



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

25 Luglio 2022

# Le attività di ricerca e i risultati del progetto **BEE-RER-3**



*Luca Fontanesi*  
Dipartimento di Scienze e  
Tecnologie Agro-alimentari  
Università di Bologna

[luca.fontanesi@unibo.it](mailto:luca.fontanesi@unibo.it)

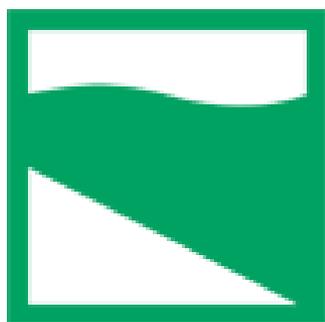


Unione Europea



mipaaf

ministero delle politiche  
agricole alimentari e forestali



Progetto realizzato con il contributo del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, Regolamento UE 1308/2013, Programma regionale triennale 2020-2022, Regione Emilia-Romagna, Misura F (DELIBERAZIONE DELL'ASSEMBLEA LEGISLATIVA DELLA REGIONE EMILIA-ROMAGNA 27 LUGLIO 2019, N. 216 (BEE-RER), DELIBERAZIONE DELLA GIUNTA REGIONALE 28 LUGLIO 2020, N. 939 (BEE-RER-2) e DELIBERAZIONE DELLA GIUNTA REGIONALE 22 LUGLIO 2021, N. 1181 (BEE-RER-3).



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

<https://site.unibo.it/bee-rer/it/>



PROGETTO DI RICERCA BEE-RER

HOME

IL CONTESTO

IL PROGETTO

LINEE GUIDA PER IL CAMPIONAMENTO

LE PERSONE

GLI EVENTI



<https://www.facebook.com/progettoBEERER/>

@progettoBEERER



<https://www.linkedin.com/company/bee-rer>



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



## Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-alimentari (DISTAL)

Mohamad Ballan



Matteo Bolner



Samuele Bovo



Anisa Ribani



Giuseppina Schiavo



Valeria Taurisano



Valerio Joe Utzeri



Luca Fontanesi



## Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET)

Gloria Isani



Roberta Galuppi



Giulia Andreani

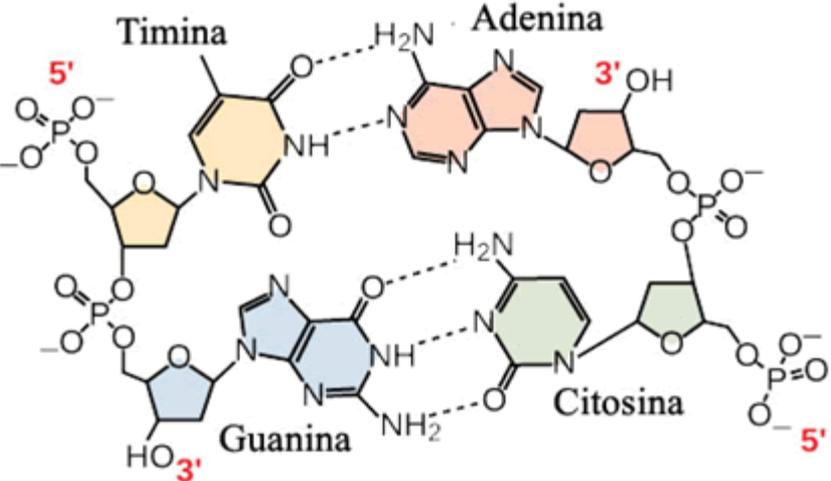
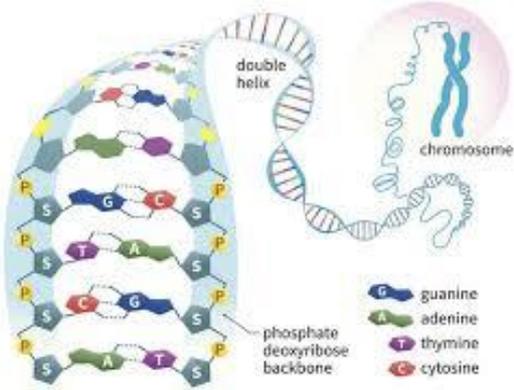


# Titolo del progetto

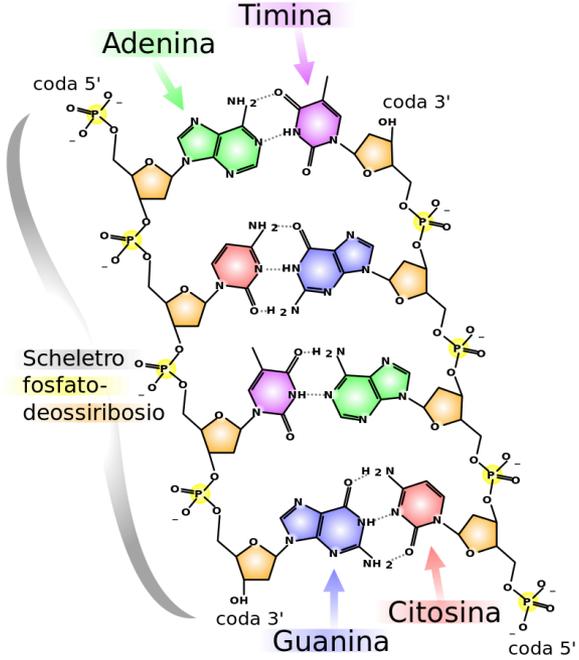
“Le analisi del DNA delle api e del DNA presente nel miele e altri approcci innovativi per la caratterizzazione e la valorizzazione delle produzioni apistiche e il monitoraggio degli aggressori dell’alveare in Emilia-Romagna (**BEE-RER-3**)”



# Che cos'è il DNA



A T C G



# Che cos'è il DNA

ATTTATATAGTTTAAAAAACATTATATTTTCAATATAAAAAATAATTAAATTTAATTTATAAATATAAT  
TAAGTCAAATTTAATTTAAATAACAAATAAATAACCTAAAAATTATTTATTAATAAAGAAATATCAATAA  
ATAAAGCTTCTAACTTTAACTCTAGATTCGTAAATAATCTATATTTCTTATTATACAAATTTAAATAAATA  
TTAATTTTAAAATAAAATTATATAATAAGCTAAATAAAGCTAACAGGTTTCATACCCTGTCGATAAATTAA  
TAATTTTATATAAATTATTAAATTTATTTTAGTGTTTAAGCACATAAAATTTTGAATTTTATAGTATTA  
ATTAATTAATAAATTGGATATTAGTTATAAATAAATAACATTTAAATTGCATTTAAAAATTAATATTTTA  
TATATTATATCTAAAAAGTAATATGTCTGATAAAAGAAATATTTTGATAAAATATTAATGTATAATTTTT  
ATATATACTATTAATTATCTTCTTCATAAATTTTAAATACCACTGATTTATCTATCTTTTAAATTACTATC  
TTTGTATTAATAATAAATCCAATAATATTTTTATTCAATGAATATTAATAGAATTTGGTACAATCATTAA  
GAATTAGACTAATTAATATTAATCCACAAATAAAACCCCGAGATTAATTTATTATTTCAGTATCAGTAAT  
TTCAAGAATTTTTTTATTCTTTATAATTATTGTATACTTATCATCTATTAGATTTACTAAAACAGATACT  
TTTAATTTTATAGTTCAAATAATATTTTTTTTTAAAATTGGAACTTTCCCTTTTCATTTTTGAACAATTT  
ATTCTTATGAAATAATAAATTGAAAGCAAATTTTTTTAATATCAACATTAATCAAATTTATTCCAATTTA  
TATAATAGTTTCAATAACTAAAATTAATTCATGAACATTATATTTTTTTAATTACAAATAGATTATATATT  
TCATTTTATGCTAATAAATTTTACACTCTAAAAAATTACTAGCATGTTCAACAATTTTTAATTCATTCT  
ATTTTATTTTTTATTTTAGAATTAATAAGGAATATATTTATTGCTATAATTATTTTATATTCATTTAATTA  
TTTTTTATTAATTAGATTCTTAAATAAATTTAATATTCAAATTTTAAATTTTATATTTTATAATAAATAT  
CAAATATACACATTCTTAACATTAATATTTAATTATTCAATATATCCAATTTTTCTTTTCATTTGTAATTA  
AATGAAATCTAATTTTTTATAATAGTAAGAGTTAAAGCTTATAATTGAATTTTATTTCTTTTAATAATTTT  
TAGAATATTAATAATTTGAAATTATATTATTATTTTAAAACGTGTATTTTTAAAATAAATTTTTATAAA  
AATAATTTTATTGATGATAAAGATAATAAATATATATATCATAGATATTTTGCACCTTATACTTCTTTTCAT  
TTAATGTTTCATTTTTTTATTACATTAAATTTTTTATAAATTATTATAATTATGATGTTAATAATTAATCT  
TCAAATTTGCAATCTGATGTTTTATATTTTAAACTATAATAATTTATTTACCATGATATAGTATAGTATT  
AGAAAAATTTAATTTTCAATTTTAAATTTACAATTTAACTCTTATTTAGATTTAATACTAAGTAAGAT



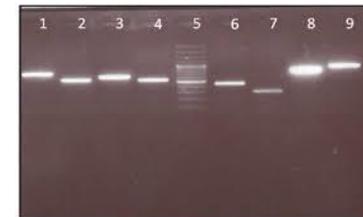
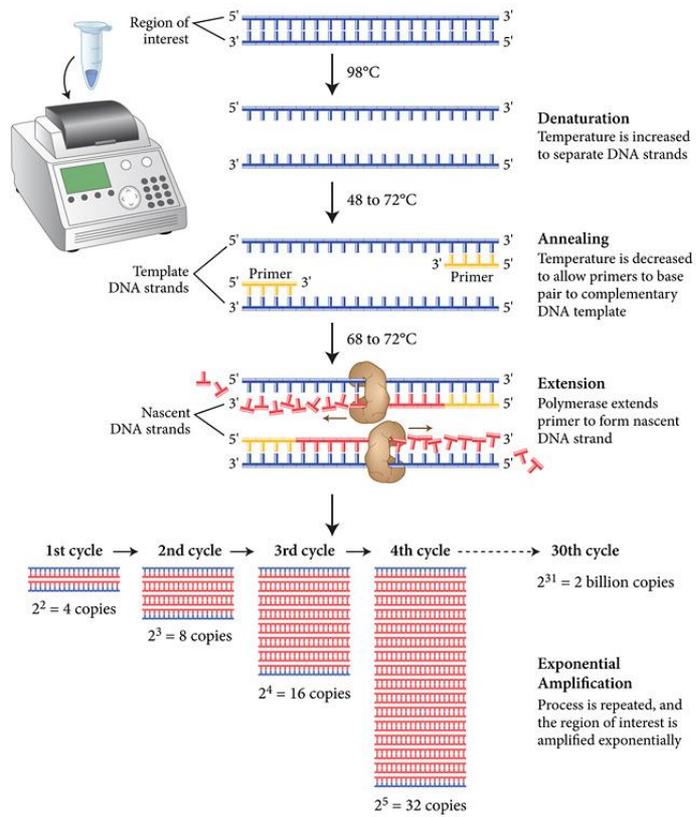
# Che cos'è il DNA

ATTTATATAGTTTAAAAAAACATTATATTTTCAATATAAAAAATAATTAAATTTAATTTATAAATATAAT  
TAAGTCAAATTTAATTTAAATAACAAATAAATAACCTAAAAATTATTTATTAATAAAGAAATATCAATAA  
ATAAAGCTTCTAACTTTAACTCTAGATTCGTAAATAATCTATATTTCTTATTATAGCAATTTAAATAAATA  
TTAATTTTAAAATAAAATTATATAATAAGCTAAATAAAGCTAACAGGTTTCATACCCTGTCGATAAATTAA  
TAATTTTATATAAATTATTAAATTTATTTTAGTGTTTAAGCACATAAAATTTTGAATTTTATAGTATTA  
ATTAATTAATAAATTGGATATTAGTTATAAATAATAACATTTAAATTGCATTTAAAAATTAATATTTTA  
TATATTATATCTAAAAAGTAATATGTCTGATAAAAGAAATATTTTGATAAAATATTAATGTATAATTTTT  
ATATATACTATTAATTTATCTTCTTCATAAATTTTAAATACCACTGATTTATCTATCTTTTAAATTACTATC  
TTTGTATTAATAATAAATCCAATAATATTTTTATTCAATGAATATTAATAGAATTTGGTACAATCATTAA  
GAATTAGACTAATTAATATTAATCCACAAATAAAACCCCGAGATTAATTTATTATTTCAGTATCAGTAAT  
TTCAAGAATTTTTTTTATTCTTTATAATTATTGTATACTTATCATCTATTAGATTTACTAAAACAGATACT  
TTTAATTTTATAGTTCAAATAATATTTTTTTTTAAAATTGGAACTTTCCCTTTTCATTTTTTGAACAATTT  
ATTCTTATGAAATAATAAATTGAAAGCAAATTTTTTTAATATCAACATTAATCAAATTTATTCCAATTTA  
TATAATAGTTTCAATAACTAAAATTAATTCATGAACATTATATTTTTTTAATTACAAATAGATTATATATT  
TCATTTTATGCTAATAAATTTTACACTCTAAAAAAATTACTAGCATGTTCAACAATTTTTAATTCATTCT  
ATTTTATTTTTTATTTTAGAATTAATAACAATATATTTATTGCTATAAATTATTTTATATTCATTTAATTA  
TTTTTTATTAATTAGATTCTTAAATAAATTTAATATTCAAATTTTAAATTTTATATTTTATA----ATAT  
CAAATATACACATTCTTAACATTAATATTTAATTATTCAATATATCCAATTTTTCTTTTCATTTGTAATTA  
AATGAAATCTAATTTTTTATAATAGTAAGAGTTAAAGCTTATAATTGAATTTTATTTCTTTTAATAATTTT  
TAGAATATTAATAATTTGAAATTATATTATTTTAAAACGTGTATTTTTAAAATAAATTTTTATAAAA  
AATAATTTTATTGATGATAAAGATAATAAATATATATATCATAGATATTTTGCACCTTATACTTCTTTTCAT  
TTAATGTTTCATTTTTTTATTACATTAAATTTTTTATAAATTATTATAATTATGATGATAATAATTAATCT  
TCAAATTTGCAATCTGATGTTTTATATTTTAAACTATAATAATTTATTTACCATGATATAGTATAGTATT  
AGAAAAATTTAATTTTCAATTTTAAATTTACAATTTAACTCTTATTTAGATTTAATACTAAGTAAGAT



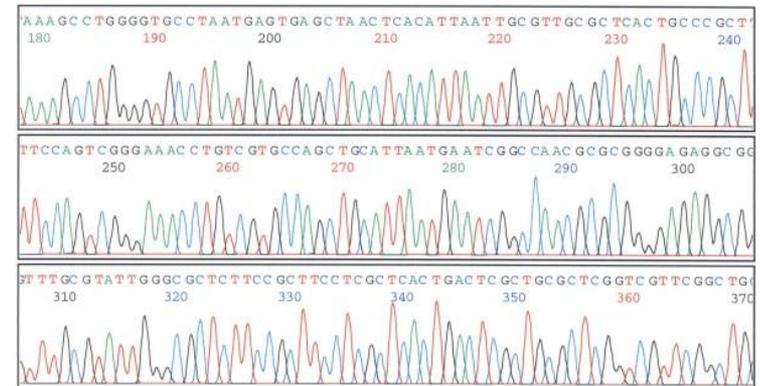
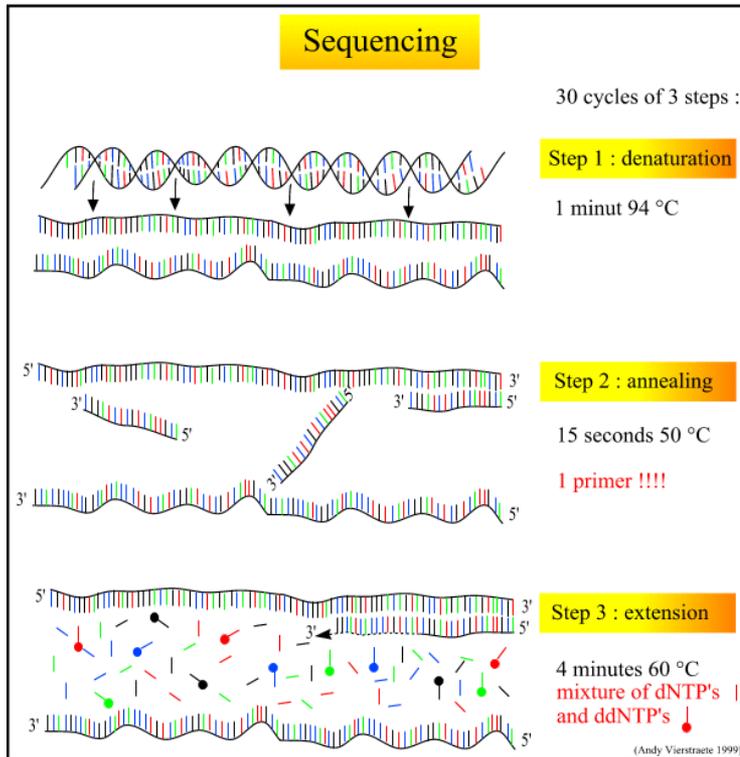
# Come si analizza il DNA

## Polymerase Chain Reaction (PCR)



# Come si analizza il DNA

## Sequenziamento – Metodo Sanger



# Come si analizza il DNA

## Sequenziamento – Next Generation Sequencing

### ARTICLE

doi:10.1038/nature12042

#### An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing

Jonathan M. Rothberg<sup>1</sup>, Wolfgang Hain<sup>1</sup>, Todd M. Anzick<sup>1</sup>, Jonathan Schukit<sup>1</sup>, William Milosavljević<sup>1</sup>, Mel D'Avore<sup>1</sup>, John H. Leamon<sup>1</sup>, Kim Johnson<sup>1</sup>, Mark I. Mitrovic<sup>1</sup>, Matthew Kitzman<sup>1</sup>, Jeremy Haver<sup>1</sup>, Jan F. Drenth<sup>1</sup>, David Kistner<sup>1</sup>, James W. Meyer<sup>1</sup>, John P. Davidson<sup>1</sup>, Anyika Humming<sup>1</sup>, John E. Nobile<sup>1</sup>, Bernard P. Du<sup>1</sup>, David Lippa<sup>1</sup>, Travis A. Clark<sup>1</sup>, Martin Huber<sup>1</sup>, Jeffrey J. Bruchez<sup>1</sup>, Juan B. Serrano<sup>1</sup>, Steven E. Caskey<sup>1</sup>, Michael Dowse<sup>1</sup>, Yuzuo Shi<sup>1</sup>, Yuh-Jyh Hwu<sup>1</sup>, Maria Sodeiro<sup>1</sup>, Xia Miao<sup>1</sup>, Brian Koop<sup>1</sup>, Jeffrey Sabnis<sup>1</sup>, Erika Fokrenova<sup>1</sup>, Michelle Schum<sup>1</sup>, Mohammad Aljagary<sup>1</sup>, Eileen D'Amico<sup>1</sup>, Devin Drenth<sup>1</sup>, Rachel L. Lumbard<sup>1</sup>, Tanya Shteynberg<sup>1</sup>, Josephine A. Haines<sup>1</sup>, Eugene Sussman<sup>1</sup>, Kersti M. Moerman<sup>1</sup>, Alan Williams<sup>1</sup>, G. Thomas Koch<sup>1</sup> & James Bonville<sup>1</sup>

The seminal importance of DNA sequencing to the life sciences, biotechnology and medicine has driven the search for more scalable and lower-cost solutions. Here we describe a DNA sequencing technology in which scalable, low-cost semiconductor manufacturing techniques are used to make an integrated circuit able to directly perform non-optical DNA sequencing of genomes. Sequence data are obtained by directly sensing the ions produced by template-directed DNA polymerase extension using all-natural nucleotides on fully monolithically parallel semiconductor sensing blocks on one chip. The ion chip contains ion-sensitive, field-effect transistor-based sensors in perfect register with 1.2 million wells, which provide confinement and allow parallel, simultaneous detection of independent sequencing reactions. Use of the most widely used technology for constructing integrated circuits, the complementary metal-oxide semiconductor (CMOS) process, allows for low-cost, large-scale production and scaling of the device to higher densities and larger array sizes. We show the performance of the system by sequencing three human genomes, its robustness and scalability by producing ion chips with up to 10 times as many sensors and sequencing a human genome.

# ion torrent

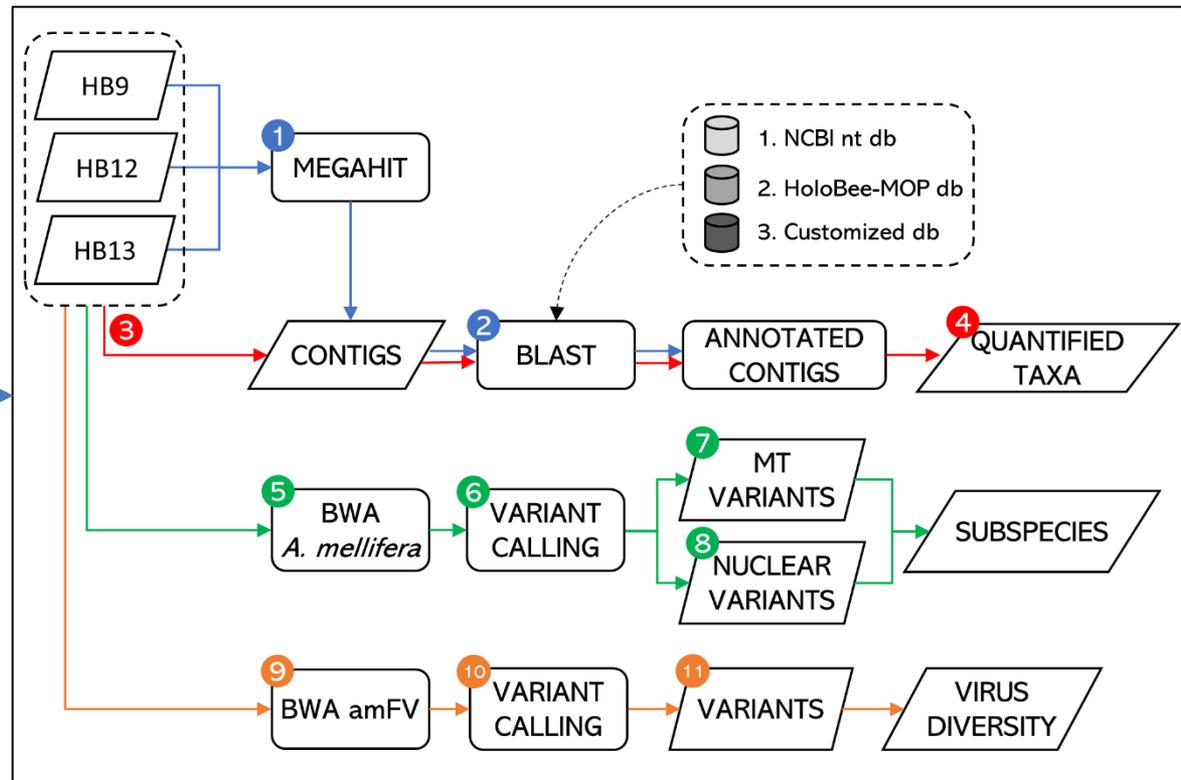
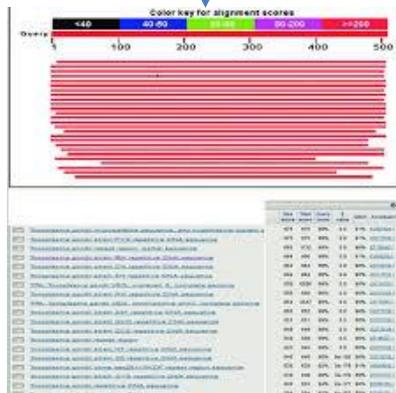


ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# Come si analizza il DNA

## Analisi bioinformatica dei dati

```
ATCTCTGGGTCAGCATCGATGAAGACGCA
TCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAAACAGGT
GACGTGTCARAACITTTAACACGATCTCTT
TGTTCCTTGGCGGCGCCGCAAGGTTGCCCG
GGCCTGCCGTGGCAGATCCCAACGCCGGCC
TCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGACGCGAT
CAGCATCGATGAAGACGCGAGCAACCGGAT
CGATACTTCTGAGTGTCTTAGCGAAGTGTCA
CGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAC
ACACGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGA
CGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAC
GATGAAGACGCGAGCAACCGGATGAAT
```



# Macro-tematiche

- 1) Biodiversità e genetica delle api
- 2) Autenticazione e qualità del miele
- 3) Patologia delle api



# Macro-tematiche

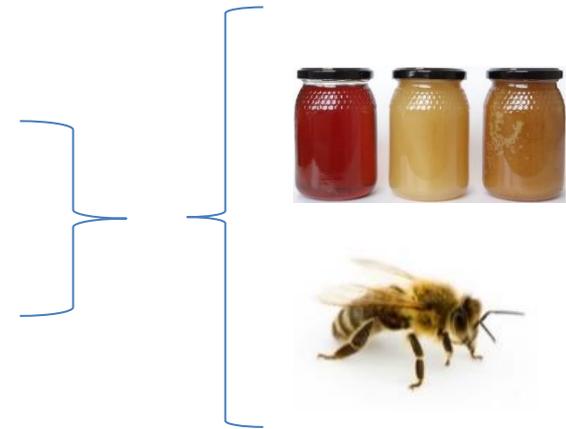
- 1) Biodiversità e genetica delle api
- 2) Autenticazione e qualità del miele
- 3) Patologia delle api



# 1

## Biodiversità e genetica delle api

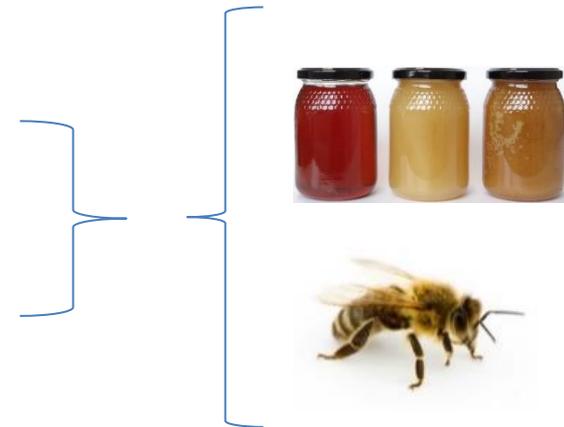
- 1) Analisi del DNA mitocondriale
- 2) Analisi del DNA nucleare



# 1

## Biodiversità e genetica delle api

- 1) **Analisi del DNA mitocondriale**
- 2) **Analisi del DNA nucleare**



# 1 Biodiversità e genetica delle api

## 1) Analisi del DNA mitocondriale

Completamento della mappatura delle popolazioni apistiche per quanto riguarda la distribuzione delle linee mitocondriali nella regione Emilia-Romagna utilizzando

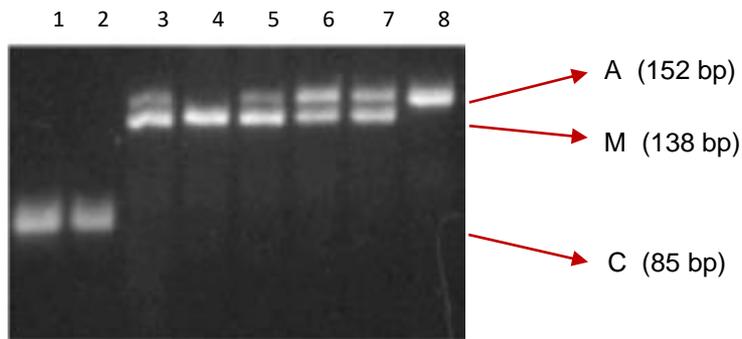
- il miele
- le api (larve)

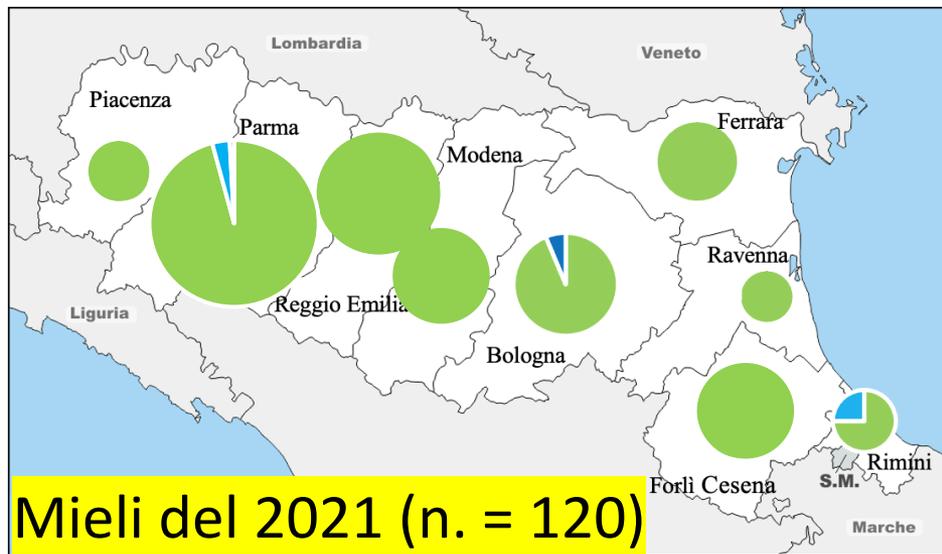
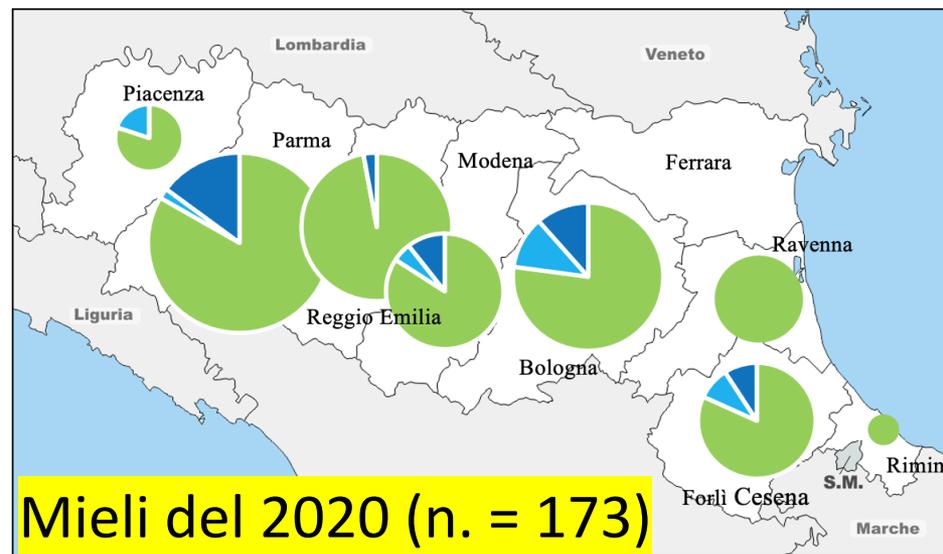
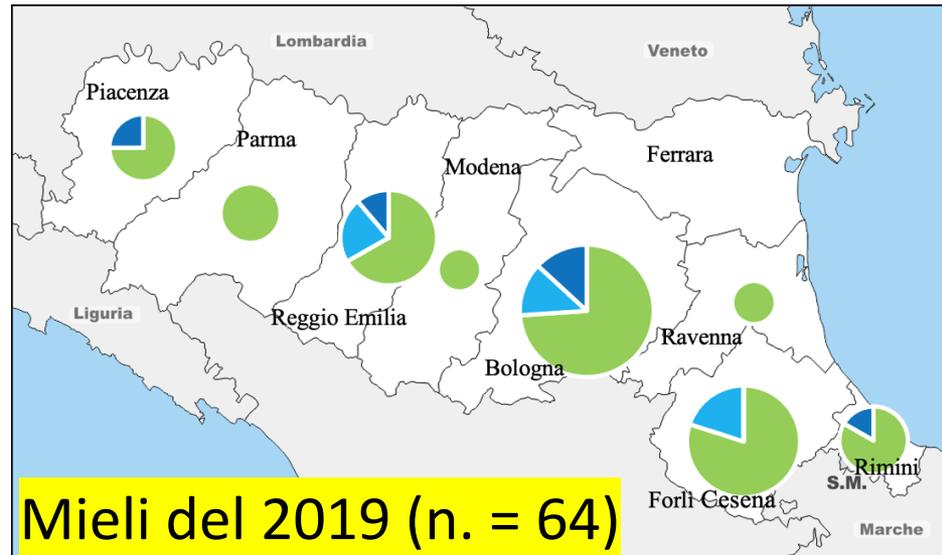
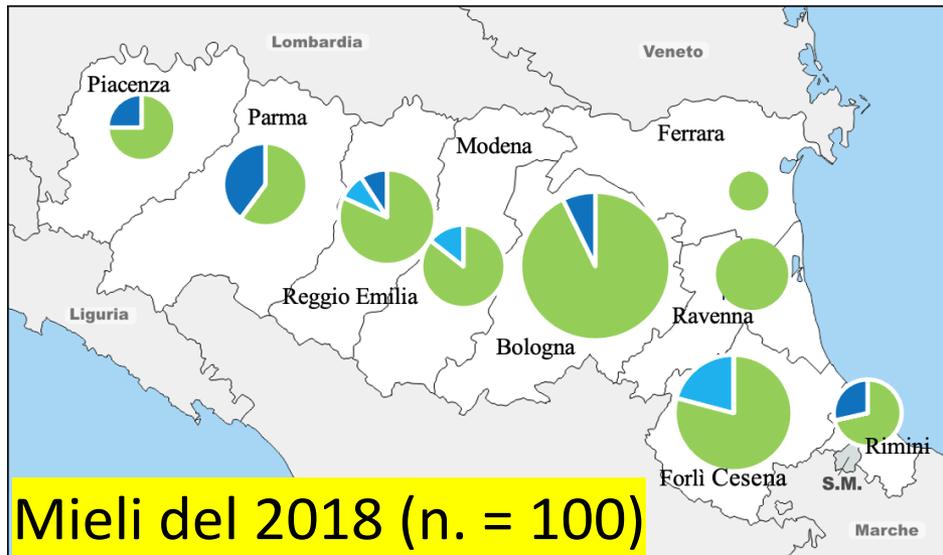


# 1

# Biodiversità e genetica delle api

## 1) Analisi del DNA mitocondriale da miele



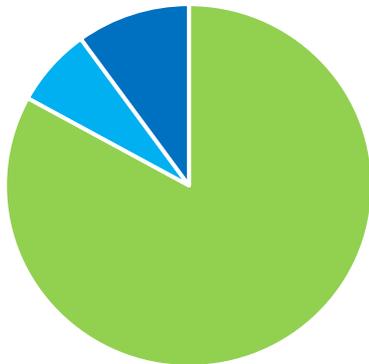


1

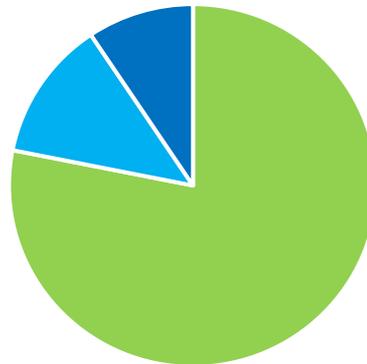
# Biodiversità e genetica delle api



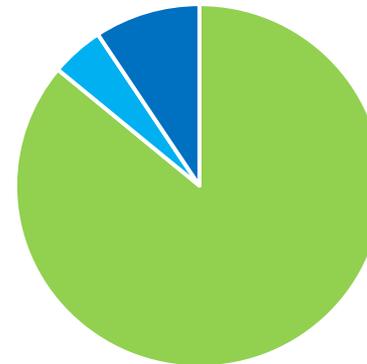
2018



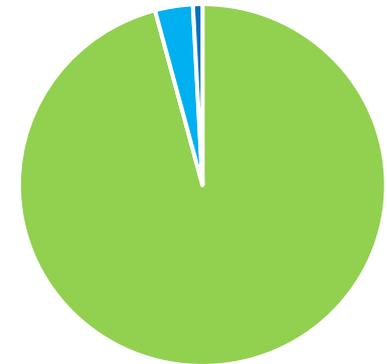
2019



2020



2021



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# 1

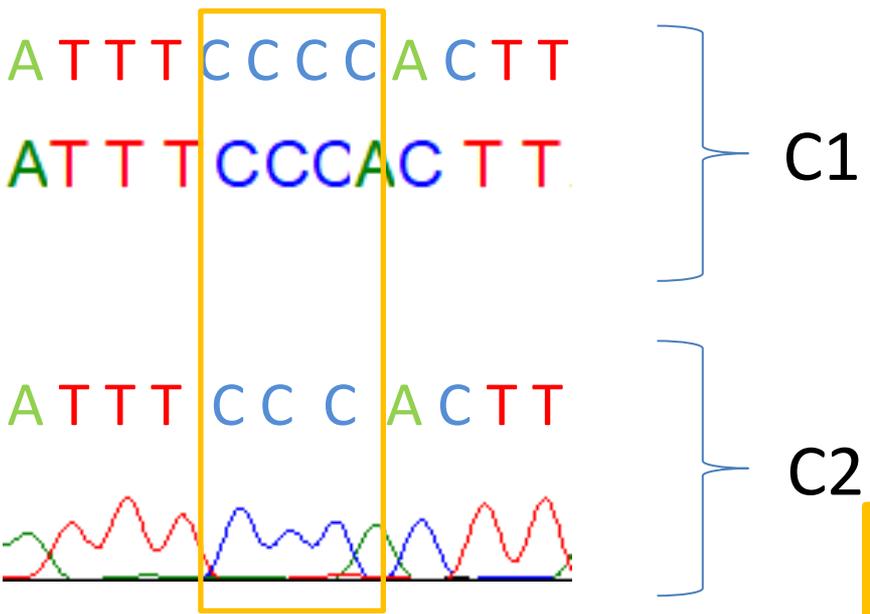
# Biodiversità e genetica delle api



## 1) Analisi del DNA mitocondriale da miele

C1 = *Apis mellifera ligustica*

C2 = *Apis mellifera carnica*



Entomological authentication of honey based on a DNA method that distinguishes *Apis mellifera* mitochondrial C mitotypes: Application to honey produced by *A. m. ligustica* and *A. m. carnica*

Valerio Joe Utzeri<sup>a,b</sup>, Anisa Ribani<sup>a,b</sup>, Valeria Taurisano<sup>a</sup>, Luca Fontanesi<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Agricultural and Food Sciences (DISTAL), Division of Animal Sciences, University of Bologna, Viale Fanin 46, 40127, Bologna, Italy  
<sup>b</sup> GRIFFA srl, Viale Giuseppe Fanin 46, 40127, Bologna, Italy



# 1

# Biodiversità e genetica delle api

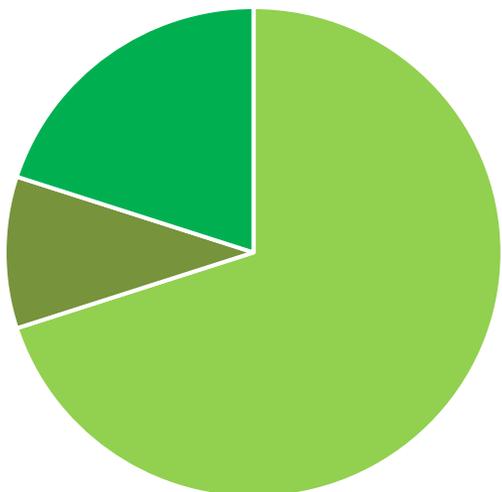


## 1) Analisi del DNA mitocondriale da miele

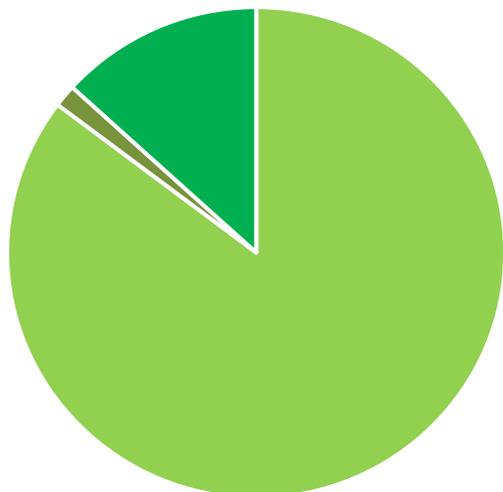
2019

2020

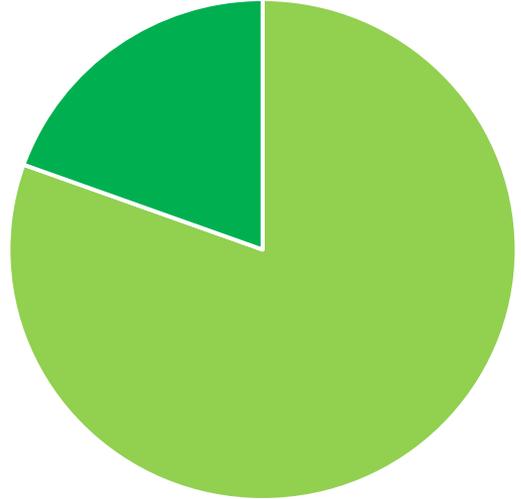
2021



n. = 40



n. = 68



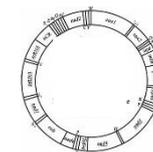
n. = 118



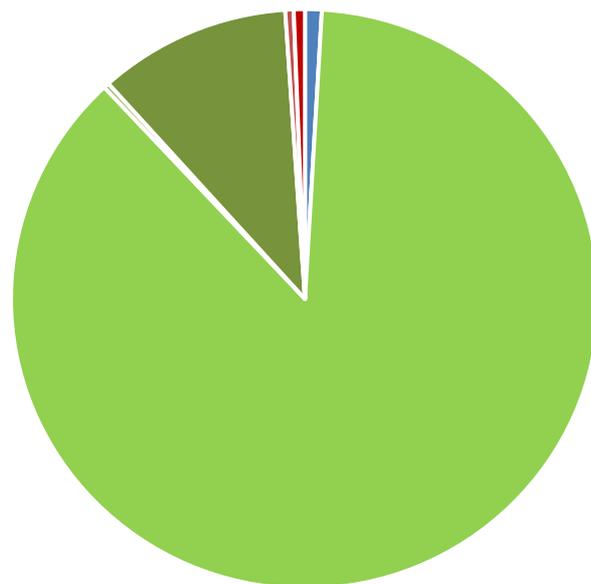
# 1 Biodiversità e genetica delle api

## 1) Analisi del DNA mitocondriale da api (larve/pupe)

(Analisi della regione intergenica tRNA<sub>Leu</sub>-cox2)



2021 + 2022



n. = 1143

■ A ■ C1 ■ C1\* ■ C2 ■ M3 ■ M4

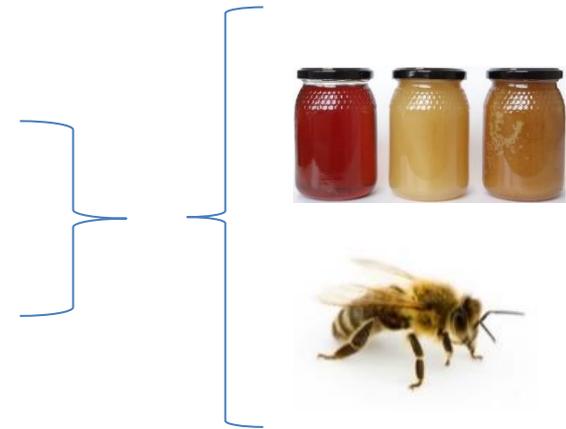


ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# 1

## Biodiversità e genetica delle api

- 1) Analisi del DNA mitocondriale
- 2) **Analisi del DNA nucleare**



# 1

# Biodiversità e genetica delle api

## 2) Analisi del DNA nucleare



### Obiettivo

- Identificare la sottospecie di ape
- Ottenere altre informazioni utili per la selezione

### Strumento

- Pannello di 121 SNP presenti nel genoma nucleare di ape
- Genotyping by sequencing (GBS)
- Analisi sia da miele che da api
- Confronto dei risultati da miele e api
- Confronto dei risultati ottenuti con altre metodologie/dati



# 1 Biodiversità e genetica delle api

## 2) Analisi del DNA nucleare



### Obiettivo

- Identificare la sottospecie di ape
- Ottenere altre informazioni utili per la selezione

### Strumento

- Pannello di 121 SNP presenti nel genoma nucleare di ape
  - 97 SNP: utili per l'identificazione della sottospecie
  - 24 SNP: associati a resistenza varroa e comportamento delle api

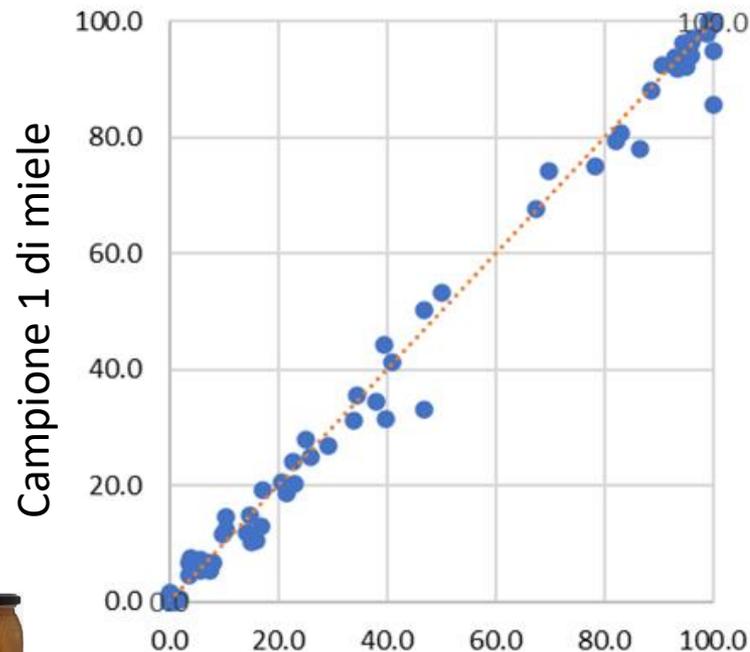


# 1

# Biodiversità e genetica delle api

## 2) Analisi del DNA nucleare

### Ripetibilità dell'analisi da miele

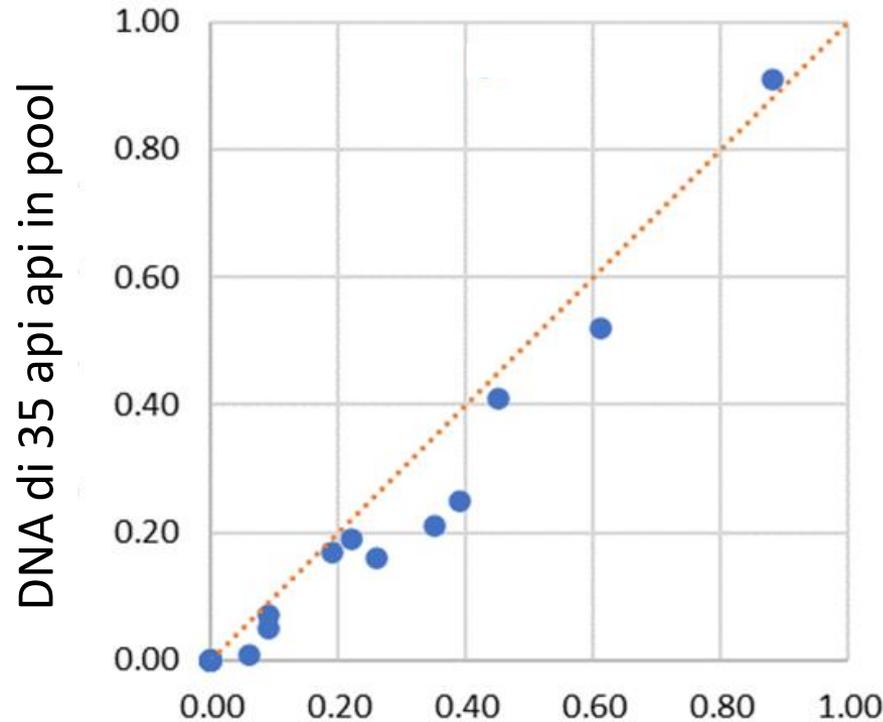


Duplicato del campione 1 di miele



# 1 Biodiversità e genetica delle api

## 2) Analisi del DNA nucleare



Correlazione > 98%

DNA dal miele della  
stessa colonia delle api



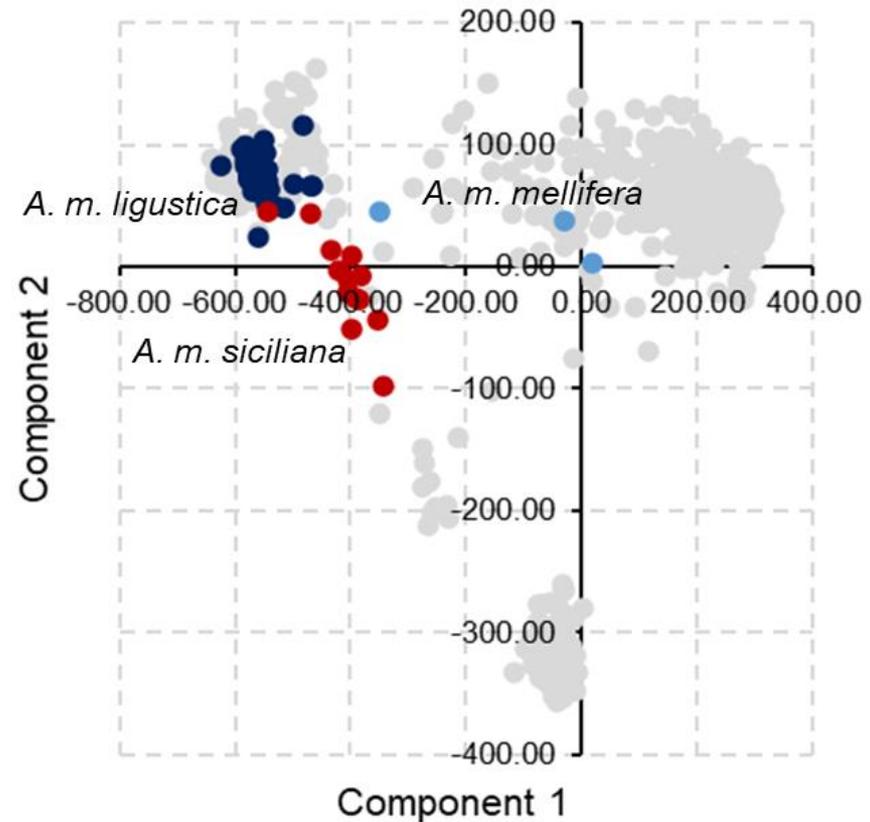
ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# 1 Biodiversità e genetica delle api

## 2) Analisi del DNA nucleare

97 SNP informativi

Plot con varie sottospecie  
(DNA da miele e da api)



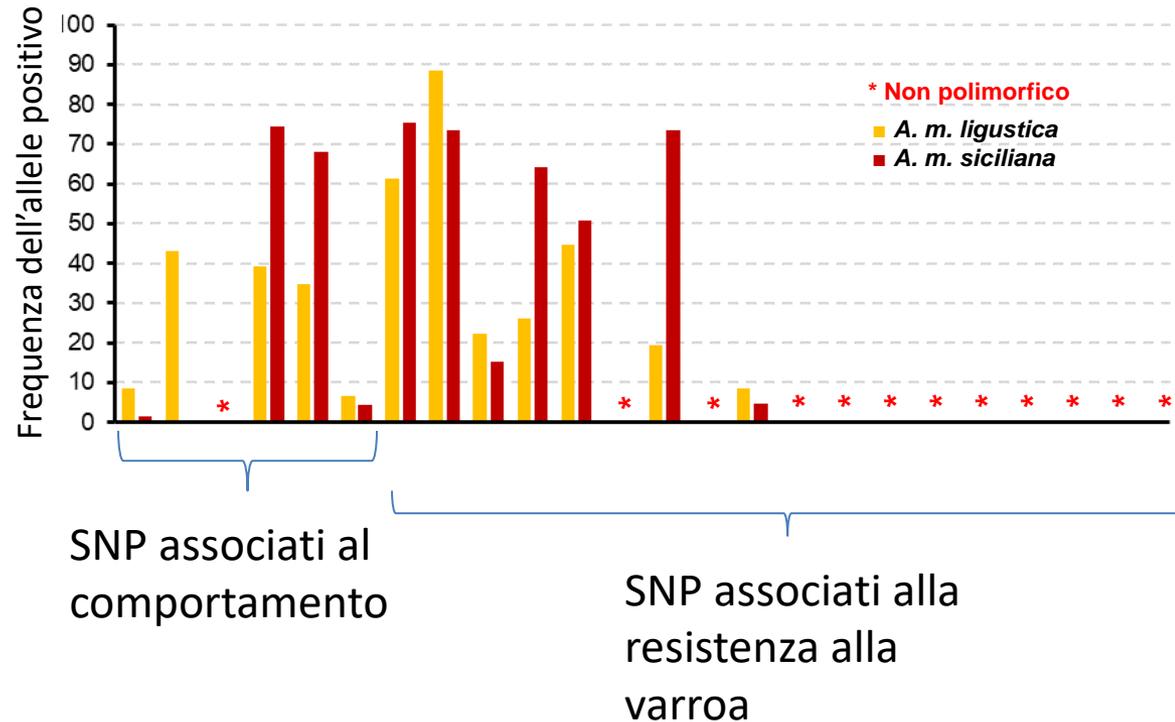
# 1

# Biodiversità e genetica delle api

## 2) Analisi del DNA nucleare

24 SNP associati ad alcune caratteristiche delle colonie

Frequenze alleliche in ligustica e siciliana



# 1 Biodiversità e genetica delle api



## Conclusioni (1)

- ❑ Abbiamo messo a punto metodi basati sull'analisi del DNA mitocondriale e del DNA nucleare per identificare *A. m. ligustica*
- ❑ Il metodo basato sull'analisi del DNA nucleare può essere ulteriormente migliorato
- ❑ Questi metodi possono essere applicati a partire dal DNA del miele e dal DNA di ape



# Macro-tematiche

1) Biodiversità e genetica delle api

2) Autenticazione e qualità del miele

3) Patologia delle api



## 2 Autenticazione e qualità del miele



### Analisi del DNA del miele per definire:

- a Origine botanica del miele
- b Origine entomologica del miele

### Obiettivo:

- aumentare il numero di campioni analizzati



# Autenticazione e qualità del miele



Food Control 86 (2018) 342–349

Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)



Application of next generation semiconductor based sequencing to detect the botanical composition of monofloral, polyfloral and honeydew honey

Valerio Joe Utzeri<sup>a</sup>, Anisa Ribani<sup>a</sup>, Giuseppina Schiavo<sup>a</sup>, Francesca Bertolini<sup>a, b</sup>, Samuele Bovo<sup>a, c</sup>, Luca Fontanesi<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Department of Agricultural and Food Sciences (DISTAL), University of Bologna, Viale Fanin 46, 40127 Bologna, Italy

<sup>b</sup> Department of Animal Science, Iowa State University, 2255 Kildee Hall, 50011 Ames, Iowa, USA

<sup>c</sup> Biocomputing Group, Department of Biological, Geological, and Environmental Sciences (BiGeA), University of Bologna, Via San Giacomo 9/2, 40126 Bologna, Italy



## SCIENTIFIC REPORTS

OPEN Entomological signatures in honey: an environmental DNA metabarcoding approach can disclose information on plant-sucking insects in agricultural and forest landscapes

Received: 3 July 2017  
Accepted: 11 June 2018  
Published online: 03 July 2018

Valerio Joe Utzeri<sup>1</sup>, Giuseppina Schiavo<sup>1</sup>, Anisa Ribani<sup>1</sup>, Silvia Tinarelli<sup>1</sup>, Francesca Bertolini<sup>1</sup>, Samuele Bovo<sup>1</sup> & Luca Fontanesi<sup>1</sup>

Honeydew produced from the excretions of plant-sucking insects (order Hemiptera) is a carbohydrate-rich material that is foraged by honey bees to integrate their diets. In this study, we used DNA extracted from honey as a source of environmental DNA to disclose its entomological signature determined by honeydew-producing Hemiptera that was recovered not only from honeydew honey but also from blossom honey. We designed PCR primers that amplified a fragment of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene of Hemiptera species using DNA isolated from unifloral, polyfloral and honeydew honeys. Ion Torrent next generation sequencing metabarcoding data analysis assigned Hemiptera species using a customised bioinformatic pipeline. The forest honeydew honey reported the presence of high abundance of *Cimex lectularius* DNA, confirming their silver fir forest origin. In all other honeys, most of the sequenced reads were from the plant hopper *Melanoplus* sp. for which it was possible to evaluate the frequency of different mitotypes. Aphids of other species were identified from honeys of different geographical and botanical origins. This unique entomological signature derived by environmental DNA contained in honey opens new applications for honey authentication and to disclose and monitor the ecology of plant-sucking insects in agricultural and forest landscapes.

Approccio target:  
Metabarcoding



RESEARCH ARTICLE

Shotgun metagenomics of honey DNA: Evaluation of a methodological approach to describe a multi-kingdom honey bee derived environmental DNA signature

Samuele Bovo<sup>1</sup>, Anisa Ribani<sup>1</sup>, Valerio Joe Utzeri<sup>1</sup>, Giuseppina Schiavo<sup>1</sup>, Francesca Bertolini<sup>2</sup>, Luca Fontanesi<sup>1</sup>\*

<sup>1</sup> Department of Agricultural and Food Sciences, University of Bologna, Bologna, Italy, <sup>2</sup> Department of Bio and Health Informatics, Technical University of Denmark, Kongens Lyngby, Denmark

\* [luca.fontanesi@unibo.it](mailto:luca.fontanesi@unibo.it)



Approccio non target:  
Shot-gun sequencing



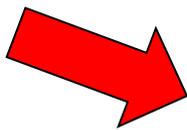
ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

2

# Autenticazione e qualità del miele



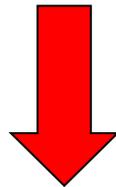
Approccio target:  
Metabarcoding per origine botanica



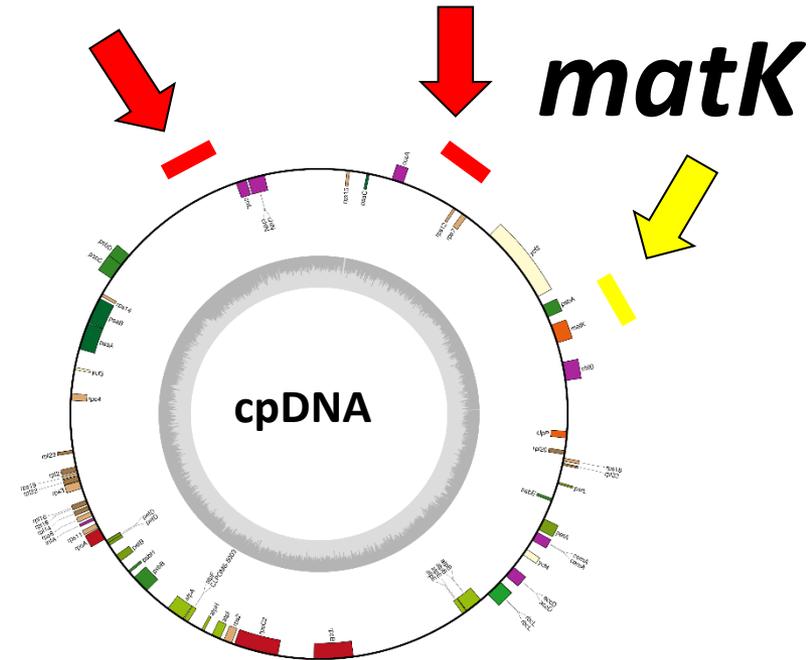
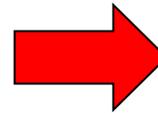
*rbcl*

*trnL*

*matK*



**DNA delle piante  
(DNA cloroplastico)**



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# Autenticazione e qualità del miele



Food Control 86 (2018) 342–349

Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)



Application of next generation semiconductor based sequencing to detect the botanical composition of monofloral, polyfloral and honeydew honey

Valerio Joe Utzeri<sup>a</sup>, Anisa Ribani<sup>a</sup>, Giuseppina Schiavo<sup>a</sup>, Francesca Bertolini<sup>a, b</sup>, Samuele Bovo<sup>a, c</sup>, Luca Fontanesi<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Department of Agricultural and Food Sciences (DISTAL), University of Bologna, Viale Fanin 46, 40127 Bologna, Italy

<sup>b</sup> Department of Animal Science, Iowa State University, 2255 Kildee Hall, 50011 Ames, Iowa, USA

<sup>c</sup> Biocomputing Group, Department of Biological, Geological, and Environmental Sciences (BiGeA), University of Bologna, Via San Giacomo 9/2, 40126 Bologna, Italy



## SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Entomological signatures in honey: an environmental DNA metabarcoding approach can disclose information on plant-sucking insects in agricultural and forest landscapes

Valerio Joe Utzeri<sup>1</sup>, Giuseppina Schiavo<sup>1</sup>, Anisa Ribani<sup>1</sup>, Silvia Tinarelli<sup>1</sup>, Francesca Bertolini<sup>1</sup>, Samuele Bovo<sup>1</sup> & Luca Fontanesi<sup>1, \*</sup>

Honeydew produced from the exicretion of plant-sucking insects (order Hemiptera) is a carbohydrate-rich material that is foraged by honey bees to integrate their diets. In this study, we used DNA extracted from honey as a source of environmental DNA to disclose its entomological signature determined by honeydew-producing Hemiptera that was recovered not only from honeydew honey but also from blossom honey. We designed PCR primers that amplified a fragment of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene of Hemiptera species using DNA isolated from unifloral, polyfloral and honeydew honeys. Ion Torrent next generation sequencing metabarcoding data analysis assigned Hemiptera species using a customised bioinformatic pipeline. The forest honeydew honey reported the presence of high abundance of *Cimex lectularius* DNA, confirming their silver fir forest origin. In all other honeys, most of the sequenced reads were from the planthopper *Metalimnobia* species for which it was possible to evaluate the frequency of different mitotypes. Aphids of other species were identified from honeys of different geographical and botanical origins. This unique entomological signature derived by environmental DNA contained in honey opens new applications for honey authentication and to disclose and monitor the ecology of plant-sucking insects in agricultural and forest landscapes.

Received: 3 July 2017  
Accepted: 11 June 2018  
Published online: 03 July 2018

Approccio target:  
Metabarcoding  
per origine  
botanica ed  
entomologica

Aumentato il  
numero di  
campioni di miele



RESEARCH ARTICLE

Shotgun metagenomics of honey DNA:  
Evaluation of a methodological approach to  
describe a multi-kingdom honey bee derived  
environmental DNA signature

Samuele Bovo<sup>1</sup>, Anisa Ribani<sup>1</sup>, Valerio Joe Utzeri<sup>1</sup>, Giuseppina Schiavo<sup>1</sup>,  
Francesca Bertolini<sup>1, 2</sup>, Luca Fontanesi<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup> Department of Agricultural and Food Sciences, University of Bologna, Bologna, Italy, <sup>2</sup> Department of Bio and Health Informatics, Technical University of Denmark, Kongens Lyngby, Denmark

\* [luca.fontanesi@unibo.it](mailto:luca.fontanesi@unibo.it)



Approccio non  
target:  
Shot-gun  
sequencing



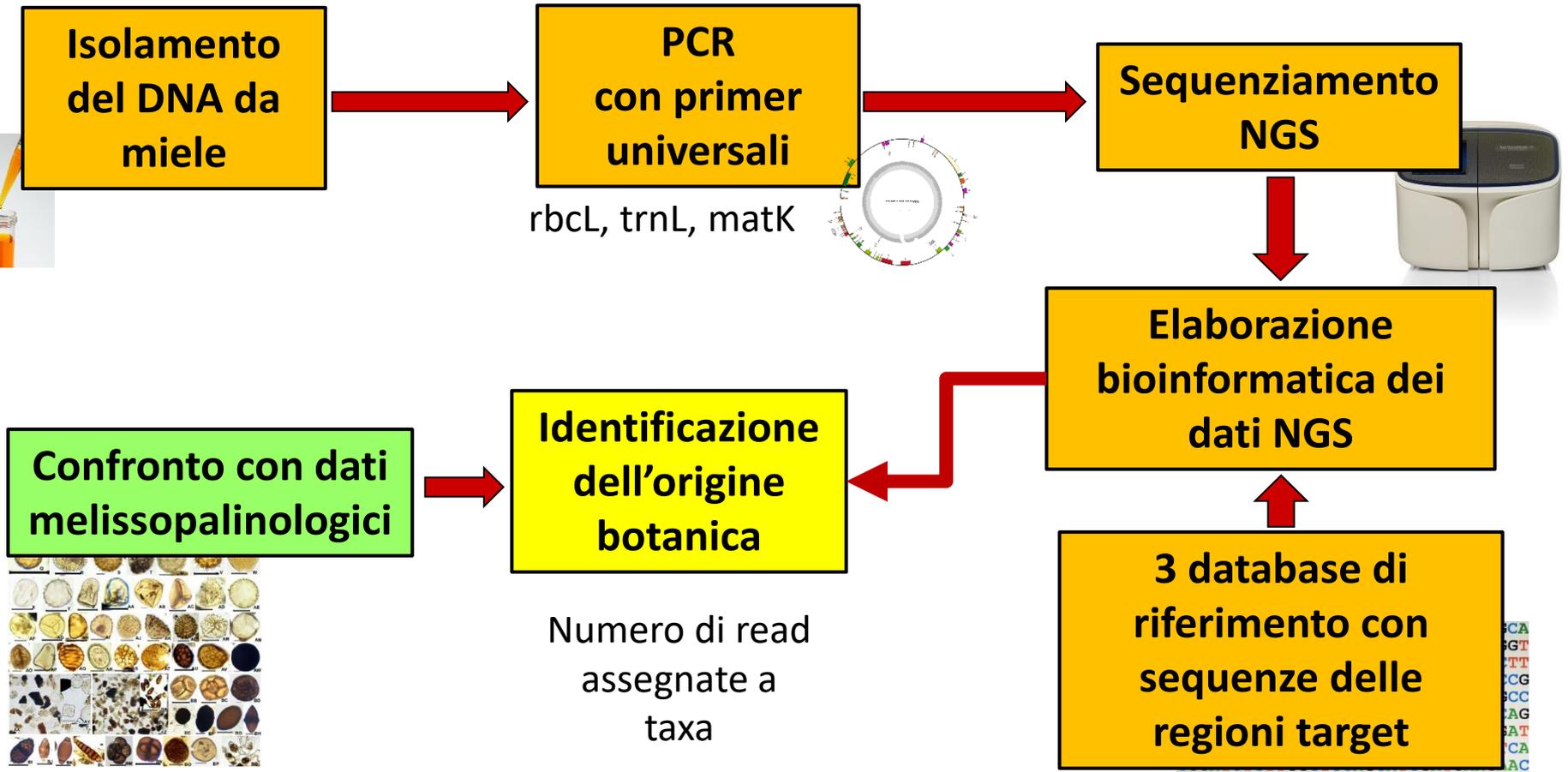
ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# 2

## Autenticazione e qualità del miele



Approccio target:  
Metabarcoding per origine botanica



ACAACGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAA  
CGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAAC  
GATGAAGAACGACGCGAAACGCGATATGTAAT

# 2

## Autenticazione e qualità del miele



Approccio target:

Metabarcoding per:

**origine botanica + origine entomologica**

90 mieli di diversa origine (70% da Emilia Romagna)



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# Autenticazione e qualità del miele



Food Control 86 (2018) 342–349

Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)



Application of next generation semiconductor based sequencing to detect the botanical composition of monofloral, polyfloral and honeydew honey

Valerio Joe Utzeri<sup>a</sup>, Anisa Ribani<sup>a</sup>, Giuseppina Schiavo<sup>a</sup>, Francesca Bertolini<sup>a, b</sup>, Samuele Bovo<sup>a, c</sup>, Luca Fontanesi<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Department of Agricultural and Food Sciences (DISTAL), University of Bologna, Viale Fanin 46, 40127 Bologna, Italy

<sup>b</sup> Department of Animal Science, Iowa State University, 2255 Kildee Hall, 50011 Ames, Iowa, USA

<sup>c</sup> Biocomputing Group, Department of Biological, Geological, and Environmental Sciences (BiGeA), University of Bologna, Via San Giacomo 9/2, 40126 Bologna, Italy



## SCIENTIFIC REPORTS

OPEN  
Entomological signatures in honey: an environmental DNA metabarcoding approach can disclose information on plant-sucking insects in agricultural and forest landscapes

Received: 3 July 2017  
Accepted: 11 June 2018  
Published online: 03 July 2018

Valerio Joe Utzeri<sup>1</sup>, Giuseppina Schiavo<sup>1</sup>, Anisa Ribani<sup>1</sup>, Silvia Tinarelli<sup>1</sup>, Francesca Bertolini<sup>1</sup>, Samuele Bovo<sup>1</sup> & Luca Fontanesi<sup>1</sup>

Honeydew produced from the excretion of plant-sucking insects (order Hemiptera) is a carbohydrate-rich material that is foraged by honey bees to integrate their diets. In this study, we used DNA extracted from honey as a source of environmental DNA to disclose its entomological signature determined by honeydew-producing Hemiptera that was recovered not only from honeydew honey but also from blossom honey. We designed PCR primers that amplified a fragment of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene of Hemiptera species using DNA isolated from unifloral, polyfloral and honeydew honeys. Ion Torrent next generation sequencing metabarcoding data analysis assigned Hemiptera species using a customised bioinformatic pipeline. The forest honeydew honey reported the presence of high abundance of *Cynara pectinata* DNA, confirming their silver fir forest origin. In all other honeys, most of the sequenced reads were from the plant hopper *Mecyrhina prunivora* for which it was possible to evaluate the frequency of different mitotypes. Aphids of other species were identified from honeys of different geographical and botanical origins. This unique entomological signature derived by environmental DNA contained in honey opens new applications for honey authentication and to disclose and monitor the ecology of plant-sucking insects in agricultural and forest landscapes.

Approccio target:  
Metabarcoding per origine entomologica



RESEARCH ARTICLE

Shotgun metagenomics of honey DNA: Evaluation of a methodological approach to describe a multi-kingdom honey bee derived environmental DNA signature

Samuele Bovo<sup>1</sup>, Anisa Ribani<sup>1</sup>, Valerio Joe Utzeri<sup>1</sup>, Giuseppina Schiavo<sup>1</sup>, Francesca Bertolini<sup>1</sup>, Luca Fontanesi<sup>1</sup>\*

<sup>1</sup> Department of Agricultural and Food Sciences, University of Bologna, Bologna, Italy, <sup>2</sup> Department of Bio and Health Informatics, Technical University of Denmark, Kongens Lyngby, Denmark

\* [luca.fontanesi@unibo.it](mailto:luca.fontanesi@unibo.it)



Approccio non target:  
Shot-gun sequencing



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

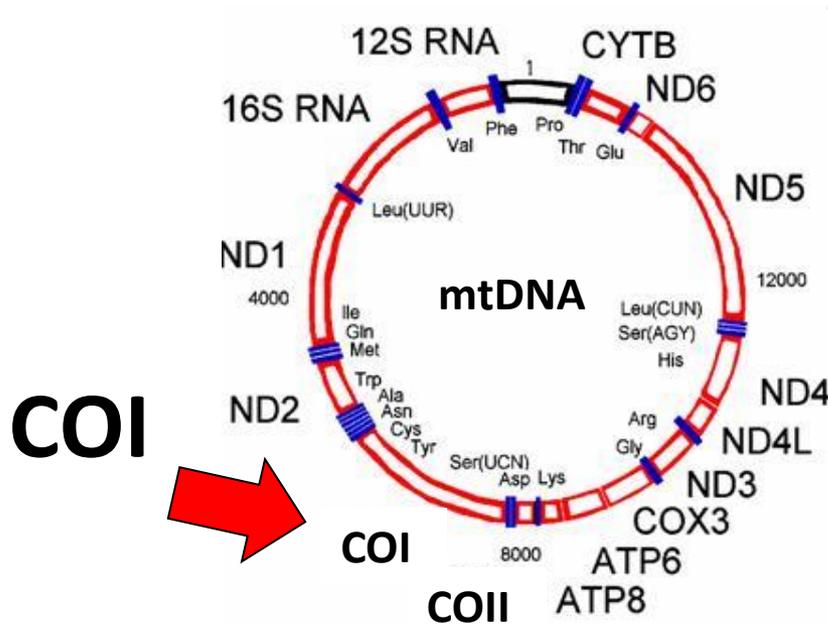
2

# Autenticazione e qualità del miele



Approccio target:

Metabarcoding per origine entomologica



## DNA degli insetti produttori di melata



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

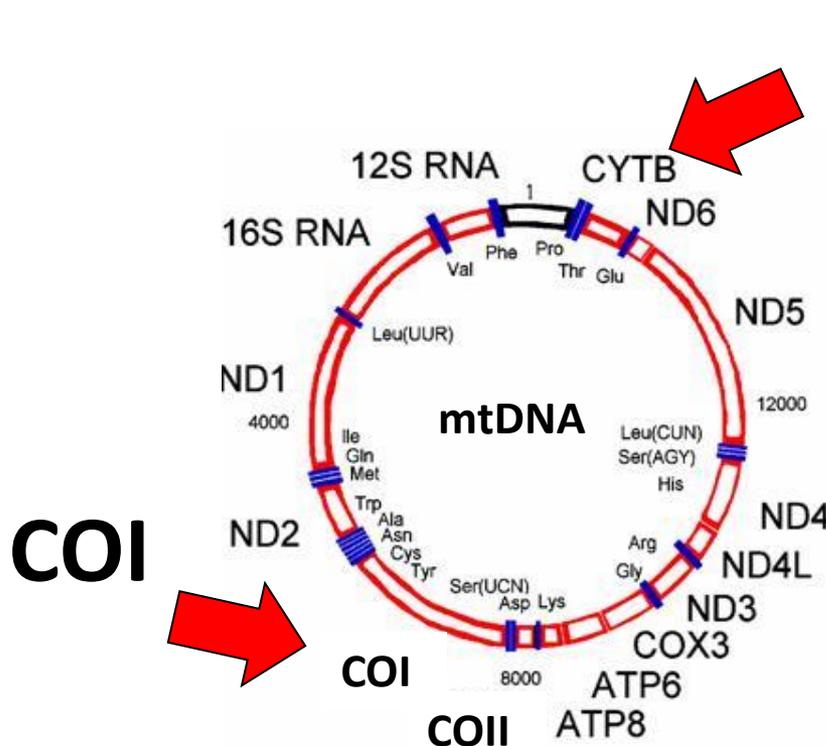
2

# Autenticazione e qualità del miele



Approccio target:

Metabarcoding per origine entomologica



**CYTB**



**DNA degli insetti produttori di melata**



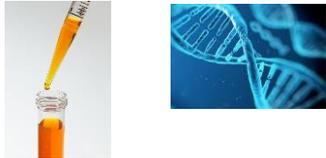
ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# 2 Autenticazione e qualità del miele

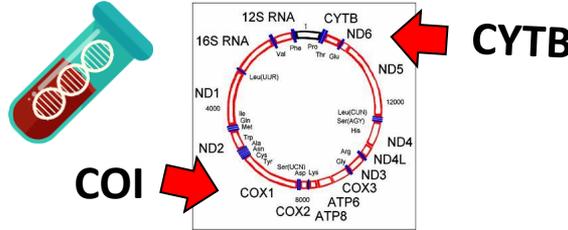


Approccio target:  
Metabarcoding per origine entomologica

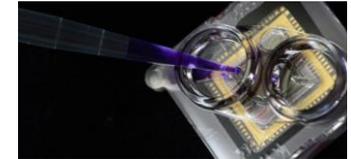
Isolamento  
del DNA da  
miele



PCR  
con primer  
universali per il  
mtDNA di Rincoti



Sequenziamento  
NGS



Costruzione di  
una banca dati  
di sequenze di  
riferimento per  
la seconda  
regione

Elaborazione con  
metodi  
bioinformatici dei  
dati ottenuti  
mediante  
Sequenziamento NGS

- NGS data processing
- Read assignment

ATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAACGCCA  
TCATTTAGAGGAAGTAAAGTCGTACGAAGGT  
GAACGTCAAACCTTTAACACGGATCTCTCT  
TGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCAAGGGTGGCCG  
GGCCTCGGCTGGCAGATCCCAACGGCGGGCC  
TCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAACGCCA  
CAGCATCGATGAAGAACGGCAGCGAAACGGCAT  
CGATACCTTCGAGTGTCTTAGCGGACTGTGCA  
CGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAAC  
ACAACGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAG  
CGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAAC  
GATGAAGAACGGCAGCGAAACGGATATGTAAT



## 2 Autenticazione e qualità del miele



### Conclusioni (2)

- ❑ Le metodologie di analisi del DNA del miele possono:
  - determinare l'origine del miele (botanica ed entomologica – per melata)
  - definire indicatori di biodiversità dell'ambiente



# Macro-tematiche

- 1) Biodiversità e genetica delle api
- 2) Autenticazione e qualità del miele
- 3) Patologia delle api



# 3

## Patologia delle api



a

Completamento della prova per valutare, nella pratica del blocco estivo della covata, l'impatto di diverse metodologie di confinamento della regina sulla diffusione di patologie tra le api adulte dell'alveare e la capacità di ripresa dell'ovideposizione post blocco di covata

b

Analizzare i possibili fattori che influiscono sul collasso delle famiglie attraverso la caratterizzazione del DNA del miele, la valutazione dell'impatto del parassita *Lotmaria passim* e la valutazione di fattori abiotici.

c

Ottimizzare la metodologia di monitoraggio della presenza dell'aggressore dell'alveare *Aethina tumida* mediante l'analisi del DNA del miele



# 3

## Patologia delle api



### a

Completamento della prova per valutare, nella pratica del blocco estivo della covata, l'impatto di diverse metodologie di confinamento della regina sulla diffusione di patologie tra le api adulte dell'alveare e la capacità di ripresa dell'ovideposizione post blocco di covata

## ANNO 1 + ANNO 2 della prova (pilot)

In 4 apiari – 4 colonie per ciascuna modalità

**A = classico confinamento con gabbietta senza covata**

**B = confinamento con telaio normale**

**C = confinamento con telaio tripartito**



# 3

## Patologia delle api



### a

Completamento della prova per valutare, nella pratica del blocco estivo della covata, l'impatto di diverse metodologie di confinamento della regina sulla diffusione di patologie tra le api adulte dell'alveare e la capacità di ripresa dell'ovideposizione post blocco di covata

- Campionamento di api ogni 15 – 25 gg (fino all'inizio di novembre)
- Congelamento api a  $-80^{\circ}\text{C}$  – estrazione RNA
- Analisi virosi – Real Time q PCR – digital PCR



# 3

## Patologia delle api



### a

Completamento della prova per valutare, nella pratica del blocco estivo della covata, l'impatto di diverse metodologie di confinamento della regina sulla diffusione di patologie tra le api adulte dell'alveare e la capacità di ripresa dell'ovideposizione post blocco di covata

### Virus

1. BQCV – Virus della cella reale nera (Black queen cell virus)
2. DWV- Virus delle ali deformi (Deformed wing virus)
3. SBV - Virus della covata a sacco (Sacbrood virus)
4. ABPV- Virus della paralisi acuta (Acute bee paralysis virus)
5. CBPV- Virus della paralisi cronica (Chronic bee paralysis virus)



# 3

## Patologia delle api



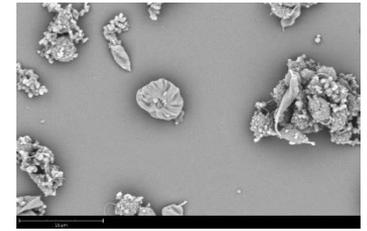
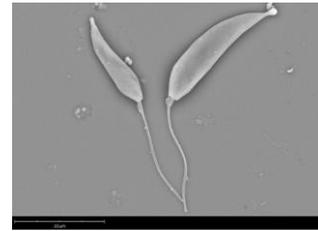
### a

Completamento della prova per valutare, nella pratica del blocco estivo della covata, l'impatto di diverse metodologie di confinamento della regina sulla diffusione di patologie tra le api adulte dell'alveare e la capacità di ripresa dell'ovideposizione post blocco di covata



## 3

# Patologia delle api



## b

La valutazione dell'impatto del parassita *Lotmaria passim*

Esame microscopico degli intestini

Apiario	n. api esaminate per alveare	n. api positive per alveare (media; min-max)	n. api esaminate per apiario	n. api positive per apiario	%	Intervallo di confidenza (IC 95%)
Rimini	21	0	63	0	0	0
Bologna A	15	3,5; 2 - 5	90	21	23,3%	14,57 – 32,03
Bologna B	15	3,5; 0-7	90	21	23,3%	14,57 – 32,03
Bologna C	15	2,6; 0-10	90	16	17,7%	9,82 – 25,28
Bologna D	15	3,8; 0-9	90	23	25,5%	16,5 – 34,5



## 3

# Patologia delle api



## C

Ottimizzare la metodologia di monitoraggio della presenza dell'aggressore dell'alveare *Aethina tumida* mediante l'analisi del DNA del miele



Article

## Honey Environmental DNA Can Be Used to Detect and Monitor Honey Bee Pests: Development of Methods Useful to Identify *Aethina tumida* and *Galleria mellonella* Infestations

Anisa Ribani <sup>1,2</sup> , Valeria Taurisano <sup>1</sup>, Valerio Joe Utzeri <sup>1,2</sup>  and Luca Fontanesi <sup>1,\*</sup> 

- <sup>1</sup> Department of Agricultural and Food Sciences, University of Bologna, Viale Giuseppe Fanin 46, 40127 Bologna, Italy; anisa.ribani2@unibo.it (A.R.); valeria.taurisano2@unibo.it (V.T.); valeriojoe.utzeri2@unibo.it (V.J.U.)  
<sup>2</sup> GRIFFA srl, Viale Fanin 48, 40127 Bologna, Italy  
 \* Correspondence: luca.fontanesi@unibo.it; Tel: +39-051-2096535

**Abstract:** Environmental DNA (eDNA) contained in honey derives from the organisms that directly and indirectly have been involved in the production process of this matrix and that have played a role in the hive ecosystems where the honey has been produced. In this study we set up PCR-based assays to detect the presence of DNA traces left in the honey by two damaging honey bee pests: the small hive beetle (*Aethina tumida*) and the greater wax moth (*Galleria mellonella*). DNA was extracted from 82 honey samples produced in Italy and amplified using two specific primer pairs that target the mitochondrial gene cytochrome oxidase I (COI) of *A. tumida* and two specific primer pairs that target the same gene in *G. mellonella*. The limit of detection was tested using sequential dilutions of the pest DNA. Only one honey sample produced in Calabria was positive for *A. tumida* whereas about 66% of all samples were positively amplified for *G. mellonella*. The use of honey eDNA could be important to establish early and effective measures to contain at the local (e.g., apiary) or regional scales these two damaging pests and, particularly for the small hive beetle, to prevent its widespread diffusion.

**Keywords:** apiculture; *Apis mellifera*; assay; beekeeping; eDNA; greater wax moth; health; mitochondrial DNA; sequencing; small hive beetle



**Citation:** Ribani, A.; Taurisano, V.; Utzeri, V.J.; Fontanesi, L. Honey Environmental DNA Can Be Used to Detect and Monitor Honey Bee Pests: Development of Methods Useful to Identify *Aethina tumida* and *Galleria mellonella* Infestations. *Vet. Sci.* **2022**, *9*, 213. <https://doi.org/10.3390/vetsci9050213>



*Aethina tumida*

*Galleria mellonella*



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

## 3

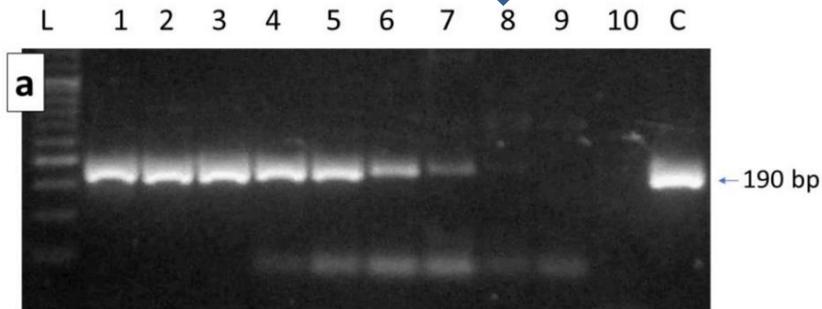
# Patologia delle api



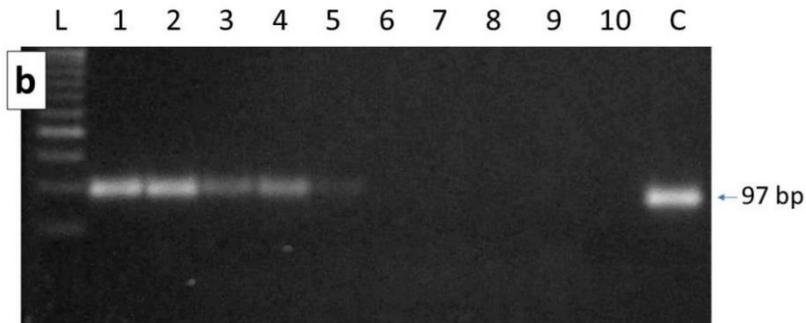
## c

Ottimizzare la metodologia di monitoraggio della presenza dell'aggressore dell'alveare *Aethina tumida* mediante l'analisi del DNA del miele

0,0001 ng



*Aethina tumida*



# 3

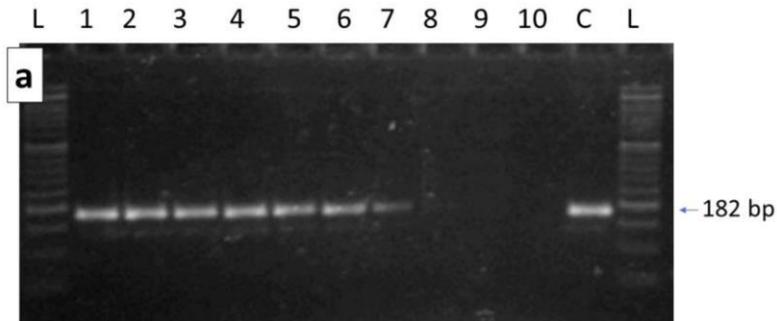
## Patologia delle api



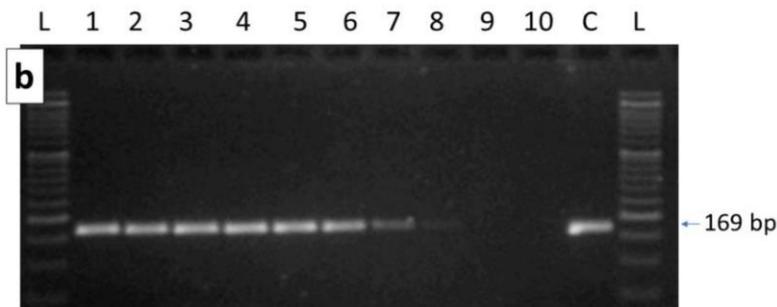
### C

Ottimizzare la metodologia di monitoraggio della presenza dell'aggressore dell'alveare *Galleria mellonella* mediante l'analisi del DNA del miele

0,0001 ng



*Galleria mellonella*





## Conclusioni (3)

- Stiamo cercando di dare risposte relative all'impatto di alcune pratiche apistiche sulla salute delle colonie
- Abbiamo sviluppato metodologie utili per il monitoraggio degli aggressori dell'alveare e di parassiti



# Conclusioni generali

- **BEE-RER-3** è stato strutturato in diverse azioni per cercare di contribuire alla soluzione di diversi problemi del settore apistico regionale – come da bando
- Abbiamo ottenuto risultati che aprono nuove possibilità applicative
- Il coinvolgimento e la collaborazione delle Associazioni e Organizzazioni apistiche regionali, fondamentali per l'ottenimento dei risultati, lo saranno ancora di più per il loro trasferimento applicativo



# Risultati e attività in numeri

## BEE-RER, BEE-RER-2 e BEE-RER-3 hanno prodotto

- 6 pubblicazioni scientifiche (altre 3 sono in corso di pubblicazione)
  - 3 comunicazioni in convegni scientifici
  - 5 articoli divulgativi
  - 12 eventi di divulgazione
  - 18 nuovi metodi/protocolli analitici
- 
- Sono stati effettuati circa 4500 campionamenti di api/favi/miele
  - Sono stati analizzati circa 1500 campioni di miele per un totale di circa 3500 analisi
  - Sono state analizzate circa 1700 api o pool di api



<https://site.unibo.it/bee-rer/it/>



PROGETTO DI RICERCA BEE-RER

HOME

IL CONTESTO

IL PROGETTO

LINEE GUIDA PER IL CAMPIONAMENTO

LE PERSONE

GLI EVENTI



<https://www.facebook.com/progettoBEERER/>

@progettoBEERER



<https://www.linkedin.com/company/bee-rer>



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



## Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-alimentari (DISTAL)

Mohamad Ballan



Matteo Bolner



Samuele Bovo



Anisa Ribani



Giuseppina Schiavo



Valeria Taurisano



Valerio Joe Utzeri



Luca Fontanesi



## Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET)

Gloria Isani



Roberta Galuppi



Giulia Andreani



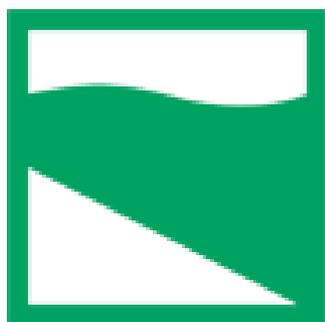


Unione Europea



mipaaf

ministero delle politiche  
agricole alimentari e forestali



Progetto realizzato con il contributo del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, Regolamento UE 1308/2013, Programma regionale triennale 2020-2022, Regione Emilia-Romagna, Misura F (DELIBERAZIONE DELL'ASSEMBLEA LEGISLATIVA DELLA REGIONE EMILIA-ROMAGNA 27 LUGLIO 2019, N. 216 (BEE-RER), DELIBERAZIONE DELLA GIUNTA REGIONALE 28 LUGLIO 2020, N. 939 (BEE-RER-2) e DELIBERAZIONE DELLA GIUNTA REGIONALE 22 LUGLIO 2021, N. 1181 (BEE-RER-3).



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# Ringraziamenti

- Tutte le Associazioni di Apicoltori della Regione
- L'Osservatorio Nazionale Miele  
(Alberto Contessi e Giancarlo Naldi)
- Lucia Piana
- Zeid Nabulsi, Daniele Alberoni, Giorgio Baracani
- Molti altri apicoltori
- Giovanni Guido e UNAAPI
- L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana



Regione Emilia-Romagna



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA