevamento della covata con cibo sterilizzato (Burgett, 1997) o l'innalzamento della temperatura in risposta a patogeni (*Ascosphaera apis*) sensibili al calore (Starks et al., 2000).

L'immunità innata, le cui funzioni principali riguardano il riconoscimento più o meno specifico, a livello individuale, cellulare e molecolare degli agenti estranei e il successivo avvio di meccanismi difensivi, è evolutivamente più antica rispetto all'immunità acquisita, o adattativa e dotata di memoria, caratteristica dei vertebrati ed assente negli insetti (Hoffmann, 2003).

A livello individuale, la prima linea di difesa nelle api, come negli altri insetti, è rappresentata dalle **barriere fisiche**, per esempio la cuticola dell'esoscheletro e la membrana peritrofica del tratto digestivo (Siva-Jothy et al., 2005).

L'esoscheletro degli insetti è formato principalmente da proteine, catene polisaccaridiche di chitina e lipidi disposti in modo da formare una struttura a più strati. Essa è composta dalla procuticola, più interna, che comprende l'endocuticola e l'esocuticola, quindi dall'epicuticola e infine da un rivestimento esterno. Questi strati vengono prodotti e secreti ad ogni muta dall'epidermide e differiscono l'un l'altro per composizione e proprietà fisiologiche (Falcón 2014).

Il rivestimento esterno consiste principalmente in lipidi che formano una barriera contro la perdita dell'acqua e l'invasione dei patogeni, e gioca

un ruolo importante nelle comunicazioni chimiche (Wigglesworth, 1970; Blomquist and Dillwith, 1985; Gibbs, 2002; Châline et al., 2005, citati da Falcon 2014). Lo strato lipidico è abbondantemente arricchito da idrocarburi (Hepburn, 1985) che sono sintetizzati in cellule specializzate dette enociti, integrate nel tessuto grasso al di sotto dell'epitelio (Fan et al., 2003), più frequentemente vicino agli sterniti che ai tergiti (Ruvolo and Landim, 1993).

Il pattern degli idrocarburi cuticolari può essere modificato da fattori genetici, dallo stato fisiologico e dal contesto ambientale (reviewed in Howard, 2005; Blomquist, 2010), incluso lo status sociale dell'ape (Fan et al., 2010).

Le api possono utilizzare gli idrocarburi cuticolari per distinguere tra loro api in salute e quelle sottoposte ad immuno-stimolazione. L'immuno-stimolazione delle api operaie con liposaccaridi derivati dalla parete cellulare di batteri causa dopo 4 ore cambiamenti significativi nel profilo degli idrocarburi cuticolari, oltre a indurre una risposta immunitaria sociale. Inoltre, ricoprendo api sane con estratti contenenti idrocarburi secreti da api immuno-stimolante si ottiene una significativa risposta antagonista da parte delle compagne (Richard, 2008).

In uno studio più recente (Richard et al, 2012) sono state analizzate le risposte comportamentali, chimiche e genomiche ad immuno-

stimolazione utilizzando una serie di diversi stimoli immunitari (salino, Sephadex beads e il batterio Gram- *E.coli*).

Un comportamento alterato da parte delle compagne verso api in cui erano stati iniettate batteri è stato riscontrato, e in tutti i trattamenti si è avuta la modificazione del profilo degli idrocarburi cuticolari. L'immono-stimolazione causa significativi cambiamenti di espressione in centinaia di geni, molti dei quali non sono stati identificati come membri dei canonici pathways immunitari (Richard et al, 2012). Anche l'attività della *Varroa* sulle pupe e sugli adulti modifica il profilo cuticolare degli idrocarburi (Salvy et al., 2001; Annoscia et al., 2012).

A livello cellulare e molecolare, invece, anche interconnesse tra loro, possiamo schematizzare: una **risposta umorale**, una **risposta cellulare** e una **risposta molecolare** (Lavine and Strand, 2002; Lemaitre and Hoffmann 2007; Antúnez et al., 2009) (Tab.1).

Risposta umorale	Risposta cellulare	Risposta molecolare
Produzione/rilascio di molecole nell'emolinfa (peptidi antimicrobici); Complesse cascate enzimatiche che regolano la coagulazione e melanizzazione dell'emolinfa	Risposte mediate dagli emociti: fagocitosi nodulazione incapsulamento	Piccoli frammenti di RNA RNA interference

Tabella 1. Schema riassuntivo delle vie di risposta immunitaria cellulare e molecolare.

Quando determinati patterns molecolari tipicamente associati ai patogeni (PAMPs-Pathogen Associated Molecular Patterns) vengono riconosciuti e si legano ai recettori dell'ospite (PRRs-Pathogens Recognition Receptors) attivano specifiche cascate di segnali trasduzionali che regolano il comportamento delle cellule immunitarie e la produzione di molecole effettrici (Ronald and Beutler, 2010).

La produzione di **peptidi antimicrobici** (AMPs) è affidata negli insetti a due principali vie di segnalazione: Toll e IMD. Queste due vie di trasduzione del segnale partono quindi dal riconoscimento di motivi strutturali associati a batteri Gram + o funghi per Toll e batteri Gram – per IMD, e danno luogo alla produzione di potenti molecole antimicrobiche, nonché all'attivazione degli emociti (Lemaitre et al., 1997; Qiu et al., 1998). Esiste un terzo pathway di segnalazione (JAK/STAT), inizialmente oggetto di studi di sviluppo embrionale, ma certamente coinvolto nella produzioni di peptidi antimicrobici e attivazione di emociti (Agaisse and Perrimon 2004). Il pathway JNK, infine, regola molti processi di sviluppo in *Drosophila*. Nonostante non vi siano evidenze in vivo di un ruolo attivo di questo pathway nella risposta antimicrobica, la sua implicazione nella difesa immunitaria dell'insetto resta possibile (Lemaitre and Hoffmann 2007).

Le api manifestano nel complesso un difetto di geni del sistema immunitario, presentando circa solo il 30% dei geni rispetto ad altre specie di insetti, quali *Drosophila melanogaster* e *Anopheles gambiae*. Questa evidenza riflette sia l'importanza dell'immunità sociale nelle api, sia la tendenza delle api ad essere attaccate da un limitato numero di patogeni altamente coevoluti (Evans et al. 2006). Nel genoma dell'ape sono stati identificati i principali pathway immunitari comuni agli insetti: Toll (Fig 1), Imd, JAK/STAT (Fig. 2) e JNK. I modelli proposti da Evans et al. (2006) per ognuno dei quattro "signalling pathways" associati con l'immunità sono di seguito sintetizzati:

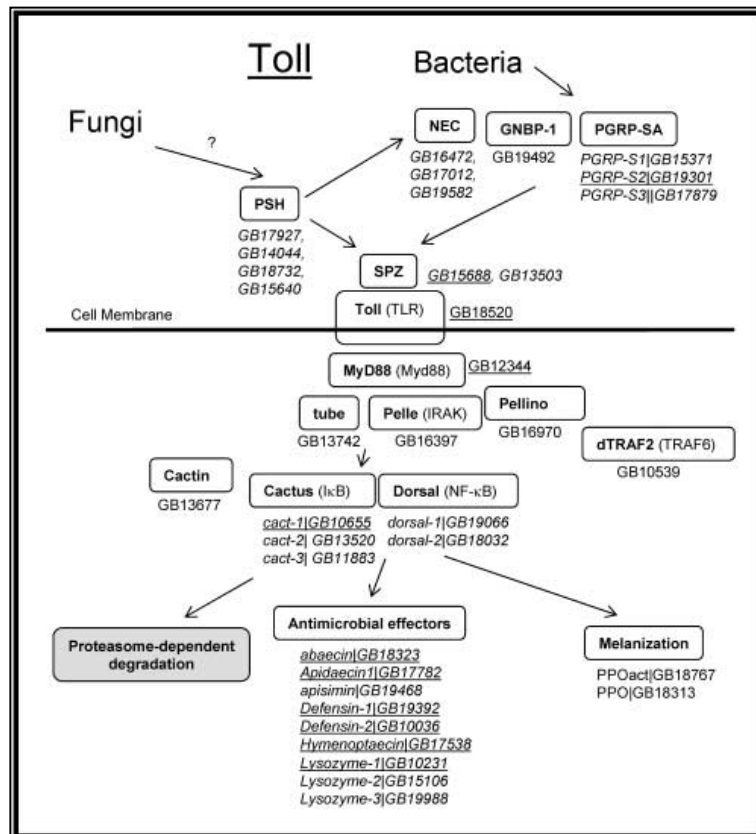


Figura 1. Geni candidati per il Toll pathway in *Apis mellifera*. Sono indicati i nomi dei componenti del Pathway di *Drosophila*, e tra parentesi gli ortologhi dei vertebrati. In corsivo sono indicati i nomi dei geni di ape riferiti a paraloghi che non possono essere immediatamente distinti rispetto ai componenti del pathway di *Drosophila*. I geni che sono risultati sovra-regolati a seguito di stimolazione immunitaria sono sottolineati (da Evans et al., 2006).

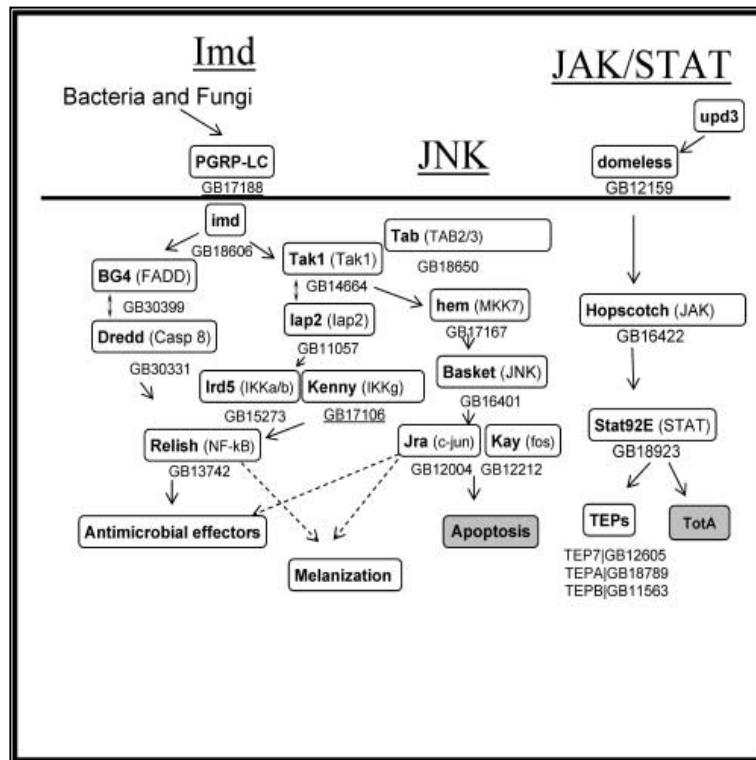


Figura 2. Geni candidati per i pathway IMD, JNK e JAK/STAT in *Apis mellifera* sotto i quali sono indicati nomi dei pathway per *Drosophila* insieme agli ortologi nei vertebrati (in parentesi). In corsivo sono indicati i nomi dei geni di ape riferiti a paraloghi che non possono essere immediatamente distinti rispetto ai componenti del pathway di *Drosophila*. I geni che sono risultati sovra-regolati a seguito di stimolazione immunitaria sono sottolineati (da Evans et al., 2006).

TOLL

In *Drosophila*, una volta avvenuto il riconoscimento e l'attacco ai ligandi microbici da parte delle PRRs, si ha l'attivazione di SPE (Spätzle Processing Enzyme); questa proteina innesca una cascata proteolitica che porta alla liberazione di Spätzle, un peptide endogeno presente nell'emolinfa dell'insetto in forma inattiva (Pro-Spätzle). La citochina

Spätzle si lega quindi ai recettori transmembrana Toll, che attivano la fosforilazione e la degradazione di Cactus, una proteina inibitrice dei fattori di trascrizione della famiglia NF- κ B, quali Dorsal e Dif. La distruzione di Cactus permette la traslocazione dei suddetti fattori di trascrizione nel nucleo, determinando un rapido incremento della trascrizione dei peptidi antimicrobici, che sono infine liberati nell'emolinfa (Lemaitre and Hoffmann, 2007) (Fig 3).

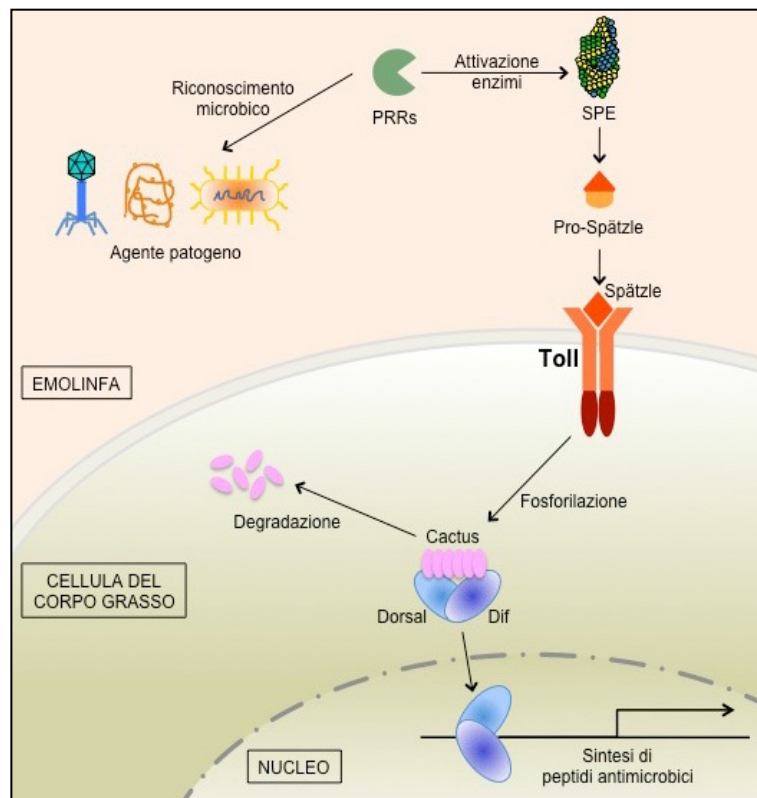


Figura 3. Meccanismo di attivazione del pathway Toll in *Drosophila* (da Lemaitre and Hoffmann, 2007).

Nel genoma dell'ape sono stati evidenziati due possibili ortologhi di Spätzle (GB15688 e GB13503), tuttavia sono necessari test funzionali per stabilire quale dei due agisca come citochina che si lega a Toll.

Inoltre, in ape, sono stati trovati due omologhi di Dorsal (Dorsal-1|GB19066 e Dorsal-2|GB18032) nessuno dei quali sembra ortologo con Dif. Ulteriori indagini potranno determinare quale dei due paraloghi rappresenti il fattore di trascrizione chiave di questo pathway.

In *A. mellifera*, i possibili effettori della risposta immunitaria mediata da Toll in seguito a ferita o all'attacco di patogeni sono i peptidi antimicrobici, gli agenti responsabili della melanizzazione e tre lisozimi.

IMD

In *Drosophila*, l'attivazione del pathway Imd avviene grazie al fattore di trascrizione Relish (appartenente anch'esso alla famiglia NF- κ B), il quale, una volta sbloccato, si porta verso il nucleo, inducendo la trascrizione dei peptidi antimicrobici. È stato osservato che il pathway Imd delle api è simile a quello di *Drosophila* manifestando la presenza di ortologhi per ciascuno dei suoi componenti. Anche in *A. mellifera*, quindi, Imd è responsabile della produzione di peptidi antimicrobici, oltre che di agenti responsabili della melanizzazione e dell'apoptosi cellulare (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

Inoltre, l'attivazione di Relish determina la promozione di alcuni componenti del pathway JNK, il quale può fornire feed-back positivi e negativi riguardo l'espressione dei peptidi antimicrobici. Nel genoma dell'ape sono stati identificati i potenziali ortologhi per ciascuno dei componenti principali di JNK.

JAK/STAT

Il pathway JAK/STAT può contribuire all'espressione dell'immunità innata degli insetti, determinando la proliferazione degli emociti. Inoltre, in *Drosophila*, questo pathway svolge un ruolo attivo nella difesa antivirale. Gli omologhi del pathway JAK/STAT identificati nel genoma delle api comprendono il recettore della citochina Domeless (Dom), la JAK tirosina chinasi (Hopscotch) e il fattore di trascrizione STAT92E; ciò indica che il meccanismo di funzionamento di questo pathway è comune fra gli insetti ed è identico fra api e *Drosophila* (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

Nonostante *A. mellifera* abbia mantenuto tutti gli immuno pathways conosciuti negli insetti, comparando un set di 17 famiglie di geni e di gruppi funzionali implicati nella risposta immunitaria, le api, come già osservato, hanno un numero nettamente inferiore di paraloghi rispetto a *Drosophila* e *Anopheles* (196 e 209 rispettivamente).

Con particolare riguardo agli immuno effettori, è possibile osservare che le api sono in grado di produrre solo 6 peptidi antimicrobici, contro i 20 e i 9 identificati rispettivamente in *Drosophila* e *Anopheles*. Inoltre, le api posseggono solo un gene che codifica per la sintesi di profenolossidasi (proPO) contro 3 e 9 geni presenti in *Drosophila* e *Anopheles* rispettivamente.

Nel genoma delle api, infine, sono presenti solo 3 lisozimi, che hanno attività antimicrobica e 4 proteine contenenti tiolesterase (TEPs), che in *Drosophila* si attivano in seguito a sepsi da ferita e promuovono la fagocitosi dei patogeni (Evans et al., 2006)

Un altro aspetto delle reazioni di immunità umorale che va considerato sono le reazioni di coagulazione e melanizzazione. La reazione di **coagulazione** costituisce uno dei primi avamposti di difesa dell'insetto contribuendo a formare una barriera protettiva (coagulo) che intrappola i microrganismi, determinandone la distruzione e prevenendo il loro ingresso nell'emocele (Wang et al., 2010).

La lesione dei tessuti e la presenza di corpi estranei inducono l'attivazione di una cascata enzimatica di serina proteasi, culminante con l'attivazione dell'enzima fenolossidasi (PO), a partire dal precursore profenolossidasi (PPO). La PO catalizza l'ossidazione della tirosina e di altre sostanze fenoliche in composti chinonici, i quali polimerizzano per

sintetizzare la melanina (Siva-Jothy et al., 2005). La cascata PO produce anche dei reagenti intermedi dell'ossigeno e dell'azoto (ROS e RNS) e dei chinoni che risultano tossici sia per i microrganismi che per l'ospite, il quale necessita quindi di un sistema di regolazione biochimica molto efficace (Nappi and Vass, 1993; Soderhall and Cerenius, 1998; Nappi et al., 2009) e un sistema di precisa localizzazione spaziale delle reazioni enzimatiche, al fine di evitare la diffusione libera di questi prodotti estremamente tossici e potenzialmente letali.

Recenti studi (Falabella et al., 2012; Di Lelio et al. 2014) hanno dimostrato che quest'ultima esigenza è assicurata nei lepidotteri da fibre amiloidi, generate da frammenti di una proteina emocitaria, in grado di promuovere la polimerizzazione dei precursori chinonici tossici e la deposizione della melanina esclusivamente dove essa è richiesta. Tali fibre amiloidi agiscono, quindi, come un'impalcatura che permette la localizzazione della melanina e l'adesione di sostanze potenzialmente tossiche per l'ospite se rilasciate in circolo (Falabella et al., 2012).

I processi di **immunità cellulare** del sistema immunitario si basano sull'attività degli **emociti**, particolari cellule che intervengono nelle reazioni di fagocitosi di germi contaminanti, nei processi di nodulazione e di incapsulamento di grossi corpi estranei, ed anche nella liberazione di effettori solubili della risposta umorale (Siva-Jothy et al., 2005).

Gli insetti producono diversi tipi emocitari che vengono classificati in base a caratteristiche morfologiche, chimiche e funzionali. I tipi più comuni descritti in diverse specie di insetti appartenenti a differenti ordini sono i proemociti, i granulociti, i plasmacociti e gli emocitoidi (Lavigne and Strand, 2002)

In un recente studio Marringa et al. (2014), utilizzando in combinazione tecniche di citometria di flusso e microscopia hanno descritto gli emociti e le particelle presenti nell'emolinfa delle api. Attraverso il confronto con Ditteri, Lepidotteri ed altri membri dell'ordine degli Imenotteri hanno distinto tre tipi primari di emociti nelle api: 1) Cellule permeabili (di origine incerta) che mostrano una membrana plasmatica permeabile allo Ioduro di Propidio (PI) e legata con agglutinina-FITC del germe di grano (WGA) e annexina V-FICT (annexin V); 2) un sottoinsieme di particelle permeabili simili alle precedenti, che differiscono nel fatto che non sono legate a WGA e hanno proprietà di contrasto della luce; 3) plasmacociti contenenti nuclei allungati non legati da PI, e membrane plasmatiche intatte non legate ad annexin V, ma variabilmente legate da WGA. Il maggior numero di particelle osservate sono risultate di dimensioni inferiori ai 3 μ m di diametro; queste particelle non contengono nuclei e somigliano a microparticelle o protrusioni delle membrane, mai descritte prima in ape (Marringa et al., 2014).

In ogni caso se le particelle permeabili osservate inducano ad una azione antimicrobica caustica, a meccanismi specializzati di difesa o a una naturale progressione attraverso eliminazione e rimozione dei corpi estranei è tuttora ignoto (Marringa et al., 2014).

La **fagocitosi** è un meccanismo di difesa attraverso il quale cellule specializzate sono in grado di inglobare e distruggere particelle sia vive che inerti.

La prima fase della reazione di fagocitosi consiste, similmente alle risposte umorali, nel riconoscimento della particella da ingerire da parte dei PRR, presenti sulla superficie degli emociti in soluzione, che inducono l'attivazione di segnali intracellulari. Una volta avvenuto il riconoscimento, la particella bersaglio viene rapidamente circondata dagli pseudopodi della cellula emocitaria e inglobata in una vescicola intracellulare che deriva dalla membrana plasmatica e prende il nome di fagosoma. Quest'ultimo va poi incontro ad una fusione con i lisosomi con la formazione di un fagolisosoma al cui interno si ha la digestione enzimatica delle particelle ingerite (Siva-Jothy et al., 2005).

Quando i corpi estranei sono troppo voluminosi per essere fagocitati la risposta cellulare mette in atto la reazione di **incapsulamento**. La prima fase di questa reazione si basa sul riconoscimento dei corpi estranei da parte degli emociti, riconoscimento che induce un rapido aumento del numero delle cellule emocitarie circolanti. La costruzione della capsula

può essere divisa in tre fasi: inizio, stratificazione degli emociti e terminazione (Russo et al., 1996; Lavine e Strand, 2002). Nella prima fase gli emociti aderiscono sulla superficie del corpo estraneo, richiamando, nella fase successiva, altri emociti che aderiscono gli uni agli altri, formando una capsula multistrato. La fase di terminazione corrisponde all'arresto dell'aggregazione cellulare ed è generalmente seguito da un processo di melanizzazione della capsula, descritta in precedenza, che comporta la produzione di melanina negli strati emocitari più interni, a ridosso dell'oggetto incapsulato.

La reazione di **nodulazione**, infine, è molto simile a quella di incapsulamento perché in effetti consiste nell'intrappolare un corpo estraneo troppo grande per essere fagocitato con la formazione di noduli generalmente melanizzati.

La capacità di resistere alle malattie può essere empiricamente misurata e quantificata usando **le misure di Immuno Competence (IC)**. Si definisce IC come la capacità di un organismo di creare una risposta immunitaria, sia essa di tipo cellulare, umorale o sociale (König and Schmid-Hempel, 1995; Siva-Jothy, 2005; Schmid-Hempel and Ebert, 2003; Wilson-Rich et al., 2008; Laughton et al., 2011).

La conta degli emociti totali può essere considerata una misura indiretta dello standard cellulare di Immuno Competenza (Wilson et al., 2002;

Lee et al., 2006). Nelle api le misure di IC sono state utilizzate per valutare gli effetti della dieta (Alaux et al., 2010) e per studiare l'ontogenesi del sistema immunitario sia nello sviluppo (Wilson-Rich et al., 2008) che a seguito di una stimolazione immunitaria (Laughton et al., 2011)

Per misurare in modo diretto l'abilità di un insetto di neutralizzare un corpo estraneo che non può essere assimilato per fagocitosi si utilizzano delle prove standard di incapsulamento (König and Schmid-Hempel, 1995; Schmid-Hempel and Schmid-Hempel, 1998; Rantala et al., 2000; Vainio et al., 2004; Rantala and Roff, 2005; Lee et al., 2006; Kapari et al., 2006; Haviola et al., 2007; Wilson-Rich et al., 2008)

L'incapsulamento può avvenire quando la cuticola viene punta da un oggetto estraneo, come per primo notò nei suoi esperimenti il vincitore del Premio Nobel Metchnikoff (1905); inoltre può essere indotta quando un parassita invade la cavità emocelica dell'ospite (Wilson et al., 2002). Nelle api la risposta di incapsulamento può essere indotta mimando il comportamento della *Varroa* (Sammataro et al., 2000) utilizzando uno 'pseudoparassita' di nylon (Cox-Foster and Stehr, 1994; Wilson-Rich et al., 2008, Laughton et al., 2011).

Il controllo dei **patogeni virali** ha ricevuto poche attenzioni rispetto ai meccanismi descritti relativi agli altri patogeni e stress immunitari, e il

modo in cui questi diffusi patogeni impattano sul sistema immunitario degli insetti è ancora poco caratterizzato.

Recenti studi hanno dimostrato che i pathway antimicrobici innati giocano un ruolo importante nella risposta antivirale mediante la produzione di molecole effettrici (Sabin et al., 2010; Lamiabile and Imler, 2014)

Prove indirette evidenziano comunque che la presenza di meccanismi di **RNAi**, attivati dalla presenza di dsRNA derivanti dai virus, hanno la funzione di sopprimere la replicazione virale (Maori et al., 2009; Hunter et al., 2010; Li et al., 2010; Desai et al., 2012). Uno studio recente ha fatto luce su come i dsRNAs, agendo come PAMPs, inneschino una risposta antivirale nelle api, che mitiga l'infezione (Flenniken and Andino, 2013). Le analisi trascrittomiche in api esposte ad infezioni virali o trattate con dsRNA non hanno mostrato significativi cambiamenti in quei geni che rispondono alle infezioni virali in mosche e zanzare, ma piuttosto una generalizzata sottoregolazione dei geni che codificano per AMP (Flenniken and Andino, 2013) e che, come ampiamente descritto, sono generalmente prodotte attraverso Toll, Imd o JNK, sotto il controllo trascrizionale di NF- κ B. Inoltre una significativa sottoregolazione di NF- κ B è stata riportata in api infestate da *Varroa* e con alti livelli di infezione da DWV (Nazzi et al., 2012). In questo stesso studio prove sperimentali dimostrano che la sottoregolazione di NF- κ B è

ampiamente dovuta all'infezione da DWV e il silenziamento con RNAi di questo fattore trascrizionale ha promosso la proliferazione virale. Considerate nel complesso queste evidenze sperimentali suggeriscono la possibilità di una strategia utilizzata dai virus, che ha come obiettivo quello di disattivare le barriere antivirali attivate NF-kB, influenzando quindi tutto il complesso dei pathways fisiologici dipendenti da questo fattore di trascrizione.

Modello di interazione Varroa/DWV

Capire a fondo le complesse interazioni tra parassiti e fattori di stress che causano le disfunzioni negli organismi bersaglio è estremamente difficile (Lafferty, 2010). Nel caso delle api l'intricata rete di fattori di stress è frequentemente caratterizzata dalla presenza del DWV, il quale genera infezioni latenti che possono rapidamente diffondersi attraverso la *Varroa destructor* (de Miranda and Gernes, 2010; Rosenkranz et al., 2010). Questa stessa ipotesi era stata presentata in un modello proposto da Martin (2001), il quale identifica l'associazione tra DWV e *Varroa* come il principale responsabile della perdita di milioni di colonie in tutto il mondo. Questo modello è stato rafforzato da uno studio effettuato nelle isole Hawaii, in cui l'arrivo della *Varroa* ha determinato un forte incremento della carica virale del DWV, oltre alla selezione di una forma più aggressiva del virus (Martin et al., 2012).

Recentemente Ryabov et al. (2014) hanno dimostrato che solo una forma ricombinante più virulenta del DWV si replica attivamente una volta introdotta nell'emocele delle api, sia attraverso il vettore *Varroa* che per iniezione artificiale. Questo comporta una forte riduzione nella varietà delle forme di DWV presenti nelle api rispetto alla grande varietà delle forme osservate nelle *Varroa*, dove comunque avviene una attiva replicazione. Sembra quindi che il percorso attraverso il quale il virus viene acquisito sia fondamentale nello scatenare l'intensa replicazione di una forma più virulenta di DWV nelle colonie infestate da *Varroa*, anche se i meccanismi molecolari che forniscono questo vantaggio alle forme più aggressive di DWV rimangono sconosciuti (Ryabov et al., 2014).

Uno studio proposto da Nazzi et al. (2012) ha contribuito a svelare l'impatto relativo causato da questi due fattori di stress intimamente correlati, analizzando, nel contempo, la popolazione e i cambiamenti molecolari in colonie indotte al collasso. Infatti, colonie in cui non erano state effettuate misure di controllo della *Varroa* e che quindi erano soggette ad una crescente popolazione del parassita, hanno mostrato una crescente mortalità delle api nel periodo autunnale. Tra tutti i patogeni considerati, solo il DWV ha mostrato una correlazione positiva con la forte mortalità autunnale, incrementando in quel periodo la sua carica virale fino a livelli di 1×10^{15} copie genomiche di DWV per ape. Le analisi trascrittomiche effettuate sulle api campionate nell'esperimento

hanno rivelato cambiamenti significativi nei livelli di espressione di diversi geni del sistema immunitario, la maggior parte dei quali vengono sottoespressi, mentre solo pochi di essi vengono sovraespressi, come nel caso di quelli simili ad Eater, una proteina coinvolta nella fagocitosi. La massima sottoregolazione si è avuta per Dorsal-1A e questo effetto si è dimostrato essere prevalentemente dovuto al virus e non alla Varroa in assenza di virus. Il silenziamento di Dorsal-1A con tecniche di RNAi si è visto promuovere la replicazione del DWV (Nazzi et al., 2012).

Nelle api provenienti da colonie affette da CCD, che regolarmente mostrano alti livelli di infezione virale, la risposta immunitaria mediata dai meccanismi di RNAi sembra essere inefficiente (Chejanovsky et al., 2014). Inoltre la risposta antivirale promossa da dsRNA aspecifici è associata ad una significativa sottoespressione di un fattore immunitario regolato da NF-kB (Flenniken e Andino, 2013). Il già citato studio di Ryabov et al.(2014) ha dimostrato che esponendo delle pupe esposte all'attacco della Varroa in presenza di alte cariche di DWV (1×10^{10} copie genomiche) si ha una sottoregolazione di geni immunitari del pathway Toll, sebbene la risposta complessiva dei geni coinvolti necessiti di ulteriori approfondimenti.

Le prove sperimentali finora raccolte suggeriscono che le barriere antivirali attivate da NF-kB giocano un ruolo fondamentale e sono al centro della strategia di virulenza del DWV (Nazzi et al. 2014).

Il modello che meglio descrive la complessa dinamica del DWV (caratterizzata da infezioni latenti associate a un basso numero di copie genomiche e infezioni conclamate caratterizzate da alte cariche virali) propone l'idea che gli effetti immunosoppressivi del DWV siano sottoposti ad una soglia di copie virali oltre la quale si ha la transizione dallo stato di infezione latente a quella conclamata. Questa dinamica di virulenza duale avrebbe la funzione di prevenire la replicazione incontrollata del virus al di sotto di una soglia di copie virali presenti, permettendo la persistenza di una forma asintomatica del virus che ne favorisca la diffusione tra le popolazioni di api, sia in modo verticale che orizzontale (Nazzi and Pennacchio, 2014).

Uno degli effetti più significativi di questo scenario è dato dalla modulazione che l'ambiente potrebbe avere inserendosi nell'equilibrio instauratosi tra il controllo effettuato dal sistema immunitario e il numero di copie virali presenti. In altre parole, il delicato bilancio della infezione latente da DWV potrebbe essere alterato dall'azione trofica della Varroa, che stimolando risposte di difesa in parte attivate da NF- κ B compete con quelle antivirali dipendenti da questo fattore trascrizionale. Perciò, qualunque ulteriore fattore di stress inneschi una risposta NF- κ B dipendente potrebbe ulteriormente contribuire a ridurre le difese immunitarie antivirali e promuovere la progressione di una infezione virale latente ad una conclamata, inducendo la perdita della colonia.

Tra i fattori di stress considerati fino ad ora, particolare attenzione è stata rivolta all'impatto dei pesticidi sulla salute e la stabilità delle colonie, ponendo l'accento sul ruolo svolto dagli insetticidi neonicotinoidi, che sembrano avere un ampio spettro di effetti negativi su api e bombi (Gill et al., 2012; Henry et al., 2012; Withehorn et al., 2012). In ogni caso su questo argomento numerose questioni sono tutt'ora irrisolte e sono stati spesso riportati risultati contrastanti (Cresswell et al., 2012). Bisogna comunque sottolineare che è stata riscontrata una stretta associazione tra l'impatto dei neonicotinoidi e i livelli di patogeni presenti nelle colonie (Alaux et al., 2010; Aufauvre et al., 2012; Pettis et al., 2012) nelle quali sembra quindi esserci una ridotta risposta immunitaria.

Nonostante questo effetto sia stato di fatto accertato è stato fatto ancora poco per descrivere i meccanismi che sottintendono questo fenomeno (Cresswell et al., 2012) e solo recentemente gli sforzi sono stati indirizzati in questo senso, con uno studio volto ad indagare gli effetti del Clothianidin sul sistema immunitario delle api (Di Prisco et al., 2013). Il modello proposto da Nazzi et al. 2012 non esclude che svariati fattori ambientali, oltre ai neonicotinoidi, possano potenzialmente interferire con l'immunità e la salute della colonia. Agenti di stress multipli, come ad esempio la malnutrizione o alcune pratiche apistiche, potrebbero avere un'azione sinergica, agendo sul delicato bilancio immunitario che tiene sotto controllo l'infezione latente del DWV, e

potrebbero dare conto dell'origine multifattoriale del collasso delle colonie.

SCOPI DELLA TESI

Lo scopo generale del presente lavoro di dottorato è stato quello di studiare come la strategia di virulenza il DWV possa avere un impatto sulla fitness della *Varroa*, che è senza dubbio uno dei principali problemi dell'apicoltura. In particolare, si è voluto comprendere l'effetto dell'infezione da DWV sulla risposta immunitaria delle api, sia a livello cellulare e umorale (incapsulamento e melanizzazione) che a livello molecolare (alterazione dell'espressione di geni coinvolti nella risposta immunitaria), valutando, in particolare, se le alterazioni indotte non siano in grado di facilitare l'utilizzazione nutrizionale dell'ospite da parte della *Varroa*, come conseguenza della maggiore accessibilità e fruibilità della sua emolinfa.

MATERIALI E METODI

1. Scelta del materiale biologico: Api e Varroe

La sperimentazione è stata eseguita durante la stagione apistica, con il massimo dell'attività di foraggiamento delle api. Gli alveari utilizzati per gli esperimenti sono stati tenuti in allevamento presso l'apiario sperimentale del Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Napoli Federico II (Fig.4).



Figura 4. Apiario sperimentale del Dipartimento di Agraria, Università degli studi di Napoli Federico II.

Per tutte le colonie dell'apiario si conosce la storia pato-parassitologica grazie ad un monitoraggio trimestrale sulla presenza dei principali parassiti (*Varroa*, *Acarapis*) e patogeni (*Acute Bee Paralysis Virus* - ABPV, *Black Queen Cell Virus* - BQCV, *Chronic Bee Paralysis Virus* -

CBPV, *DeformedWing Virus* - DWV, *Israeli Acute Paralysis Virus* - IAPV, *Kashmir Bee Virus* - KBV, *Sacbrood Bee Virus* - SBV, *Acute Bee Paralysis Virus* - ABPV, *Nosema apis* e *Nosema ceranae*). La forza delle colonie è stata stimata secondo criteri ben precisi: popolazione adulta, covata giovane e opercolata, scorte glucidiche e proteiche. Per il prelievo delle api sono stati scelti degli alveari in buono stato di salute, cioè quelli che avevano almeno sette favi coperti di api, in presenza di covata e scorte alimentari abbondanti, sia di zuccheri che di proteine. Le *Varroa* (*Varroa destructor* Anderson & Truemann) sono state invece raccolte da alveari molto infestati, dove non sono stati eseguiti trattamenti acaricidi nei 6 mesi precedenti il prelievo.

2. Saggi di immunocompetenza e immunosoppressione

Dissezioni di larve di ape

Al fine di studiare il livello trascrizionale del gene Amel\102 in diversi tessuti di ape, 15 larve (5^a età) sono state dissezionate secondo la seguente procedura: inizialmente, per ogni larva, sono stati prelevati 20µL di emolinfa mediante puntura sulla parte dorsale al IV urite asportando l'emolinfa fuoriuscita per diffusione. L'emolinfa è stata posta in tubi Eppendorf da 1,5 ml contenente 40µL di soluzione e processata come descritto in seguito. Sono stati esclusi i campioni con emolinfa

torbida o non perfettamente trasparente. In seguito sulla stessa larva, utilizzando delle forcicine da dissezione, è stato prelevato il tessuto nervoso decapitando la larva e selezionando i primi 3 gangli, dopodiché l'intestino è stato sfilato delicatamente dal corpo dell'insetto con uno spillo entomologico sterile. Il tessuto adiposo è stato prelevato aspirando con una micro pipetta direttamente nel corpo della larva. Il resto del corpo è stato prelevato e conservato. Tutti i tessuti sono stati congelati, unendo i tessuti di tre larve alla volta, a -80°C in attesa delle analisi biomolecolari successive.

Conta emocitaria

Per confrontare la concentrazione della frazione emocitaria dell'emolinfa di larve di api infestate da Varroa, 20 larve di 5^a età, di cui 10 infestate da 1 Varroa, sono state prelevate da colonie in buono stato di salute mediante apertura manuale delle cellette. Le larve sono state punte dorsalmente al IV urite con uno spillo entomologico sterile. Sono stati raccolti 2 μL di emolinfa fuoriuscita per diffusione ed aggiunti ad una soluzione contenente 16 μl PBS + 2 μl Trypan blue. Quest'ultima sostanza ha consentito di discriminare gli emociti vivi da quelli morti. Il resto del corpo è stato congelato a -80°C per le successive analisi biomolecolari. Dalla soluzione ottenuta, 10 μl sono stati caricati in una camera di Burker e mediante l'uso di un microscopio biologico a 400x

ingrandimenti si è proceduto alla conta degli emociti. La concentrazione delle cellule espressa in n/mL è stato determinato applicando la seguente formula: $n/mL = \frac{\Sigma \text{emociti}}{n \text{ quadrati}} \times FD \times 25 \times 10^4$ dove $FD = (\text{volume caricato nella camera} / \text{volume iniziale}) \times \text{diluizione}$. La restante parte del corpo delle larve di api è stato immediatamente congelato a -80°C per la successiva estrazione dell'RNA totale e quantificazione del livello trascrizionale di Amel\102 e dell'abbondanza di DWV.

Immuno-stimolazione con impianti di nylon

Per valutare la risposta immunitaria delle larve di api sottoposte ad infestazione di Varroa, in presenza di diversi livelli di infezione da DWV, sono state prelevate 40 larve di 6^a età, disopercolando le cellette che le contenevano e dividendole secondo la presenza o l'assenza di una singola Varroa. A tali larve è stato impiantato in posizione dorso-laterale, tra il III e IV urite, un frammento di nylon sterilizzato ai raggi UV, lungo 5 mm con diametro di 0,08 mm, per una profondità nella cavità emocelica di circa 2mm. Dopo 24 ore di permanenza in piastre Petri a 34°C e 80% HR, gli impianti sono stati rimossi utilizzando micro forbici da dissezione e microscopio ottico con ingrandimento 40x (fig.5).

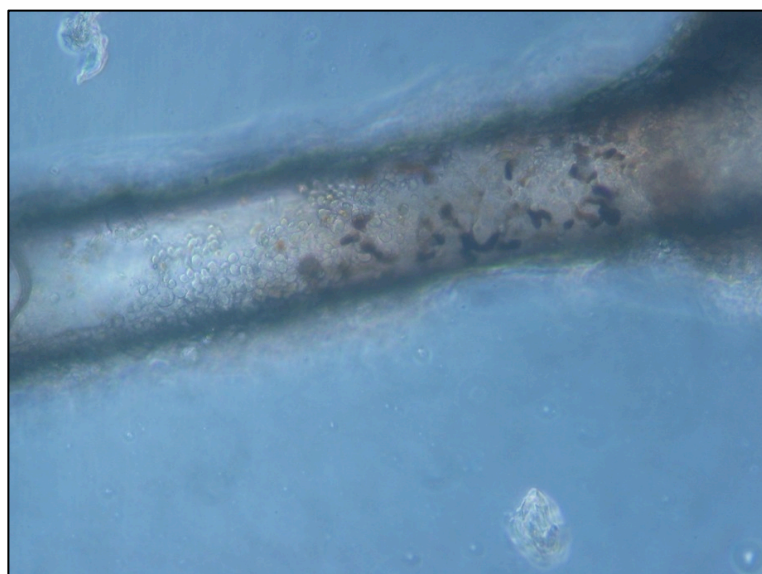


Figura 5. Impianto di nylon completamente ricoperto di emociti (incapsulamento) e parzialmente melanizzato.

Gli impianti sono stati fissati in tampone cacodilato 0,1M pH 7,2 e conservati in frigo a 4°C. In seguito, gli impianti sono stati montati su vetrini portaoggetti da microscopia e fotografati al microscopio biologico a 400x in condizioni standard di luce e apertura/esposizione della fotocamera (Wilson-Rich et al. 2008). Le larve corrispondenti, invece, sono state immediatamente congelate a -80°C, in attesa della successiva estrazione dell'RNA totale e analisi molecolare.

Indice di incapsulamento e di melanizzazione

Per determinare l'indice di incapsulamento e di melanizzazione delle larve sottoposte a infestazione di Varroa e infezione da DWV, le immagini degli impianti sono state sottoposte all'analisi dei toni di grigio

(Mongiardino et al. 2012). Con l'ausilio della risorsa freeware GIMP, sono stati esportati gli istogrammi ed i relativi dati caratteristici, così di seguito elencati: a) numero totale dei pixel, b) numero dei pixel diversi da quelli bianchi (zone con emociti), c) media della distribuzione dei pixel diversi da quelli bianchi. Quest'ultima misura rappresenta la media della gamma di grigi della foto (m), valore che va da 0 a 255 dove 0 significa nero e 255 bianco (Fig. 6) .

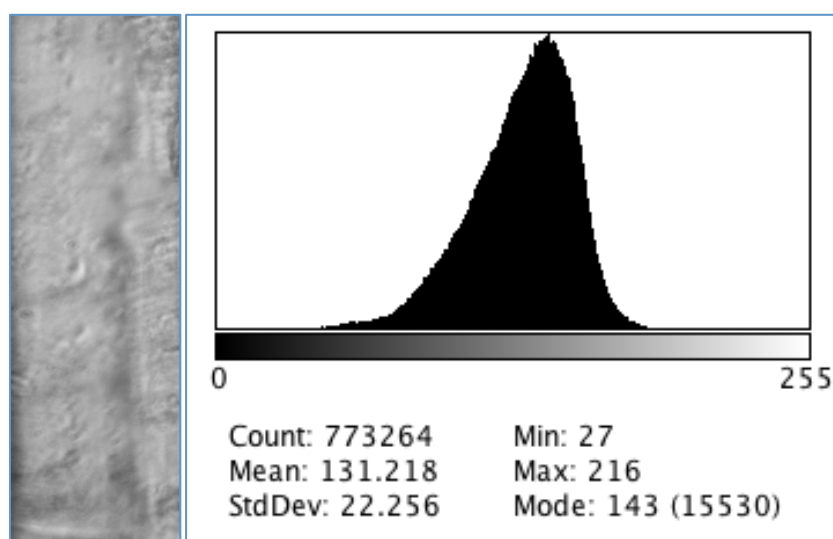


Figura 6. Immagine di un impianto di esempio (a sinistra) e relativo istogramma (a destra) con i dati relativi all'analisi dei pixel dell'immagine.

L'indice d'incapsulamento (% di copertura di emociti) è stato calcolato secondo la formula: $EI(\%) = (\text{n. di pixel diversi dai bianchi} / \text{pixel totali}) * 100$. L'indice di melanizzazione, invece, è stato determinato con la formula: $MI(\%) = [(255 - m) / 255] * 100$.

Prove d'infestazione artificiale con Varroa

Per studiare il livello trascrizionale del gene Amel\102 e del livello di infezione da DWV in api infestate da Varroa sono stati condotti due esperimenti d'infestazione controllata, uno in primavera e l'altro in autunno. Per il primo, da una colonia in buono stato di salute sono state prelevate 48 larve sane di 5^a età e sono state inserite singolarmente in apposite capsule di gelatina di 6,5mm di diametro per un volume di 0,5 ml (Agar Scientific, Stansted, UK)(Fig.7).



Figura 7. Larve di api operaie allevate in capsule di gelatina, in presenza di Varroa, a sinistra e controllo, a destra.

In 24 di queste capsule è stata inserita una femmina adulta di Varroa mediante l'uso di un pennello a punta fine. Il secondo esperimento, invece è stato fatto come il precedente ma utilizzando un totale di 40

larve, di cui 20 infestate e 20 no. Le capsule sono state tenute in incubatore a 34.5°C, 75% UR, per 24H, come suggerito da Dietemann et al. (2013). Dopo 24 ore le larve sono state congelate a -80°C in attesa delle analisi biomolecolari successive.

Intossicazione sub-letale con insetticidi

In via preliminare è stata determinata sperimentalmente, per le api adulte, la DL₅₀ a 24 ore da contatto del neonicotinoide Clothianidin e del fosfororganico Chlorpyriphos. Ad api adulte coetanee è stato applicato sul torace, mediante micro pipetta 1 µL di acetone contenente l'insetticida da testare e soltanto 1 µL di acetone come controllo. Gruppi di 30 api che avevano ricevuto lo stesso trattamento, sono state trasferite in box di plastica da esperimento e mantenute a 34 °C e 80% RH, come descritto da Evans et al. (2009). Dopo 24 ore i box sono stati ispezionati e le api morte contate. Le dosi utilizzate sono state: 10, 20, 30, 40, and 50 ng per il Clothianidine 15, 30, 60, 125, 250, 350, and 500 per il Chlorpyriphos. Questo range di valori copriva i valori di DL₅₀ per le sostanze testate disponibili in letteratura (European Commission, 2005). La determinazione della DL₅₀ è stata eseguita con l'analisi dei Probit (Finney, 1971). Successivamente, api trattate con DL50 di Clothianidin e Chlorpyriphos sono state immuno-stimolate dopo 1 ora mediante puntura, alla base delle ali anteriori con spillo entomologico immerso in

una soluzione di *S. cerevisiae*. Dopo 5 ore di permanenza in incubatore a 34 °C e 80% HR, le api sono state congelate a -80°C per le analisi biomolecolari successive.

Interferenza del DWV e gene Amel\102

Sono stati eseguiti 3 esperimenti di somministrazione orale del dsRNA, di cui 2 con api operaie adulte e larve con dsRNA per il DWV e uno su larve di ape per il dsRNA di Amel\102.

Api operaie neo-sfarfallate sono state prelevate da un telaino tenuto per 12 ore in incubatore a 34 °C e 80% HR. Gruppi di 30 api sono state trasferite in contenitori da esperimento (Evans et al., 2009) alle stesse condizioni di temperatura e umidità sopra descritte ed alimentate con una soluzione di saccarosio 1M contenente, per le prime 6 ore 5.000 copie di DWV per ape, e per le successive 72 ore 1µg per ape di dsRNA per il DWV. Tesi contenenti soltanto DWV o soltanto saccarosio sono state eseguite contemporaneamente. Larve di 3a età sono state prelevate da un telaino di una colonia in buono stato di salute e trasferite in piastre sterili a 96 pozzetti riempite con 500 ul di una dieta composta da: 50% pappa reale, 31% acqua, 18% miele e 1% lievito; in cui sono stati aggiunti per le prime 6 ore 5.000 copie di DWV per ape di DWV, e per le successive 72 ore 1 µg per ape di dsRNA per il DWV. Le piastre sono state poste in un essiccatore contenente una soluzione satura di cloruro di sodio in

modo da avere umidità 75%. L'essiccatore è stato a sua volta posto in incubatore a 32°C. Tesi contenenti soltanto DWV o soltanto saccarosio sono state eseguite contemporaneamente.

Il saggio di somministrazione del dsRNA per Amel\102 è stato eseguito su larve di 3a età così come descritto per quello del dsRNA per il DWV. Ogni 24 ore, dal tempo zero, sono state prelevate e congelate a -80°C,5 api per le successive analisi biomolecolari.

Prova di prolificità della Varroa

Allo scopo di valutare se il DWV, interferendo con la risposta di melanizzazione, faciliti l'attività trofica della Varroa e di conseguenza migliori la fitness del parassita, abbiamo studiato il tasso di riproduzione dell'acaro quando si sviluppa sia su api sane che su api in cui era in atto un'infezione sintomatica, rivelata dalle caratteristiche ali deformate, che regolarmente si osservano in api con alto tasso di DWV.

Per fare questo abbiamo infestato artificialmente larve L5 con una Varroa e le abbiamo tenute in capsule di gelatina in condizioni di laboratorio per 12 giorni; quindi, dopo l'impupamento, abbiamo registrato sia le condizioni delle api sfarfallate che il numero di figli generati da ciascun acaro madre durante la metamorfosi delle api.

Gli esemplari di *V. destructor* utilizzati per l'infestazione sperimentale sono stati ottenuti da colonie infestate mantenute nell'apiario

sperimentale dell'Università degli Studi di Udine. Per ottenere le larve L5 e gli acari necessari all'infestazione artificiale, tutte le celle opercolate presenti in diverse covate ottenute da colonie sia altamente che poco infestate sono state marcate la sera prima dell'esperimento. Il giorno seguente i telaini contenenti le covate sono stati trasferiti in laboratorio e tutte le celle chiuse ma non marcate, e che quindi erano state opercolate nelle 12-15 ore precedenti, sono state disopercolate mediante pinzetta entomologica. Il telaino è stato quindi posto in incubatore a 35°C e umidità relativa 75% per permettere alle larve di fuoriuscire dalle celle disopercolate insieme agli acari eventualmente presenti. Le larve sono state quindi inserite individualmente insieme ad una *Varroa* in capsule di gelatina di 6.5 mm di diametro (Agar Scientific, Stansted, UK) e sono state poste in un incubatore a 35°C, 75% di umidità. Dopo 12 giorni, le capsule sono state aperte: quelle contenenti api o *Varroa* morte sono state scartate mentre per le altre il numero di figli generati e le condizioni delle api è stato registrato; per l'esperimento sono state considerate solo quelle api in cui era possibile distinguere nettamente le ali normali o deformate.

L'esperimento è stato replicato sei volte utilizzando, in totale, alcune centinaia di api per ciascun gruppo sperimentale. Sono state ottenute in totale 149 api, 100 con ali normali e 49 con ali deformi.

3. Analisi molecolari e bioinformatiche

Isolamento e caratterizzazione del gene Amel\102

Il gene Amel\102 è stato isolato dal confronto, mediante l'algoritmo di comparazione di sequenze BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con la proteina P102 di *Heliothis virescens* (accession number: CBY85302.1) usando come database “Non-redundant protein sequences (nr)”. La porzione nota dell'mRNA ottenuta dall'analisi di sequenze in banca dati è stata allungata, ottenendo l'mRNA completo, mediante analisi RACE 3' e RACE 5' (Rapid Amplification of cDNA Ends). Allo scopo, sono stati utilizzati una serie di primer specifici (Tab. 2) e i kit 3' and 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguendo la procedura suggerita dalla casa produttrice, così come dettagliato in appendice.

L'identificazione dei domini conservati e la predizione della struttura secondaria della proteina Amel\102 è stata ottenuta mediante l'algoritmo EMBOSS: Garnier e il tool InterProScan. L'allineamento delle sequenze di *H.virescens*, *S. littoralis*, *D. melanogaster* e *A. mellifera* è stato eseguito utilizzando l'algoritmo ClustalW. Tutte le analisi bioinformatiche sono state eseguite con Geneious v6.1.6 (Biomatters).

Preparazione del dsRNA

I frammenti di dsRNA sono stati preparati con il kit MEGA-script RNAi Kit (Ambion, Austin, TX) seguendo le istruzioni consigliate dalla casa produttrice. I primer (Tab. 2) sono stati disegnati, per il DWV a partire dalla sequenza presente in banca dati (accession number: NC_004830.2) e per Amel\102 dalla sequenza isolata, clonata e sequenziata della Open Reading Frame ottenuta con le reazioni di RACE 3' e RACE 5'.

Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato isolato mettendo i campioni in tubi Eppendorf da 1,5 ml ed omogeneizzate con TRIzol Reagent (RNA extraction kit, Invitrogen, Carlsbad, CA) seguendo le istruzioni dettate dalla casa produttrice. A seguito di centrifugazione e precipitazione a freddo, il pellet di RNA risultante è stato risospeso in Acqua MilliQ sterile (Milliporesystem) in presenza di DNAsi (Ambion, Austin, TX). La concentrazione di RNA totale è stata determinata misurando l'assorbimento a 260 nm mentre la purezza dell'RNA è stata stimata calcolando il rapporto di assorbanza 260nm/280nm utilizzando il biofotometro (Eppendorf, Hamburg, Germany). I campioni di RNA sono stati conservati a -80 °C in freezer fino al momento delle analisi successive. Al fine di valutare la corretta esecuzione delle estrazioni è

stata effettuata sugli estratti un'analisi dell'integrità delle molecole con un elettroforesi su gel di agarosio allo 0,8 %.

Scelta dei primer

Le sequenze dei primers per la RT-PCR convenzionale, qRT-PCR, RACE 3', RACE 5' e sintesi del dsRNA sono stati progettati sulla base di sequenze precedentemente riportate in banca dati genomica. Allo scopo sono state utilizzate le risorse software "PrimerExpression", versione 1.0 (PE AppliedBiosystem) e Primer3 V.0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (Chen et al., 2006). Tutti i Primer sono stati sintetizzati da Invitrogen (Carlsbad, CA) (Tab. 2).

UTILIZZO	NOME	SEQUENZA	LUNCHEZZA AMPLIFICATO (BP)	RIFERIMENTO
DWV per dsRNA	DWV-VP1-F	TAA TTG TAG GTT ATG TGC CCC GG (22)	742	Questo lavoro
	DWV-VP1-R	GGC CTT CTC ATC AGT TAA TGA T (22)		
	DWV-VP1-F- T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGAGCA TAT AGA CCA TGG TGG GTG CG (44)	606	Questo lavoro
	DWV-VP1-R- T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GCA AGC TGG CGA GCT CGT TCA G(43)		
102 per dsRNA	Amel\102-F1	TGG GCA CAT AAA TTA TCA AAA CCA (24)	721	Questo lavoro

	Amel\102-R	CCA ATT CTG GAG TTG TTC CAA (21)		
	Amel\102 T7-F	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC TGA TAA TGC TTC TGA GAG G (43)	402	Questo lavoro
	Amel\102 T7-R	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GCA TGT TCA AAT CCA GAA CTA TC (44)		
Amel\102 RACE 5'	GSP Amel\102 5' RACE	ATGGTTTCATTTATATCCT CGA (22)		Questo lavoro
	NESTED GSP Amel\102 5'	GATATAATGTTATATGTCA TGC (22)	473	Questo lavoro
Amel\102 RACE 3'	GSP Amel\102 3' RACE	CCTCGAAGTAAAGGAATA ACTG (22)		Questo lavoro
	NESTED GSP Amel\102 3'	GAACATGTATTTATAGGA GAAAG (23)	444	Questo lavoro
DWV per Real time	qDWV - F	GCG CTT AGT GGA GGA AAT GAA (21)	69	Di Prisco et al. 2013
	qDWV-R	GCA CCT ACG CGA TGT AAA TCT G (22)		
102 per Real time	qAmel\102-F	CAA CTC CAG AAT TGG AAA TAG CA (23)	160	Questo lavoro
	qAmel\102-R	TTT GCA ATA GGA AAA GCA GTT G (22)		
Actina per Real time	qActina F	GAT TTG TAT GCC AAC ACT GTC CTT (24)	69	Di Prisco et al. 2013
	qActina R	TTG CAT TCT ATC TGC GAT TCC A (22)		
LRR per Real Time	qLRR F	CTT GGT GAA GGC CTT GAT G (19)	87	Di Prisco et al. 2013
	qLRR R	ATG CAA AGA GCT ATC ATC A (19)		

Tabella 2. Elenco dei primer utilizzati per lo svolgimento delle analisi molecolari.

RT-PCR convenzionale

Le Api utilizzate per gli esperimenti state raccolte e testate per la presenza dei principali virus delle patogeni RT-PCR convenzionale. Allo scopo è stato utilizzato il kit “SUPERSSCRIPT™ III Onestep with Platinum® TaqHigh Fidelity (Life technologies) seguendo le indicazioni procedurali dettate dalla casa madre. La miscela di reazione era composta da: 1 x AMV/Tfl di Reaction Buffer, 0.2 mM di ogni dNTP, 1 uM di ogni Primer, 2 mM MgSO₄, 0.1 unità di enzima AMV, 0.1 unità di enzima Tfl DNA polimerasi e 500 ng RNA totale in un volume finale di 25 µl. Il profilo di amplificazione consisteva di un ciclo di 48 °C per 45 minuti seguita da 40 cicli a 95 °C per 30 secondi, 55 °C per 1 minuto, e 68 °C per 2 minuti. In ogni reazione sono stati inseriti controlli negativi (H₂O) e controlli positivi (DNA plasmidico con inserto target). I prodotti della PCR sono analizzati con elettroforesi su gel di Agarosio al 1,5% contenete 0,5 µg/ml di Bromuro di Etidio e rilevati con transilluminatore UV. Per prevenire eventuali fenomeni di contaminazione, la preparazione delle reazioni e l’analisi dei prodotti di PCR sono state effettuate in stanze separate.

Sequenziamento

La specificità delle reazioni di PCR sono state verificate attraverso analisi di sequenze. Bande specifiche RT-PCR sono state asportate da gel di agarosio “Low Melting Temperature” al 1,5% (Invitrogen, Carlsbad, CA) e purificate usando il kit “PURE LINK quick gel extraction kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Le sequenze nucleotidiche sono state determinate per entrambi le direzioni, forward e reverse. L’analisi delle omologie è stato effettuato la risorsa software online “mega BLAST server” del National Center for Biotechnology Information, NIH.

CYBR-Green Real-Time RT-PCR (qRT-PCR)

La quantificazione del livello trascrizionale di Amel\102, del numero di copie di DWV e del gene endogeno β -Actina, utilizzando primer specifici come in Tab. 2 è stata eseguita mediante SYBR-Green Real-Time qRT-PCR con il sistema “Applied biosystem StepOne™ Real Time-PCR System” a 48 pozzetti e utilizzando come molecola intercalante del DNA il SYBR®Green (AppliedBiosystems, Carlsbad, CA, USA). La normalizzazione dei dati è stata effettuata quantificando il livello trascrizionale dell’housekeeping β -Actina. Le reazioni di amplificazione per il gene Amel\102 sono state effettuate in un volume finale di 20 μ l e assemblate come indicato in Tab. 3

Componenti	Quantità	Concentrazione
RT-PCR mix 2X	10 µl	1 X
Primerfv (10 µM)	0,6 µl	300 nM
Primerrv	0,6 µl	300 nM
RT-enzyme mix 125X	0,16 µl	1 X
H ₂ O	7,64 µl	
RNA	1 µl	

Tabella 3. Componenti della reazione di qRT-PCR per Amel/102.

Le reazioni di amplificazione per DWV e β -Actina sono state effettuate in un volume finale di 20 µl e assemblate come indicato in Tab. 4

Componenti	Quantità	Concertazione
RT-PCR mix 2X	10 µl	1 X
Primer f (10 µM)	0,2 µl	100 nM
Primer r (10 µM)	0,2 µl	100 nM
RT-enzyme mix 125X	0,16 µl	1 X
H ₂ O	8,44 µl	
RNA	1 µl	

Tabella 4. Componenti della reazione di qRT-PCR per DWV e β -actina.

Il ciclo termico delle reazioni di RT-PCR e la relativa curva di melting per la determinazione della specificità dei prodotti di PCR è riportato in Tab. 5

Step	Cicli	Temperatura	Tempo
Holding Stage (Retro trascrizione)	1	48°C	30 min
	1	95°C	10 min
Cycling Stage (PCR)	40	95°C	15 sec
		60°C	1 min
Melt Curve Stage	1	95°C	15 sec
		60°C	1 min
		95°C	15 sec

Tabella 5. Ciclo standard della qRT-PCR.

Controlli negativi (assenza di template e assenza di enzima) sono stati inclusi in ogni esecuzione della reazione. L'interpretazione e la convalida dei risultati sono state condotte utilizzando il metodo del Delta-Delta-Ct come descritto di seguito.

Quantificazione relativa (metodo del $\Delta\Delta Ct$)

I valori di Ct delle reazioni qRT-PCR sono stati mediati ed utilizzati per la quantificazione del titolo del target con il metodo del $\Delta\Delta Ct$. La quantità media di titolo del target di ciascun gruppo è stata normalizzata con la β -Actina come controllo endogeno, secondo la formula: $\Delta Ct = Ct_{(Virus)} - Ct_{(\beta-actina)}$. Il valore ΔCt di ciascun gruppo è stato confrontato con il valore del ΔCt utilizzato come calibratore, come da formula

seguinte: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(target)} - \Delta Ct_{(calibratore)}$. La quantità relativa è stata quindi calcolata utilizzando la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Al fine di valutare la sensibilità del metodo sono state confrontate le efficienze delle reazioni qRT-PCR per il target e la β -Actina di diluizioni seriali, in triplice copia, di un estratto totale a concentrazione nota (da 1 μ g a 0,32ng). Per validare il metodo, la retta di regressione ottenuta confrontando la quantità di target con i ΔCt deve avere una curva con pendenza $<0,1$ indicando quindi che le due efficienze sono approssimativamente uguali.

Quantificazione assoluta (Curva standard assoluta)

La quantità assoluta di target è stata determinata mettendola in relazione con i Ct risultanti con una curva standard assoluta. Per costruire una curva standard per la quantificazione assoluta, ampliconi purificati di target derivanti da RT-PCR convenzionale sono stati inseriti nel vettore di clonaggio PCR[®]2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguendo le istruzioni del produttore. Il DNA plasmidico ricombinante, consistente nel vettore plasmidico e l'inserto target è stato poi purificato utilizzando il kit "Plasmid Mini Prep Kit" (Bio-Rad, Hercules, CA). Il numero di copie del DNA plasmidico ricombinante è stato calcolato in base alla concentrazione molare e la massa molecolare dello stesso [N.° copie = (concentrazione di DNA) \times (volume della reazione) \times (n.° di Avogadro,

$6,022 \times 10^{23}$ molecole/mole)/(massa molare del plasmide ricombinante)]. Sei diluizioni seriali che vanno da 155 a 0,6 ng di DNA plasmidico sono stati sottoposti a qPCR. Ogni campione è stato analizzato in triplice copia per motivi statistici. Per valutare la relazione tra i valori di Ct ed il numero di copie di target standard è stata utilizzata la regressione lineare.

L'efficienza di amplificazione (E), dipendente dalla pendenza della curva standard è stata calcolata in base alla seguente formula: $E=10^{(-1/\text{slope})-1}$ (https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/appendix/PCR_RT/PCR/Important%20Parameters%20of%20qPCR.pdf).

4. Analisi statistica

L'analisi della normalità dei dati è stata effettuata con il test statistico Shapiro-Wilk test, mentre l'omoschedasticità è stata verificata mediante il test di Levene. La concentrazione emocitaria, sia per i vivi che per i morti, in api infestate da *Varroa* e non è stata confrontata con il test statistico T di Student a due code. La correlazione tra il livello di infezione da DWV e la concentrazione di emociti, l'indice di incapsulamento, l'indice di melanizzazione, il livello trascrizionale di *Amel\102* e del livello trascrizionale di *Amel\LRR* sono stati analizzati con il test non parametrico Spearman's Rank-Order. Il livello trascrizionale di *Amel\102* nei tessuti dell'ape è stato analizzato con il

test statistico ONE-WAY ANOVA e HSD di Tukey come test post hoc. Il livello trascrizionale di Amel\102 e il livello di infezione da DWV nelle larve dell'esperimento d'infestazione artificiale con Varroa e nelle api trattate con insetticidi, sono state analizzate con il con il test T di Student. La progenie della Varroa allevata su api con ali deformi e api normali è stata analizzata con il test non parametrico di Mann-Whitney; la fertilità complessiva, invece, è stata analizzata con Chi square test. In tutte le figure le barre di errore rappresentano la deviazione standard dei dati intorno alla media.

RISULTATI

1. Immunocompetenza a DWV e/o Varroa

Conta emocitaria

Come mostrato in Fig. 8 la concentrazione di emociti nell'emolinfa di larve non è significativamente differente da quella con infestazione di Varroa, sia per gli emociti vivi che raggiungono una concentrazione di circa 2.000 emociti/mm³ che per quelli morti con una concentrazione pari circa 150 emociti/mm³ (T-test, emociti vivi Larva vs emociti vivi Larva + Varroa $t_{18} = 0,848$ $p=0,409$; emociti morti Larva vs emociti morti Larva + Varroa $t_{18} = -1,75$ $p=0,097$).

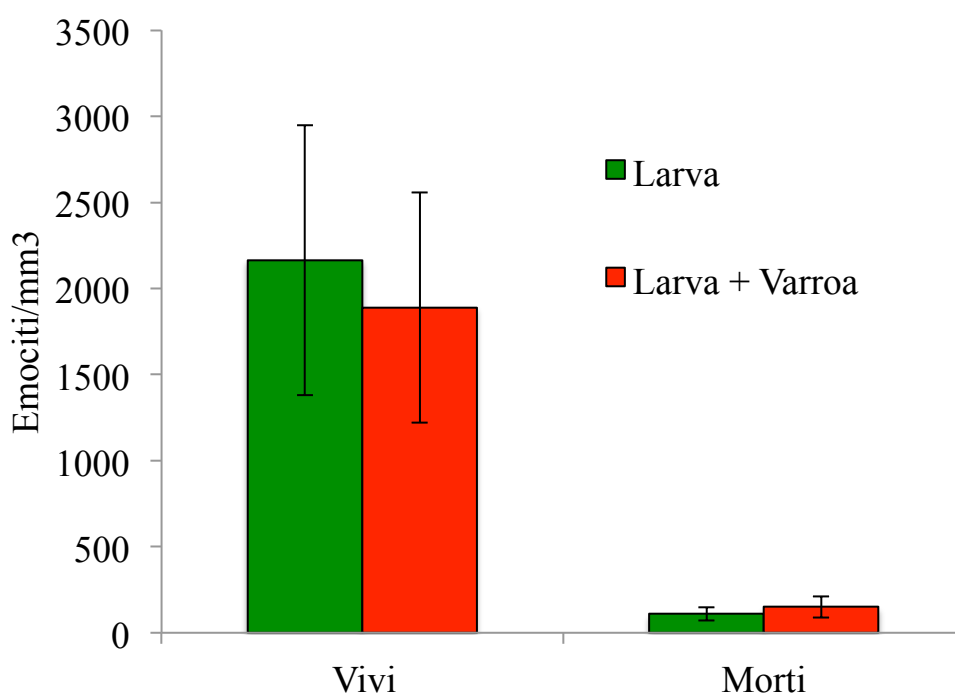


Figura 8. Concentrazione di emociti vivi (a sinistra) e morti (a destra) nell'emolinfa di larve di api operaie infestate da Varroa e non.

La Fig. 9 mostra come la concentrazione di emociti, sia vitali che morti, risulta essere non correlata al grado d'infezione virale da DWV, anche quando quest'ultimo raggiunge picchi di copie genomiche di circa 10^{12} (Spearman's Rank-Order Correlation: DWV vs Emociti vivi $\rho = -0,211$ $p = 0,371$; DWV vs Emociti morti $\rho = 0,131$ $p = 0,581$; Emociti vivi vs Emociti morti $\rho = -0,007$ $p = 0,977$).

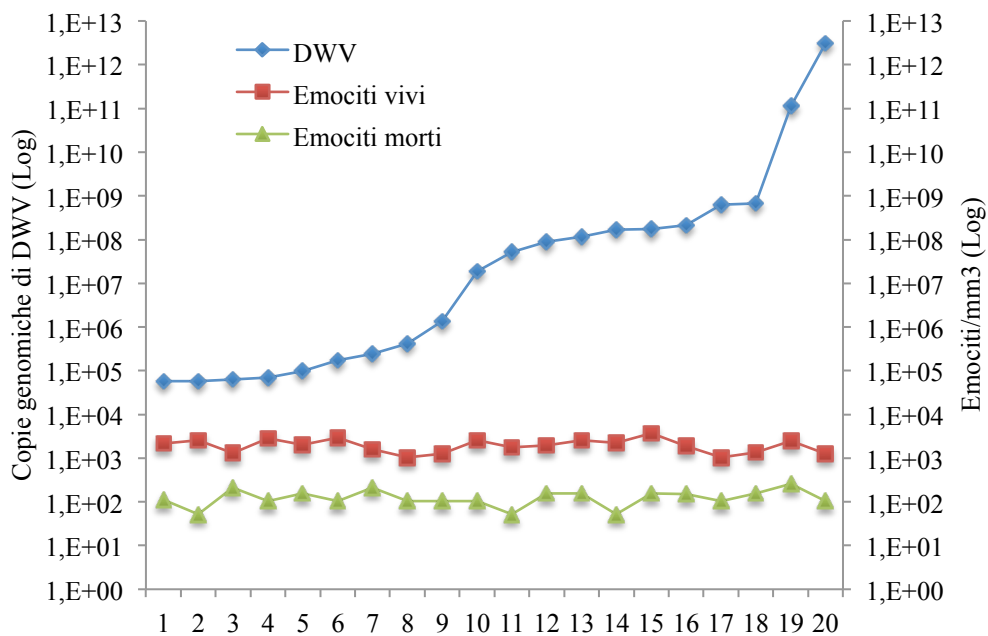


Figura 9. Rappresentazione del numero di emociti vivi, morti e relativo livello di DWV in larve di api operaie.

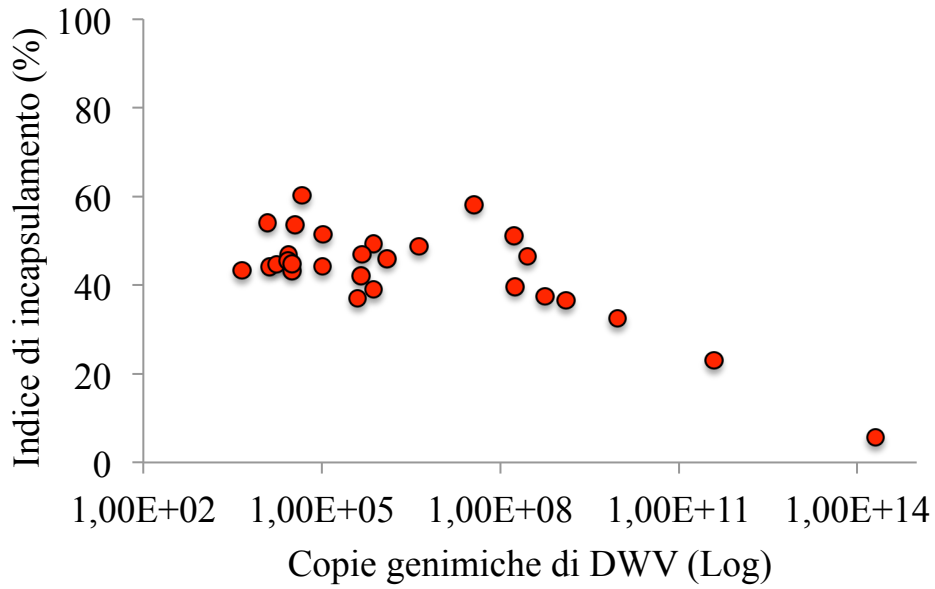
Indice di incapsulamento e melanizzazione

L'indice di incapsulamento e di melanizzazione, espresso in percentuale, in larve di ape, immuno-stimolate per 24 con un impianto intraemocelico

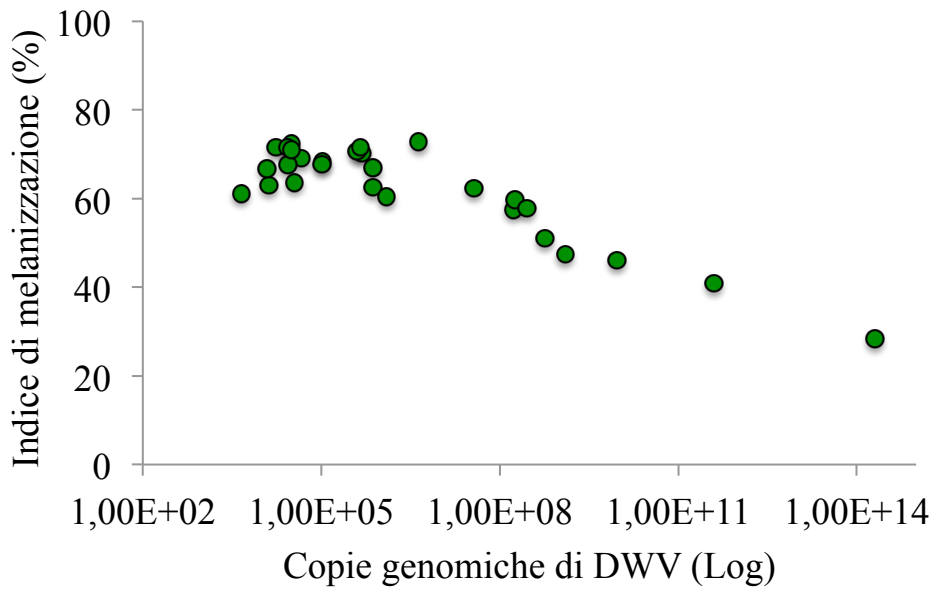
permanente, risultano negativamente correlati con il titolo di DWV (Fig. 10 A, B, C) (Spearman's Rank-Order Correlation: DWV vs indice di incapsulamento $\rho = -0,390$, $p = 0,040$; DWV vs indice di melanizzazione $\rho = -0,645$, $p < 0,001$). Dall'analisi RT-PCR per la presenza di altri virus, solo due campioni sono risultati positivi per BQCV (virus della cella reale nera) e uno solo per SBV (virus della covata a sacco).



(A)



(B)



(C)

Figura 10. Sequenza di foto dell'impianto intraemocelico in presenza di livelli crescenti di DWV (A). Indice di incapsulamento (B) e di melanizzazione (C) in larve di api operaie con livello crescente di infezione da DWV.

2. Immunosoppressione indotta da DWV e/o Varroa

Isolamento e caratterizzazione del gene Amel\102

Dall'analisi di sequenza è stata ottenuta un'omologia del 36% tra la sequenza amminoacidica della proteina P102 di *Heliothis virescens* la sequenza trovata in banca dati per *Apis mellifera* (accession number: XP_003251941.1) (Fig 11). La sequenza nucleotidica corrispondente è stata allungata con analisi RACE 3' e RACE 5' ottenendo un contig di 1045 nucleotidi (Fig 12).

```
>ref[XP_003251941.1] UGM PREDICTED: poly(U)-specific endoribonuclease homolog [Apis mellifera]
Length=270

GENE ID: 100577355 LOC100577355 | poly(U)-specific endoribonuclease homolog
[Apis mellifera]

Score = 175 bits (444), Expect = 4e-55, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 95/266 (36%), Positives = 155/266 (58%), Gaps = 5/266 (2%)

Query 98 DEDILRVSEEMFNADINNALAYIQVNLQGKTSPLSKDDKAPANLLSVPENVWNGPTIRPF 157
          D +++ VSEE+P N L Y+ +N Q + + D A LL+V N+++ TI+
Sbjct 6 DMELMTVSEELFKKS-PNLLNYVHINYQNQIYFNNFTDNASERLLNVSPNIFSIITIKSL 64

Query 158 AALFDNYHKNVIRPEFVTPNEETEQVTFINTILATGPIRSLMNFVSKGLTQMNEYNEQV 217
          LF+NY + + E VT E+ E+ FIN ++ T + +M+FL SKG + + Y +
Sbjct 65 IKLFNNYELDTYQSEVVTKEDLEENEFINNLMKTDIMLYVMHFLSSKGFPPKNDIYIHK- 123

Query 218 ELLKKIWFTKYARHWTGLCKCSCAFENIFMAELKSN-DVLGLHSLWLFPAKREQDRKANYL 276
          +LK+IWF Y R S FE++F+ E KS+ +++GLH+W+FF E K NY
Sbjct 124 NILKQIWFHLYPRSKGITVLDSSGFEHVFIGERKSHKNIIGLHNWIFPFYGESSNKINYP 183

Query 277 GYLDKLDLSGKGMILKQHSILSETKDAPEVTMFGVGTSPLEVALYTMCFMARPDRPCLRLR 336
          G+ + ++ K +IL+ + + +MF+GT+PELE+ALYT+CF RP++ C+L
Sbjct 184 GFANNKKIANKAILEIY--FTYIGKYKSSMFIGTTELEIALYTLCPFTRPNKKCKLS 241

Query 337 YNNINFSIQTKLTKSDNVLLIDTAYP 362
          + I F IQT L+++ + I TA+P
Sbjct 242 FAGIKFDIQTYMLQNNGLKFIATAPP 267
```

Figura 11. Analisi della sequenza amminoacidica della proteina P102 di *H. virescens* e Amel\102.

```

>Amel\102
ATAACCTATAATTTCTATTACTTATTGAAAGTTAAAATCTATTTTAAAAAATGTTAATTA
CAATTTTTCAAATTTACATTCTAATTACATTAAGTATTGTAAATATATTCTTTTACAAGTC
ATCAAATTAATGATATCAATAACATTA AAAATATGTCTATAGTAAATGATATGGAATTA
TGACAGTATCAGAAGAATTATTTAAAAAATCTCCTAATTTACTTAATTATGTGCACATAA
ATTATCAAACCAAATATATTTTAATAATTTTACTGATAATGCTTCTGAGAGGTTGTTAAA
TGTATCATTTAATATTTTTTCAATATTAACAATAAAAATCTCTTATAAAATTATTTAATAAT
TATGAATTAGATACTTATCAATCAGAAGTTGTAACAAAGGAAGAAGATCTAGAAGAAAA
TGAATTTATTAACAATTTAATGAAAACAGATATAATGTTATATGTCATGCATTTTTTATCA
TCCAAAGGTTTCTTTAAAAATGACATATACATTCATAAAAACATTTTGAAGCAAATATGG
TTTCATTTATATCTCTCGAAGTAAAGGAATAACTGTCTGGATAGTTCTGGATTGAACATG
TATTTATAGGAGAAAGAAAATCGCATAAAAATATTATAGGACTCCATAATTGGATTTTCT
TTTTTATGGAGAATCATCAAATAAAATTAATTATTTTGGATTTGCTAATAATAAAAAAA
TTGCTAATAAAGCAATCATCTTAGAAATATATTTCACTTATATTGGAAAATATAAAAAAT
CAAGTATGTTTATTGGAACAACCTCCAGAATTGGAAATAGCACTTTATACACTCTGTTTTTT
TACAAGACCAAATAAAAAATGTAAATTATCTTTTGC GGGAATTA AATTTGATATTCAAAC
ATATATGTTACAAAATAATGGTTTTAAAATTTATTGCAACTGCTTTTCCTATTGCAAATAG
GATATTATTTTAAAAATATTATTTTGAATTA AAAATATTTTAATATTATTTTTTTGTATTATAT
AAATCAAGATAAAAAA

```

Figura 12. Sequenza nucleotidica di Amel\102. In viola i primer utilizzati per l'analisi RACE 3', mentre in verde quelli usati per l'analisi RACE 5'.

L'identificazione dei domini conservati e la predizione della struttura secondaria della proteina Amel\102 indica la presenza di un dominio XendoU (Fig.13).

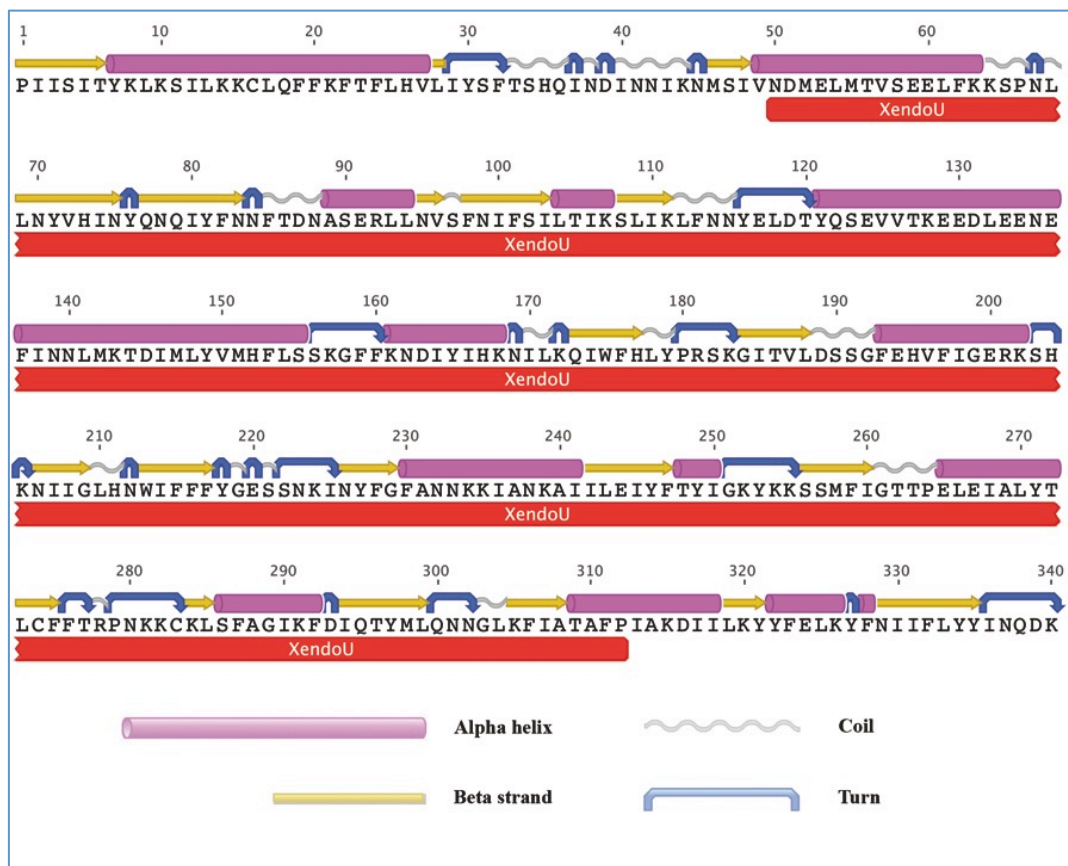


Figura 13. Identificazione dei domini conservati e la predizione della struttura secondaria della proteina Amel102.

L'allineamento delle sequenze della proteina P102 di *H.virescens*, *S. littoralis*, *D. melanogaster* e *A. mellifera* mostra l'identità di sequenza e l'alta conservazione degli amminoacidi (tonalità crescenti di grigio) (Fig.14)

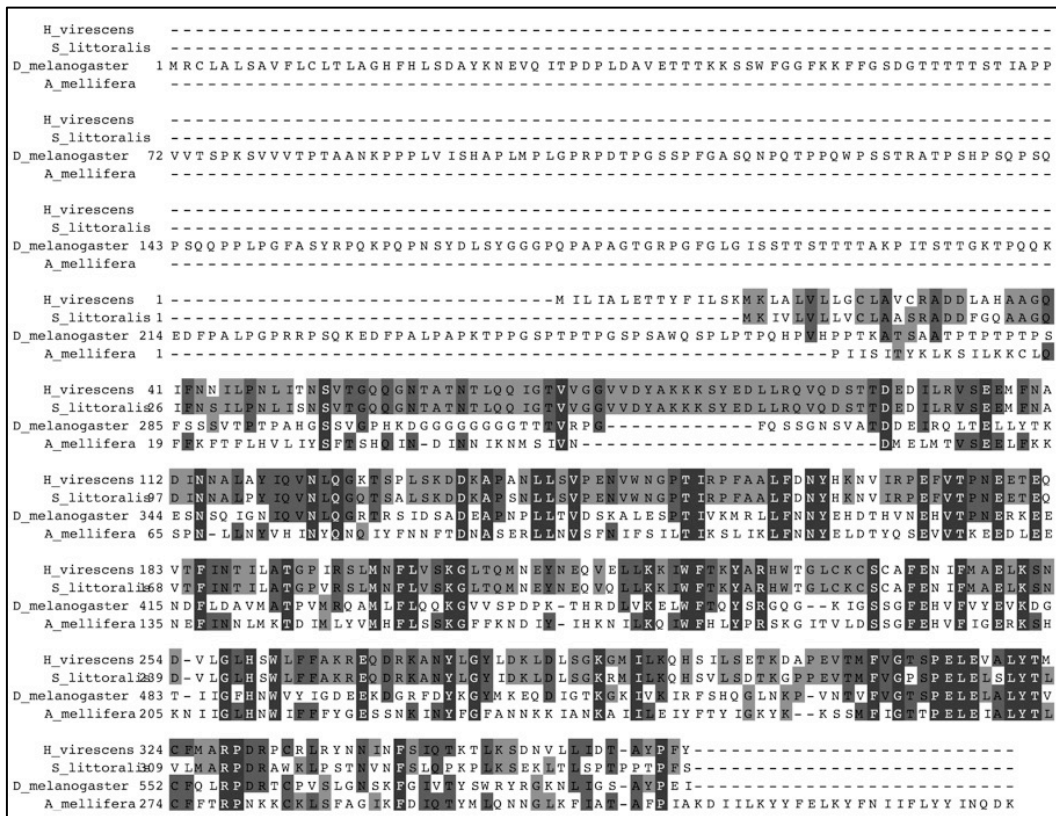


Figura 14. Allineamento delle sequenze della proteina P102 di *H. virescens*, *S. littoralis*, *D. melanogaster* e *A. mellifera*. L'identità di sequenza è mostrata dalla diversa gradazione di grigio.

Espressione del gene Amel\102 nei tessuti dell'ape

La Fig. 15 mostra la quantificazione relativa del gene Amel\102 nei tessuti della larva di ape analizzati: emociti, tessuto nervoso, intestino, tessuto adiposo. Il livello trascrizionale di Amel\102 risulta significativamente differente nei vari tessuti. (ONE-Way ANOVA, $F_{(3,6)}=13.561$, $P=0.004$). L'analisi post-hoc HSD di Tukey rivela come soltanto il livello trascrizionale di Amel\102 nell'intestino risulta significativamente differente dagli altri tessuti. (Intestino vs emociti

$p < 0,001$; intestino vs t. nervoso $p < 0,001$; intestino vs t. adiposo $p = 0,008$).

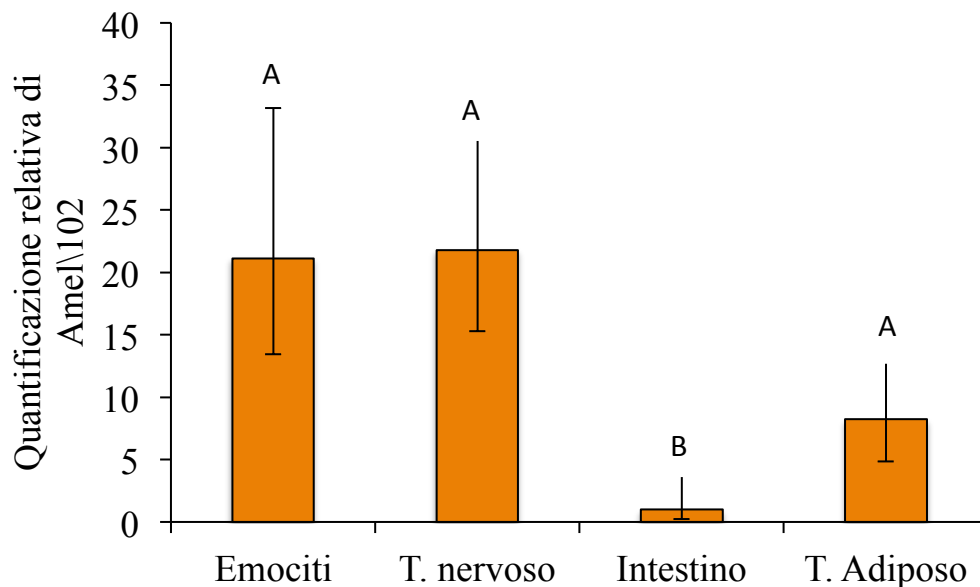


Figura 15. Profilo di trascrizione del gene Amel102 nei tessuti di ape: emociti, tessuto nervoso, intestino e tessuto adiposo. Lettere differenti corrispondono a differenze statisticamente significative.

Amel102 e infezione da DWV

Coerentemente con il ruolo centrale del gene Amel102 nell'incapsulamento e melanizzazione e con l'effetto di DWV su tali processi, il livello trascrizionale di tale gene, in api immuno-stimolate per 24 ore con un impianto intraemotelico risulta negativamente correlato al titolo virale di DWV (Fig. 16) (Spearman's Rank-Order Correlation: DWV vs Amel102 $\rho = -0,616$ $p < 0,001$).

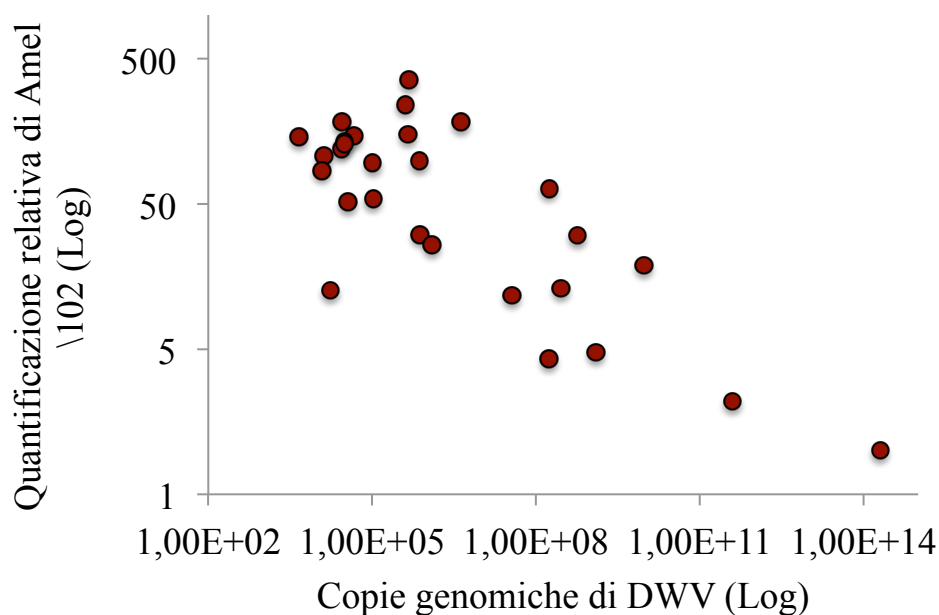


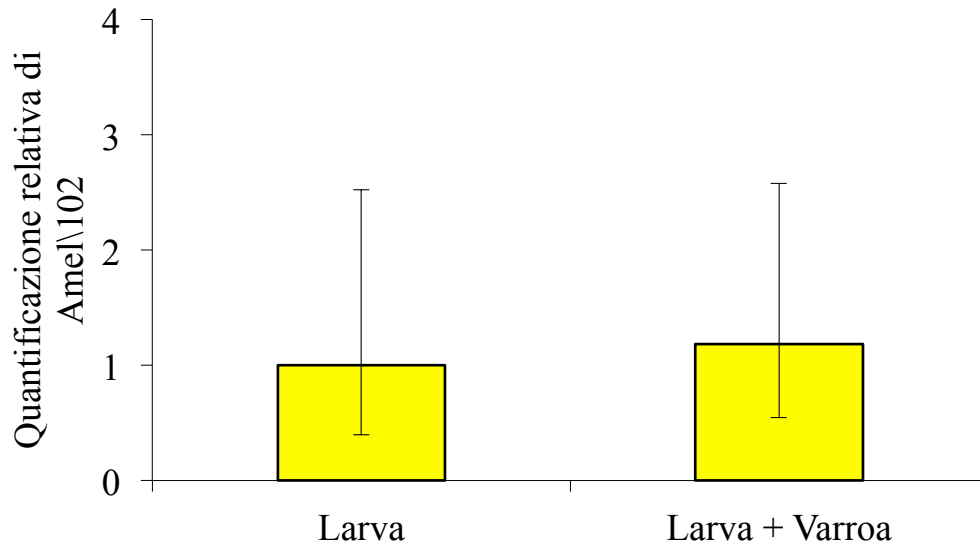
Figura 16. Livello trascrizionale di Amel\102 e copie genomiche di DWV in larve di api operaie (Spearman's Rank-Order Correlation, $p < 0,001$).

Amel\102 e infestazione da Varroa

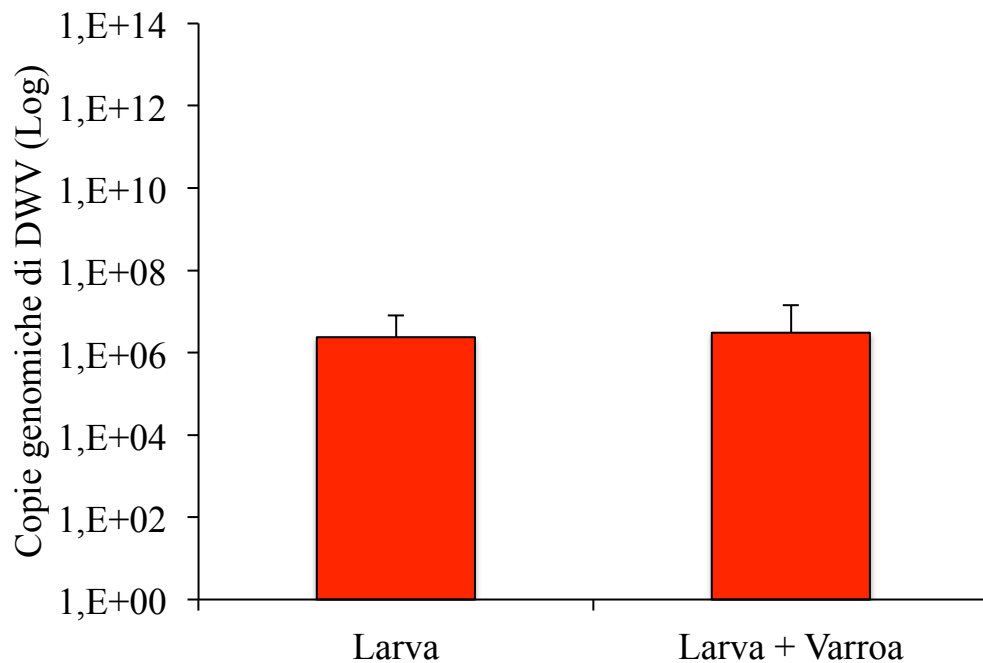
Per verificare se la correlazione negativa tra l'infezione da DWV e il livello trascrizionale di Amel\102 era esclusivamente dovuta all'azione del DWV, larve di ape sono state esposte ad infestazione controllata di Varroa, valutando come il livello trascrizionale di Amel\102 veniva influenzato dalla Varroa, in assenza o presenza del DWV.

Nell'esperimento con api primaverili il livello di trascrizione del gene Amel\102 e l'infezione da DWV, che raggiungeva un numero di copie di circa 10^6 , non è significativamente differente tra i gruppi di api con e senza infestazione da Varroa (Fig. 17 A, B), (T-test, Amel\102 Larva vs

Larva+Varroa $t_{46} = 0,683$ $p = 0,498$; DWV Larva vs Larva+Varroa $t_{46} = 0,284$ $p = 0,777$).



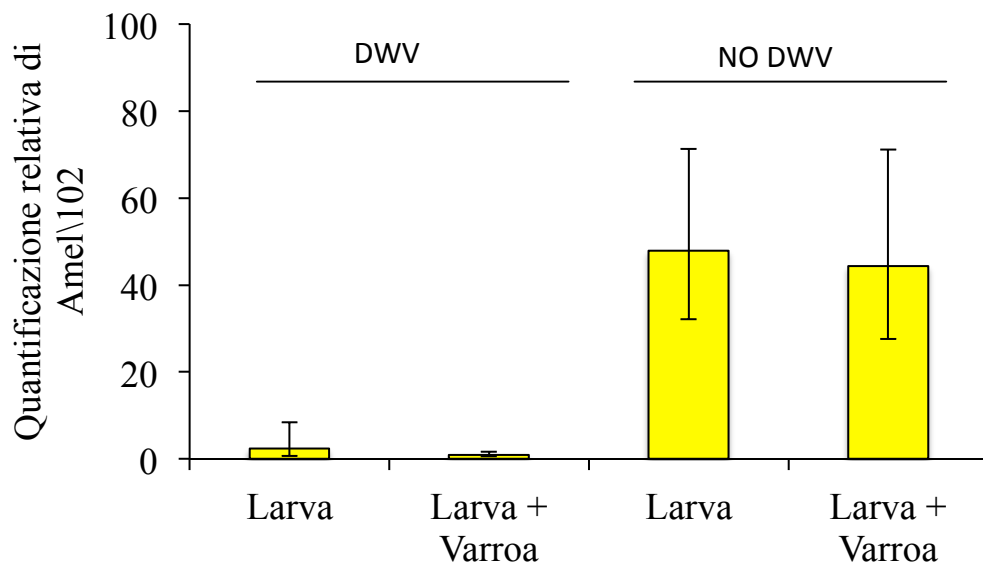
(A)



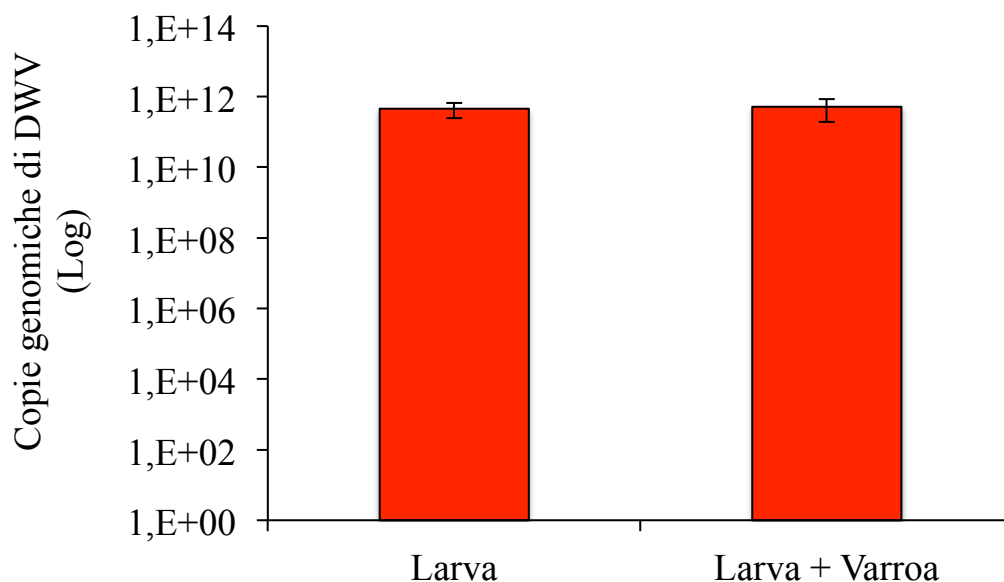
(B)

Figura 17. Livello trascrizionale di Amel102 in larve di ape, provenienti da colonie primaverili, infestate e non con Varroa (A) e relativo numero di copie virali (B).

Nell'esperimento autunnale, invece, la differenza del livello trascrizionale di Amel\102 tra i gruppi di api sperimentali infetti da DWV e quelli DWV-free, è altamente significativa. Il numero di copie virali raggiungeva circa 10^{12} , risultando non dipendente dall'infestazione di Varroa (Fig. 18 A, B) (Two-Way ANOVA, effetto principale DWV $F_{1,36} = 176,41$, $p < 0,01$; effetto principale Varroa $F_{1,36} = 3,60$, $p = 0,066$; T student, DWV Larva vs DWV Larva+Varroa $t_{18} = -0,615$ $p = 0,547$).



(A)



(B)

Figura 18. Livello trascrizionale di Amel\102 in larve di api operaie infestate con Varroa e non, in presenza di infezione virale dal DWV (A) e numero di copie virali in api infette da DWV infestate da Varroa.

Amel\102 e attivazione di Nf-KB

Per valutare l'attivazione del pathway Toll, è stato misurato il livello trascrizionale del peptide antimicrobico Amel\102 in api trattate con LD₅₀ di Clothianidin o Chlorpyryphos e immunostimolante con *S. cerevisiae*. Il trattamento con Clothianidin ha ridotto in modo significativo il livello di trascrizione del gene Amel\102 che, al contrario, non è stato influenzato da Chlorpyryphos. (Fig. 19) (T-test: Clothianidin controllo vs trattato $t_{(28)} = 6,551$ $p < 0,001$; Chlorpyrifos controllo vs trattato $t_{(28)} = 0,847$ $p = 0,404$).

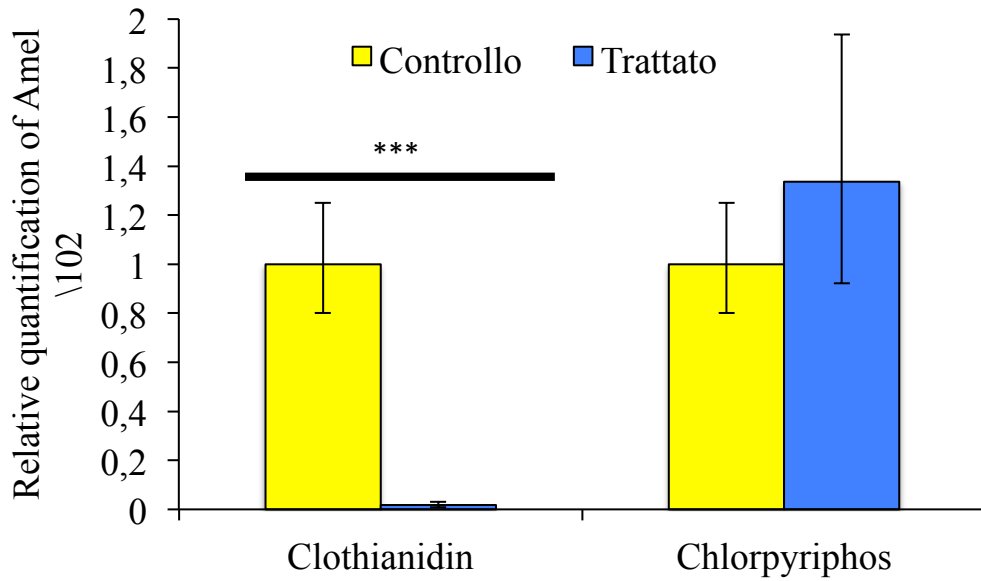


Figura 19. livello trascrizionale di Amel\102 in api trattate con LD₅₀ di Clothianidin o Chlorpyrifos e immunostimolante o con iniezione di *S. cerevisiae*.

Come mostrato in Fig. 20 il livello trascrizionale del gene Amel\LRR in api immunostimolante per 24 ore con un impianto intraemocelico è positivamente correlato all'infezione da DWV (Spearman's Rank-Order Correlation: DWV vs Amel\LRR $\rho = 0,569$ $p = 0,002$).

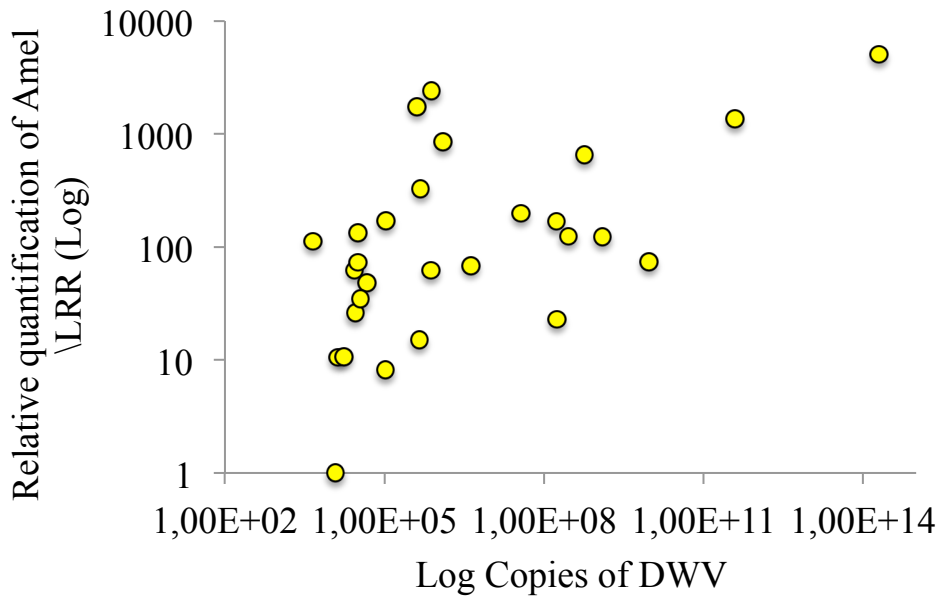


Figura 20. Livello trascrizionale del gene Amel\LRR in api operaie immunostimolante per 24 ore con un impianto intraemotelico e relativo numero di copie di DWV.

Interferenza del gene Amel\102 e del DWV

La quantità e tempi di applicazione dsRNA (1 μ g per ape per 72 ore) non sono stati sufficienti per ottenere un effetto di silenziamento apprezzabile su larve e adulti, sia per DWV che per Amel\102. Successivi esperimenti con dosi e tempi diversi sono richiesti per ottenere il silenziamento.

3. Infezione virale e riproduzione della Varroa

Allo scopo di valutare come l'azione immunosoppressiva del DWV possa, di fatto, facilitare l'attività trofica della Varroa e, conseguentemente, incrementare la fitness del parassita, abbiamo

monitorato l'attività riproduttiva degli acari su api in presenza e assenza di evidenti sintomi di infezione, che consistono nelle caratteristiche ali deformate delle api altamente infette. Abbiamo quindi infestato artificialmente delle larve L5 con una Varroa e le abbiamo tenute in condizioni di laboratorio per 12 giorni; dopo l'impupamento, sia le condizioni delle api neo sfarfallate che il numero di figli generati da ogni Varroa madre durante la metamorfosi delle api è stato registrato (fig.21)



Figura 21 *Varroa* su una larva L5 di ape in capsula artificiale di gelatina.

In totale è stato possibile analizzare 149 api, tenute sotto condizioni standard, 49 delle quali presentavano ali deformi allo sfarfallamento.

In generale, la riproduzione, intesa come il numero di figli per Varroa, è risultata inferiore ma in linea con i dati precedentemente ottenuti in capsule della stessa dimensione mantenute in condizioni di laboratorio (Nazzi e Milani, 1994). Il numero di figli generati dagli acari che infestavano api molto infette, ovvero quelle che hanno portato allo sviluppo di adulti con ali deformi, è risultato significativamente più alto rispetto al numero di figli ottenuti dalle Varroae che si erano sviluppate su api che presentavano ali normali dopo l'impupamento. (fig. 22, Mann-Whitney test, $U = 2879.5$, $p = 0.027$).

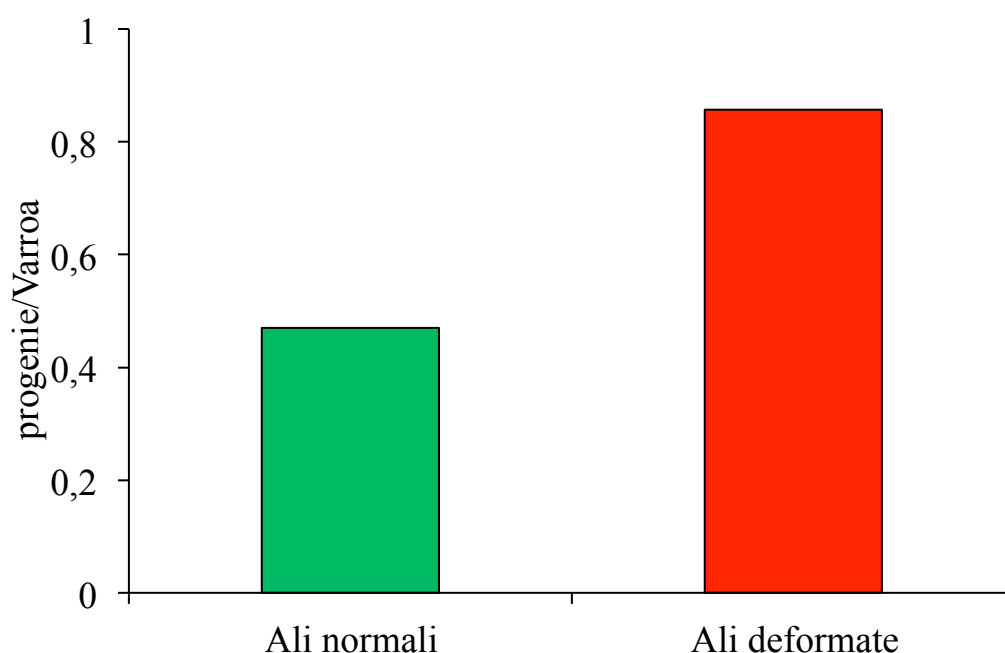


Figura 22 Riproduzione in termini di figli per Varroa in acari allevati su api con ali deformi o normali allo sfarfallamento.

La differenza osservata è per lo più dovuta all'alta percentuale di acari non riproduttivi registrata: questa percentuale raggiunge l'80% nelle

Varroe che infestavano api normali, mentre scende al 60% nelle Varroe che infestavano api affette da DWV (fig. 23; Chi sq=6.14, df=1, P<0.05).

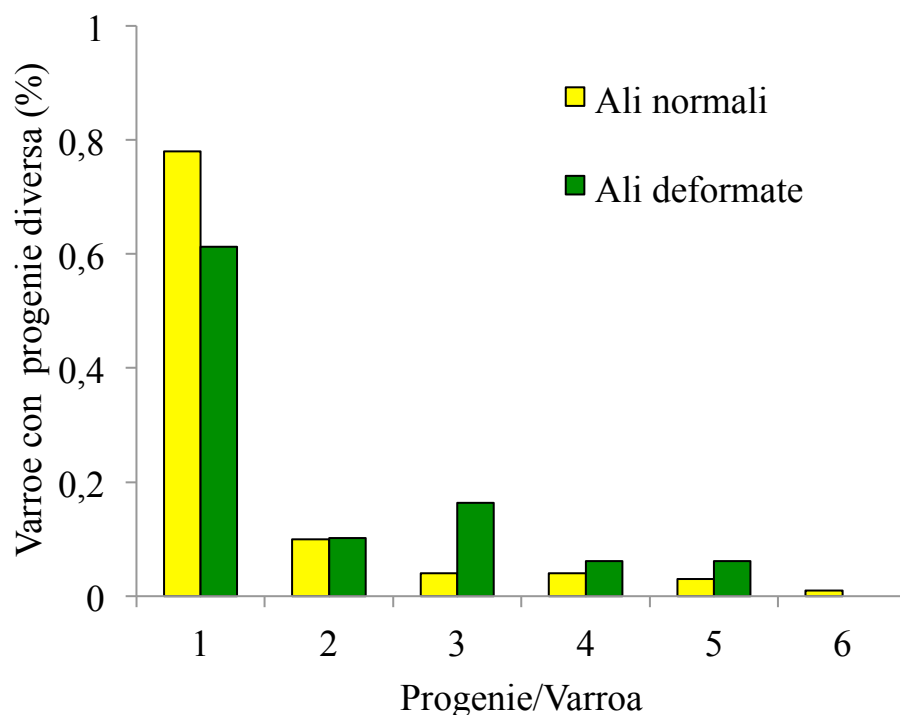


Figura 23. Distribuzione degli acari secondo il numero di figli generati quando allevati su api normali e su api con ali deformi. L'aumento della fertilità in acari che si nutrono su api affette da alti livelli di DWV supporta il ruolo positivo attribuito all'infezione da DWV sulla fitness della Varroa.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati di questo studio rappresentano, a nostro avviso, il primo tentativo di misurare a livello fenotipico l'effetto di immunosoppressione nelle api, piuttosto che utilizzare dei dati trascrizionali per dedurre la riduzione dell'immuno-competenza. Tale studio suggerisce che api con livelli crescenti di DWV hanno una reazione minore alla sollecitazione immunitaria, sia a livello umorale che cellulare. Infatti, l'espressione di un gene legato al sistema immunitario (Amel\102) che è coinvolto, come riportato per il suo omologo nei lepidotteri (Falabella et al., 2012; Di Lelio et al., 2014), le reazioni di incapsulamento e melanizzazione è negativamente associata alla carica virale di DWV ed è sotto il controllo del fattore di trascrizione NF-kB. Questo risultato appare in linea con il fatto che gli parametri immunitari presi in considerazione sono inducibili e controllati da fattori di trascrizione, tra i quali NF-kB certamente gioca un ruolo centrale (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

L'impatto negativo sull'immunità delle api dovuto all'azione combinata di Varroa e DWV è stato proposto sulla base di diversi studi che mostrano, nella maggior parte dei casi, una riduzione a vari livelli della regolazione dei geni immunitari. Il ruolo centrale inizialmente proposto per la Varroa nell'induzione della sindrome immunitaria (Yang and Cox-Foster, 2005) è stato smentito da una grande abbondanza di dati

sperimentali che apparentemente non supportano questa ipotesi (Gregory et al., 2005; Navajas et al., 2008; Zhang et al., 2010; Kuster et al., 2014; Ryabov et al., 2014). Inoltre, in uno studio recente è stata descritta un'azione immuno-soppressiva diretta del DWV contro le barriere antivirali (Nazzi et al., 2012). Questa ipotesi di lavoro è in linea anche con dati più recenti: nelle api provenienti da colonie affette da CCD, che regolarmente mostrano alti livelli di infezione virale, la risposta immunitaria mediata dai meccanismi di RNAi sembra essere inefficiente (Chejanovsky et al., 2014). In effetti, pathways di segnalazione immunitaria alternativi, sotto in controllo di NF- κ B e JAK-STAT, conosciuti per controllare le barriere antivirali negli insetti (Zambon et al., 2005; Souza-Neto et al., 2009; Sabin et al., 2010; Kingsolver et al., 2013; Lamiable and Imler, 2014), sono considerati essere molto probabilmente coinvolti (Chejanovsky et al., 2014). Questo è suggerito anche da una ridotta regolazione trascrizionale dei geni immunitari sotto il controllo del pathway Toll in api parassitate da *Varroa* e affette da alte cariche di DWV (Ryabov et al., 2014), o in quelle sollecitate da dsRNAs aspecifici (Flenniken and Andino, 2013).

Pertanto i nostri dati corroborano ulteriormente l'ipotesi di un effetto diretto del DWV sulle reazioni antivirali inducibili, controllate dal fattore trascrizionale NF- κ B. Quest'ultimo, come già detto, ha diversi ruoli nel sistema immunitario e agisce come fattore chiave della risposta

a diversi agenti di stress, integrando immunità e metabolismo, in modo da ottimizzare le risorse investite per neutralizzare l'azione di fattori di stress (Nazzi and Pennacchio, 2014). Pertanto la strategia di virulenza del DWV, che mira a sovvertire le specifiche barriere antivirali sotto il controllo del pathway Toll, potrebbe avere una molteplice influenza sulle sue funzioni. Questo effetto negativo non esclude che la *Varroa* possa indurre effetti addizionali mediati da componenti salivari, come suggerito dall'effetto di queste secrezioni sugli emociti degli insetti *in vitro* (Richards et al., 2011).

Per valutare se *Amel102* è sotto il controllo trascrizionale di NF- κ B, abbiamo approfittato delle recenti scoperte effettuate sull'effetto negativo indotto dall'insetticida Clothianidin sull'attivazione di questo fattore di trascrizione, il quale regola positivamente il livello trascrizionale di una proteina caratterizzata da un dominio ricco di leucine (*AmelLRR*), che agisce da inibitore dell'attivazione di NF- κ B (Di Prisco et al., 2013). Questo inibitore sembra essere l'equivalente funzionale di alcune proteine NLR dei vertebrati, che vengono sottoesprese a seguito di sollecitazione immunitaria, in modo da attivare la risposta difensiva (Conti et al., 2005). In effetti, queste proteine regolatrici sono probabilmente coinvolte nel complesso scambio tra il sistema nervoso e quello immunitario, per prevenire risposte immunitarie eccessive o pericolose (Tracey, 2012). Studi recenti hanno

dimostrato che alcuni batteri patogeni dell'uomo adottano una strategia di patogenicità basata sulla regolazione positiva di membri di questa famiglia di proteine, che inducono una riduzione della risposta antimicrobica mediata da NF- κ B (Anand et al., 2012; Anand and Kanneganti, 2013; Zaki et al., 2014).

Queste evidenze hanno stimolato il proposito di verificare se l'infezione da DWV possa essere facilitata da meccanismi simili, basati sul controllo negativo dell'attivazione di NF- κ B. L'ipotesi è supportata dalla correlazione positiva tra la carica di DWV e il livello trascrizionale di Amel/LRR.

I dati sperimentali raccolti finora permettono di concludere che il DWV è in grado di disturbare i segnali immunitari mediati da NF- κ B, inibendo l'attivazione di questo fattore di trascrizione. Questo effetto si realizza inducendo l'espressione di una proteina LRR, che agisce da modulatore negativo di NF- κ B e quindi previene l'attivazione di barriere antivirali e di altre risposte immunitarie controllate da questo fattore di trascrizione.

In ogni caso è importante tener conto del fatto che l'interazione DWV/ospite è un processo dinamico, che cambia con la carica virale ed è influenzato da altri fattori di stress che possono avere un impatto sull'immunocompetenza delle api e sulla proliferazione virale (Nazzi et al., 2012; Nazzi and Pennacchio, 2014). Quello che in sintesi proponiamo è che sotto una determinata soglia critica di infezione virale,

i meccanismi di virulenza finora descritti potrebbero indurre una maggiore trascrizione dei membri della famiglia NF- κ B, controllando l'attività del virus; quando questa soglia viene superata livelli molto alti di carica virale associati con l'intensa attività trofica della *Varroa* inducono una marcata sottoregolazione di NF- κ B permettendo quindi al virus di andare incontro a una replicazione incontrollata (Nazzi et al., 2012).

Questo possibile scenario funzionale tiene conto della dinamica duale del virus, con un basso numero di copie di DWV associate a infezioni latenti, che rapidamente crescono quando la soglia critica è superata e l'intensa replicazione virale risultante causa un'infezione conclamata (Nazzi et al., 2012). Il delicato bilancio che controlla i livelli di infezione viene continuamente messo alla prova da diversi fattori di stress, che possono contribuire a promuovere la proliferazione virale attraverso complesse interazioni tra pathway (Nazzi and Pennacchio, 2014).

La *Varroa* ha complesse interazioni trofiche con il suo ospite (Donzé and Guerin, 1994; Rosenkranz et al., 2010), caratterizzate dal prolungato uso della ferita di alimentazione. Pertanto poiché le reazioni immunitarie dell'ospite, la melanizzazione e l'incapsulamento, chiaramente interferiscono con il prelievo e l'utilizzo del cibo, il che potrebbero di logica determinare una riduzione della fitness della *Varroa* stessa. Poiché questi componenti della risposta immunitaria sono prevalentemente

controllati dal fattore di trascrizione NF- κ B, che è negativamente influenzato dall'infezione da DWV, abbiamo ipotizzato che questo patogeno virale potrebbe avere un effetto positivo sulla nutrizione della Varroa e di conseguenza, sulla sua riproduzione. Il protocollo *in vitro* utilizzato, che monitora il successo riproduttivo di Varroa isolate poste su individui con differenti livelli di DWV, indica che alte cariche virali sono associate alla capacità di riproduzione della Varroa. Vale la pena sottolineare che una ragguardevole parte di queste differenze era dovuta a una diversa percentuale di acari che non potevano riprodursi (es. sterili), il cui numero era significativamente più alto in ospiti che sviluppati regolarmente; inoltre una maggiore fecondità (es. numero di figli per acaro) è stata osservata quando gli acari si nutrivano su ospiti che si sono poi sviluppati in adulti con ali deformi. Il livello basale di individui non fertili nella popolazione di Varroa può essere piuttosto alto e potrebbe variare per ragioni non pienamente conosciute, ma apparentemente legate a fattori dovuti all'ospite non ancora ben definiti (Rosenkranz et al., 2010). È immaginabile che la presenza e il livello di infezione di DWV possa essere parte di queste variazioni, come conseguenza dell'immuno-soppressione che induce nell'ospite a diversi livelli. Questo effetto positivo dell'infezione da DWV sulla riproduzione della Varroa potrebbe essere in parte indotto da una migliore efficienza nella nutrizione, ma la possibilità che il profilo immunitario dell'ospite,

in quanto affetto da virus, possa contribuire al miglioramento della possibilità di nutrirsi per la Varroa è una possibilità che non può essere esclusa e certamente necessita di ulteriori ricerche allo scopo di caratterizzare in pieno la strategia di regolazione adottata da questo parassita.

Il concetto di regolazione dell'ospite è ampiamente adottato per classificare un ampio spettro di cambiamenti fisiologici e comportamentali indotti dai parassiti degli artropodi, che sono stati investigati particolarmente nei parassitoidi degli insetti (Pennacchio and Strand, 2006). Questi insetti carnivori sono in grado di colonizzare come ospiti insetti viventi, per sopravvivere, nutrirsi e riprodursi hanno bisogno di superare le barriere immunitarie dell'ospite, sia che essi vivano esternamente come ectoparassitoidi o che colonizzino l'emocele come parassitoidi endogeni. La strategia di attacco adottata dai parassitoidi, in particolare da alcuni Imenotteri, può essere molto complessa e si basa sull'uso di potenti fattori immunosoppressivi, che si sviluppano nelle secrezioni delle femmine adulte iniettate al momento dell'ovideposizione (es. le secrezioni degli ovari) o rilasciate durante lo stadio giovanile (Pennacchio and Strand, 2006). Le secrezioni ovariche possono inoltre contenere virus simbiotici (White et al., 2014), che in alcuni imenotteri parassitoidi dei bruchi sono tutti membri della famiglia Polydnviridae, ampiamente studiata e caratterizzata da un punto di vista

sia funzionale che evoluzionistico (Strand and Burke, 2013; Herniou et al., 2013; White et al., 2014). L'antenato di questi simbionti virali del genere Bracovirus è un patogeno virale dell'ospite del gruppo dei Nudivirus (Bézier et al., 2009). Pertanto alcuni imenotteri parassitoidi sono stati in grado di "catturare" un patogeno dell'ospite, che è poi stato addomesticato e utilizzato come fattore di virulenza. Fondamentalmente il virus e l'imenottero condividono lo stesso ospite e sono coinvolti in una simbiosi mutualistica che, nel caso dei polydnavirus è stata ulteriormente stabilizzata dall'integrazione del genoma virale nei geni del parassitoide (Strand and Burke, 2013; Herniou et al., 2013). Questa intima associazione nel caso dei bracoviruses, si è stabilita approssimativamente 100 milioni di anni fa, tra la linea degli imenotteri microgastridi e l'antenato del virus appartenente ai Nudivirus (Strand, 2010; Serbielle et al., 2012). L'interazione Varroa/DWV potrebbe essere considerata un tipo simile di interazione simbiotica, ma in uno stato evolutivamente precedente, quindi con un minor grado di intima integrazione. E' evidente che il ruolo che la Varroa svolge come vettore del virus è compensato da un miglioramento della fitness, mediata dall'immunosoppressione dell'ospite. Questo tipo di interazione ricorda molto quello che occorre tra gli imenotteri parassitoidi e un patogeno dei loro ospiti: entrambi condividono l'obiettivo di colonizzare e sfruttare al meglio l'ospite comune. Inoltre in entrambi i casi il virus è in grado di

generare un forma di infezione sub-letale favorendo la sua stessa diffusione, ma con un impatto più limitato sulle dinamiche di popolazione dell'ospite (Martin, 2001; Jehle, 2010; Martin et al., 2012). Questo peculiare scenario evolutivo rileva molte associazioni tra insetti parassiti e simbionti virali i quali, diversamente dalla maggior parte dei virus, non agiscono come patogeni gravi (White et al., 2014).

I risultati di questo studio permettono di guardare l'interazione Varroa/DWV da una diversa prospettiva. Infatti, le evidenze sperimentali supportano l'ipotesi di una simbiosi mutualistica finora sconosciuta. Questo nuovo modo di considerare una delle più pericolose associazioni per l'industria apistica tra parassita e patogeno non è solo importante da un punto di vista evolutivistico, ma ha anche significative implicazioni applicative. In effetti, qualunque stress ambientale che vada a interferire con l'immunocompetenza delle api e promuova la replicazione del DWV in individui affetti da infezione latente (Nazzi et al., 2012; Nazzi and Pennacchio, 2014) ha pure un effetto indiretto sulla Varroa, che viene favorita dalla crescente immunosoppressione indotta dal virus. Una più profonda comprensione dei meccanismi molecolari che sottendono a questo processo che accresce la fitness dei due simbionti sarà probabilmente in grado di far sviluppare nuove strategie per il controllo di questi parassiti chiave delle api.

BIBLIOGRAFIA

Agaisse H and Perrimon N (2004). The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunological Review*.198:72-82.

Alaux C, Ducloz F, Crauser D, Le Conte Y (2010). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, 6(4), 562–565. doi:10.1098/rsbl.2009.0986

Anand PK, Malireddi RS, Lukens JR, Vogel P, Bertin J, Lamkanfi M, Kanneganti TD (2012). NLRP6 negatively regulates innate immunity and host defence against bacterial pathogens. *Nature*488(7411): 389-393.

Anand PK, Kanneganti TD (2013). NLRP6 in infection and inflammation. *Microbes and Infection*15(10): 661-668.

Annoscia D, Del Piccolo F, Nazzi F (2012) How does the mite *Varroa destructor* kill the honeybee *Apis mellifera*? Alteration of cuticular hydrocarbons and water loss in infested honeybees. *Journal of Insect Physiology*, 58(12):1548-1555.

Antúnez K, Martín-Hernández R, Prieto L, Meana A, Zunino P, Higes M (2009). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental microbiology*11(9): 2284-2290.

Aufauvre J, Biron D, Vidau C, Fontbonne R, Roudel M, Diogon M, Viguès B, Belzunces L, Delbac F, Blot N (2012) Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Scientific Report* 2: 1-7

Bézier A, Thézé J, Gavory F, Gaillard J, Poulain J, Drezen JM, Herniou EA (2014). The genome of the nucleopolyhedrosis causing virus from *Tipula oleracea* (ToNV) sheds new light into the Nudiviridae family. *Journal of virology* JVI-02884.

Blomquist GJ, Dillwith JW (1985). Cuticular lipids. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Integument, Respiration and Circulation*, Pergamon, Oxford. 3:117-154.

Blomquist GJ (2010). Structure and analysis of insect hydrocarbons. In: *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry and Chemical Ecology*, Cambridge Press.

Boncristiani H, Underwood R, Schwarz R, Evans JD, Pettis J, vanEngelsdorp D (2012). Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*. 58:613-620

Burgett DM (1997). Antibiotic systems in honey, nectar, and pollen. In: Morse RA, editor. *Honey Bee Pest, Predators, and Diseases*. Medina, OH: A.I. Root Co. 455–468.

Châline N, Sandoz JC, Martin SJ, Ratnieks FLW, Jones GR (2005). Learning and discriminating of individual cuticular hydrocarbons by honeybees (*Apis mellifera*). *Chemical Senses* 30: 327-335.

Chejanovsky N, Ophir R, Schwager MS, Slabezki Y, Grossman S, Cox-Foster D (2014). Characterization of viral siRNA populations in honey bee colony collapse disorder. *Virology* 454: 176-183.

Chen YP, Pettis JS, Collins A, Feldlaufer MF (2006). Prevalence and transmission of honey bee viruses. *Applied Environmental Microbiology* 72: 606–611

Chen YP and Siede R (2007). Honey bee viruses. *Advances in Virus Research* 70: 33–80.

Conti L, Pollard SM, Gorba T, Reitano E, Toselli M, Biella G, Sun Y, Sanzone S, Ying QL, Cattaneo E, Smith A (2005). Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS biology* 3(9): 283.

Cox-Foster DL, Stehr JE (1994). Induction and localization of FAD-glucose dehydrogenase (GLD) during encapsulation of abiotic implants in *Manduca sexta* larvae. *Journal of insect physiology* 40(3): 235-249.

Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan P, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, Vanengelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318: 283-287. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1146498>

Cresswell J, Cresswell E, Page CJ, Uygun MB, Holmbergh M, Li Y, Wheeler JG, Laycock I, Pook CJ, Hempel De Ibarra N, Smirnoff N, Tyler CR (2012). Differential sensitivity of honey bees and bumble bees to a dietary insecticide (imidacloprid). *Zoology* 115: 365-371.

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

De Miranda JR and Genersch E (2010). Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: 48-61.

Desai SD, Eu YJ, Whyard S, Currie RW (2012). Reduction in deformed wing virus infection in larval and adult honey bees (*Apis mellifera* L.) by double-stranded RNA ingestion. *Insect Molecular Biology* 21(4):446–455.

Di Lelio I, Varricchio P, Di Prisco G, Marinelli A, Lasco V, Caccia S, Casartelli M, Giordana B, Rao R, Gigliotti S, Pennacchio F (2014). Functional analysis of an immune gene of *Spodoptera littoralis* by RNAi. *Journal of insect physiology* 64: 90-97.

Di Prisco G, Pennacchio F, Caprio E, Boncristiani HF Jr, Evans JD, Chen Y. (2011a). *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of General Virology* 92(1):151-5.

Di Prisco G, Zhang X, Pennacchio F, Caprio E, Li J, Evans JD, Degrandi-Hoffman G, Hamilton M, Chen YP (2011b). Dynamics of persistent and acute deformed wing virus infections in honey bees, *Apis mellifera*. *Viruses* 3(12):2425-41.

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

Donzé G and Guerin PM (1994). Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 34(5): 305-319.

Ellis JD, Graham JR, Mortensen A (2013). Standard methods for wax moth research. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK, Volume II: standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research*. *Journal of Apicultural Research* 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.10>

Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, Kanost M, Thompson GJ, Zou Z and Hultmark D (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* 15(5): 645–656

Evans JD, Chen YP, Di Prisco G, Pettis JS, Williams V (2009). Bee cups: Single-use cages for honey bee experiments. *Journal of Apicultural Research* 48(4):300–302.

Falabella P, Riviello L, Pascale M, Di Lelio I, Tettamanti G, Grimaldi A, Iannone C, Monti M, Pucci P, Tamburro AM, deEguileor M, Gigliotti S, Pennacchio

F (2012). Functional amyloids in insect immune response. *Insect biochemistry and molecular biology*, 42(3), 203-211.

Falcón T, Ferreira-Caliman MJ, Nunes FMF, Tanaka ÉD, do Nascimento FS, Gentile Bitondi MM (2014). Exoskeleton formation in *Apis mellifera*: Cuticular hydrocarbons profiles and expression of desaturase and elongase genes during pupal and adult development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 50: 68-81. ISSN 0965-1748, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.04.006>.

Fan YL, Zurek L, Dykstra MJ, Schal C (2003). Hydrocarbon synthesis by enzymatically dissociated oenocytes of the abdominal integument of the German cockroach, *Blattella germanica*. *Naturwissenschaften* 91: 121-126.

Fan YL, Richard FJ, Rouf N, Grozinger CM (2010). Effects of queen mandibular pheromone on nestmate recognition in worker honeybees, *Apis mellifera*. *Animal Behaviour* 79(3):649–656.

Finney DJ (1971). *Probit Analysis* (Cambridge Univ Press, Cambridge, UK), 3rd Ed.

Flenniken ML and Andino R (2013). Non-specific dsRNA-mediated antiviral response in the honey bee. *PloS one* 8(10), e77263.

Floris I e Satta A (2013). Il collasso delle colonie e l’apicoltura oggi. *Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia Anno LXI*: 69-72.

Fries I (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 103 (Sppl.):73–79.

Gibbs AG (2002). Lipid melting and cuticular permeability: new insights into an old problem. *Journal of Insect Physiology* 48: 391-400.

Gill J, Ramos-Rodriguez O, Rainel NE, (2012) Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature* 491: 105-108.

Godfray HCJ, Blacquièrre T, Field LM, Hails RS, Petrokofsky G, Potts SG, Raine NE, Vanbergen AJ, McLean AR (2014) A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proceedings of the Royal Society of London B* 281, 20140558

Gregory PG, Evans JD, Rinderer T, De Guzman L (2005). Conditional immune-gene suppression of honeybees parasitized by *Varroa* mites. *Journal of Insect Science* 5(1): 7.

Haviola S, Kapari L, Ossipov V, Rantala MJ, Ruuhola T, Haukioja E (2007). Foliar phenolics are differently associated with *Epirrita autumnata* growth and immunocompetence. *Journal of Chemical Ecology* 33, 1013–1023.

Hedtka K, Jensen PM, Jensen AB, Genersch E (2011). Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood. *Journal Invertebrate Pathology* 108: 167–173.

Henry M, Béguin M, Requier F, Rollin O, Odoux JF, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S, Decourtye A (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336: 348-350.

Hepburn HR (1985). Structure of the integument. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Integument, Respiration and Circulation*, Pergamon, Oxford. 3: 1-58.

Herniou EA, Huguet E, Thézé J, Bézier A, Periquet G, Drezen JM (2013). When parasitic wasps hijacked viruses: genomic and functional evolution of polydnviruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368(1626): 20130051.

Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG, González-Porto AV, Barrios L, Del Nozal MJ, Bernal JL, Jiménez JJ, Palencia PG, Meana A (2008). How

natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology* 10: 2659-2669.

Hoffmann JA (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426: 33-38.

Howard RW, Blomquist GJ (2005). Ecological, behavioral, and chemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology* 50: 371-393.

Hunter W, Ellis J, vanEngelsdorp D, Hayes J, Westervelt D, et al. (2010). Large-Scale Field Application of RNAi Technology Reducing Israeli Acute Paralysis Virus Disease in Honey Bees (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae). *PLoS Pathog* 6(12):e1001160. doi:10.1371/journal.ppat.1001160

Jehle JA (2010). Nudiviruses: their biology and genetics. *Insect virology*. Caister Academic, Norfolk 153-170.

Kapari L, Haukioja E, Rantala MJ, Ruuhola T (2006). Defoliating insect immune defense interacts with induced plant defense during a population outbreak. *Ecology* 87: 291–296.

Kingsolver MB, Huang Z, Hardy RW (2013). Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors, and connections. *Journal of molecular biology* 425(24): 4921-4936.

Klein AM, Vaissiere BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C and Tscharntke T (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society. B: Biological Sciences*, 274(1608): 303-313.

König C, Schmid-Hempel P (1995). Foraging activity and immunocompetence in workers of the bumble bee, *Bombus terrestris* L. *Proceedings of the Royal Society of London B* 260: 225–227.

Kuster RD, Boncristiani HF, Rueppell O (2014). Immunogene and viral transcript dynamics during parasitic *Varroa destructor* mite infection of developing honey bee (*Apis mellifera*) pupae. *The Journal of experimental biology* 217(10): 1710-1718.

Lafferty KD (2010). Interacting parasites. *Science* 330: 187-188.

Lamiable O, Imler JL (2014). Induced antiviral innate immunity in *Drosophila*. *Current opinion in microbiology* 20: 62-68.

Lavine MD, Strand MR (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect biochemistry and molecular biology* 32(10): 1295-1309.

Laughton AM, Boots M, Siva-Jothy MT (2011). The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. Following an immune challenge. *Journal of Insect Physiology* 57: 1023–1032.

Lee KP, Cory JS, Wilson K, Raubenheimer D, Simpson SJ (2006). Flexible diet choice offsets protein costs of pathogen resistance in a caterpillar. *Proceedings of the Royal Society of London B* 273: 823–829.

Lemaitre B, Reichhart JM, Hoffmann JA (1997). *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proceedings of National Academy of Science* 94:14614-14619.

Lemaitre B and Hoffmann JA (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology* 25: 697-743.

Liu X, Zhang Y, Yan X, Han R (2010). Prevention of Chinese Sacbrood Virus Infection in *Apis cerana* using RNA Interference. *Current Microbiology* 61:422–428

Lu C, Warchol KM, Callahan RA (2012). In situ replication of honey bee colony collapse disorder. *Bulletin of Insectology* 65: 99-106.

Maori E, Paldi N, Shafir S, Kalev H, Tsur E, Glick E, Sela I (2009). IAPV, a bee-affecting virus associated with Colony Collapse Disorder can be silenced by dsRNA ingestion. *Insect Molecular Biology* 18(1):55–60.

Marringa WJ, Krueger MJ, Burritt NL, Burritt JB (2014). Honey Bee Hemocyte Profiling by Flow Cytometry. *PLoS ONE* 9(10): e108486. doi:10.1371/journal.pone.0108486

Martin SJ (2001) The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honey bee colonies: a modelling approach. *Journal of Applied Ecology* 38: 1082-1093.

Martin SJ, Highfield AC, Brettell L, Villalobos EM, Budge GE, Powell M, Nikaido S, Schroeder DC (2012). Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science*, 336(6086), 1304-1306.

Metchnikoff E (1905) *Immunity in infective diseases*, Binnie, F. G. (transl.), Cambridge University Press, London.

Mongiardino KN, Hasson E, Soto IM (2012). Differences in wing melanization and pigmentation pattern in *Drosophila buzzatii* (Diptera: Drosophilidae) under chemical stress. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 71(1-2): 87-97. ISSN 0373-5680

Moritz RF, De Miranda J, Fries I, Le Conte Y, Neumann P and Paxton RJ (2010). Research strategies to improve honeybee health in Europe. *Apidologie* 41(3): 227-242.

Nappi AJ and Vass E (1993). Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell & Melanoma Research* 6:117-126.

Nappi A, Poirie M, Carton Y (2009). The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps. *Advanced Parasitology* 70: 99-121.

Navajas M, Migeon A, Alaux C, Martin-Magniette ML, Robinson GE, Evans JD, Cros-Arteil S, Crauser D, Le Conte Y (2008). Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection. *Bmc Genomics* 9(1): 301.

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

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

Nazzi F, Annoscia D, Caprio E, Di Prisco G, Pennacchio F (2014). Honeybee immunity and colony losses. *Entomologia* 2:203

Neumann P and Carreck NL (2010). Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*, (49).

Neumann P, Pirk CWW, Schäfer MO, Evans JD, Pettis JS, Tanner G, Williams GR, Ellis JD (2013). Standard methods for small hive beetle research. In V Dietemann; J D Ellis, P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research*. *Journal of Apicultural Research* 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.19>

Oldroyd BP (2007). What's killing American honey bees? *PLoS biology* 5(6), e168.

Pennacchio F and Strand MR (2006). Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annual Review of Entomology* 51: 233-258.

Pettis JS, Vanengelsdorp D, Johnson J, Dively G (2012). Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* 99: 153-158.

Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O and Kunin WE (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in ecology and evolution* 25(6): 345-353.

Qiu P, Pan PC, Govind S (1998). A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. *Development* 125: 1909-1920.

Rantala MJ, Koskimaki J, Taskinen J, Tynkkynen K, Suhonen J (2000). Immunocompetence, developmental stability and wingspot size in the damselfly *Calopteryx splendens* L. *Proceedings of the Royal Society of London B* 267: 2453–2457.

Rantala MJ and Roff DA (2005). An analysis of trade-offs in immune function, body size and development time in the Mediterranean Field Cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Functional Ecology* 19: 323–330.

Ratnieks FL and Carreck NL (2010). Clarity on honey bee collapse?. *Science* 327(5962): 152-153.

Richard FJ, Aubert A, Grozinger CM (2008). Modulation of social interactions by immune stimulation in honey bee, *Apis mellifera*, workers. *BMC Biology* 6:50.doi:10.1186/1741-7007-6-50

Richards EH, Jones B, Bowman A (2011). Salivary secretions from the honeybee mite, *Varroa destructor*: effects on insect haemocytes and preliminary biochemical characterization. *Parasitology* 138(05): 602-608.

Richard FJ, Holt HL, Grozinger CM (2012). Effects of immunostimulation on social behavior, chemical communication and genome-wide gene expression in honey bee workers (*Apis mellifera*). BMC genomics 13(1): 558.

Ronald PC and Beutler B (2010). Plant and Animal Sensors of Conserved Microbial Signatures. Science 330 (6007): 1061-1064. DOI:10.1126/science.1189468

Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. Journal of invertebrate pathology 103:96-119.

Rothenbuhler WC (1964). Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. IV. Responses of F1 and backcross generations to disease-killed brood. American Zoologist 4: 111-123.

Russo J, Dupas S, Frey F, Carton Y, Brehelin M (1996). Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina boulardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. Parasitology 112(1):, 135-142.

Ruvolo M and Landim C (1993). Morphologic and morphometric aspects of oenocytes of *Apis mellifera* queens and workers in different phases of life. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 88: 387-395.

Ryabov EV, Wood GR, Fannon JM, Moore JD, Bull JC, Chandler D, Mead A, Burroughs N, Evans DJ (2014). A virulent strain of deformed wing virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after *Varroa destructor*-mediated, or *in vitro*, transmission. PLoS pathogens 10(6) e1004230.

Sabin LR, Hanna SL, Cherry S (2010). Innate antiviral immunity in *Drosophila*. Current Opinion in Immunology 22:4–9

Salvy M, Martin C, Bagnères AG, Provost E, Roux M, Le Conte Y, Clement JL (2001). Modifications of the cuticular hydrocarbon profile of *Apis mellifera*

worker bees in the presence of the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in brood cells. *Parasitology* 122(2): 145-159.

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

Schmid-Hempel P (1995). *Parasites in Social Insects*. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Schmid-Hempel R and Schmid-Hempel P (1998). Colony performance and immunocompetence of a social insect, *Bombus terrestris*, in poor and variable environments. *Functional Ecology* 12: 22–30.

Schmid-Hempel P and Ebert D (2003). On the evolutionary ecology of specific immune defence *TRENDS in Ecology and Evolution* 18(1)

Serbielle C, Dupas S, Perdereau E, Héricourt F, Dupuy C, Huguet E, Drezen JM (2012). Evolutionary mechanisms driving the evolution of a large polydnavirus gene family coding for protein tyrosine phosphatases. *BMC evolutionary biology* 12(1): 253.

Simone M, Evans JD, Spivak M (2009). Resin collection and social immunity in honey bees. *Evolution* 63:3016–3022. doi:10.1111/j.1558-5646.2009.00772.x

Siva-Jothy MT, Moret Y, Rolff J (2005). Insect Immunity: An Evolutionary Ecology Perspective, In: S.J. Simpson, Editor(s), *Advances in Insect Physiology*, Academic Press 32: 1-48.

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

Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G (2009). An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(42): 17841-17846.

Starks PT, Blackie CA, Seeley TD (2000). Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften* 87(5):229–231.

Stokstad E (2007). The Case of the Empty Hives. *Science* 316 (5827): 970-972. [DOI:10.1126/science.316.5827.970]

Strand MR (2010). Polydnviruses. In *Insect Virology*: 171–197. Edited by Asgari S & Johnson KN. Norwich, UK: Caister Academic Press.

Strand MR and Burke GR (2013). Polydnvirus-wasp associations: evolution, genome organization, and function. *Current opinion in virology*3(5): 587-594.

Tracey KJ (2012). Immune cells exploit a neural circuit to enter the CNS. *Cell* 148(3): 392-394.

Underwood R and vanEngelsdorp D (2007). Colony collapse disorder: have we seen this before. *Bee Culture*, 35: 13-18.

Vainio L, Hakkarainen H, Rantala MJ, Sorvari J (2004). Individual variation in immune function in the ant *Formica exsecta*: effects of the nest, body size and sex. *Evolutionary Ecology* 18: 75–84.

vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood R, Tarpay DR, Pettis JS (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS ONE* 4(8):e6481. doi:10.1371/journal.pone.0006481

vanEngelsdorp D, Caron D, Hayes J, Underwood R, Henson M, Rennich K, Spleen A, Andree M, Snyder R, Lee K, Roccasecca K, Wilson M, Wilkes J, Lengerich E, Pettis J. (2012). A national survey of managed honey bee 2010-11 winter colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership.

van der Zee R, Pisa L, Andonov S, Brodschneider R, Charriere J D, Chlebo R, Coffey M F, Crailsheim K, Dahle B, Gajda A, Gray A, Drazic M, Higes M, Kauko L, Kence A, Kence M, Kezic N, Kiprijanovska H, Kralj J, Kristiansen P,

Martin-Hernandez R, Mutinelli F, Nguyen B K, Otten C, Özkirim A, Pernal S F, Peterson M, Ramsay G, Santrac V, Soroker V, Toploska G, Uzunov A, Vejsnæs F, Wei S, Wilkins S (2012) Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008–2009 and 2009–2010. *Journal of apicultural research* 51(1): 100-114. <http://dx.doi.org/10.3896/ibra.1.51.1.12>

van der Zee R, Gray A, Holzmann C, Pisa L, Brodschneider R, Chlebo R, Coffey MF, Kence A, Kristiansen P, Mutinelli F, Nguyen BK, Nouredine A, Peterson M, Soroker V, Topolska G, Vejsnæs F and Wilkins S (2013). Standard survey methods for estimating colony losses and explanatory risk factors in *Apis mellifera*. In V Dietemann; J D Ellis, P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research*. *Journal of Apicultural Research* 52(4): 1- 32 DOI 10.3896/IBRA.1.52.4.18

Yang X and Cox-Foster DL (2005). Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(21): 7470-7475.

Wang Z, Wilhelmsson C, Hyrsi P, Loof TG, Dobes P, Klupp M, Loseva O, Morgelin M, Ikle J, Cripps RM (2010). Pathogen entrapment by transglutaminase--a conserved early innate immune mechanism. *PLoS Pathog* 6, e1000763.

White BP, Pilgrim EM, Boykin LM, Stein ED, Mazor RD (2014). Comparison of four species-delimitation methods applied to a DNA barcode data set of insect larvae for use in routine bioassessment. *Freshwater Science* 33(1): 338-348.

Whitehorn PR, o'Connor S, Wackers FL, Goulsonet D (2012). Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. - *Science* 336: 351-352

Wigglesworth VB (1970). Structural lipids in the insect cuticle and the function of the oenocytes. *Tissue and Cell* 2: 155-179.

Wilson K, Thomas MB, Blanford S, Doggett M, Simpson SJ, Moore SL (2002). Coping with crowds: density-dependent disease resistance in desert locusts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 5471–5475.

Wilson-Rich N, Dres ST, Starks PT (2008). The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* 54 (2008) 1392–1399.

Zaki MH, Man SM, Vogel P, Lamkanfi M, Kanneganti TD (2014). Salmonella exploits NLRP12-dependent innate immune signaling to suppress host defenses during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(1): 385-390.

Zambon RA, Nandakumar M, Vakharia VN, Wu LP (2005). The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(20): 7257-7262.

Zhang Y, Liu X, Zhang W, Han R (2010). Differential gene expression of the honey bees *Apis mellifera* and *A. cerana* induced by *Varroa destructor* infection. *Journal of insect physiology* 56(9): 1207-1218.