



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

27 Luglio 2020

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



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

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



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

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

Samuele Bovo

Anisa Ribani

Giuseppina Schiavo

Valerio Joe Utzeri

Luca Fontanesi



## Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET)

Gloria Isani

Roberta Galuppi

Giulia Andreani



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

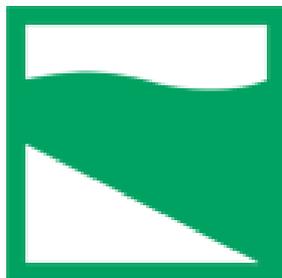


Unione Europea



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 2019/2020, sottoprogramma ministeriale Regione Emilia-Romagna, Misura F (DELIBERAZIONE DELL'ASSEMBLEA LEGISLATIVA DELLA REGIONE EMILIA-ROMAGNA 27 LUGLIO 2019, N. 216 – OCM Apicoltura)



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

# Titolo completo del progetto

“L’analisi del DNA ambientale del miele e di contaminanti per la valorizzazione e la difesa delle produzioni apistiche e per il monitoraggio degli aggressori dell’alveare in Emilia-Romagna (**BEE-RER**)”



# Gli obiettivi di BEE-RER

- 1) **Salvaguardia *A. mellifera ligustica***  
(biodiversità – Legge Regionale)
- 2) **Origine botanica del miele**  
(autenticazione – Frodi)
- 3) **Patogeni/sanità delle api e delle produzioni**  
(monitoraggio – epidemiologia)



# Gli strumenti di BEE-RER

- 1) Affrontare queste problematiche utilizzando la **genomica**
- 2) Sfruttare le potenzialità dell'**analisi del DNA del miele**
- 3) Affiancare altre metodologie all'**analisi del DNA**



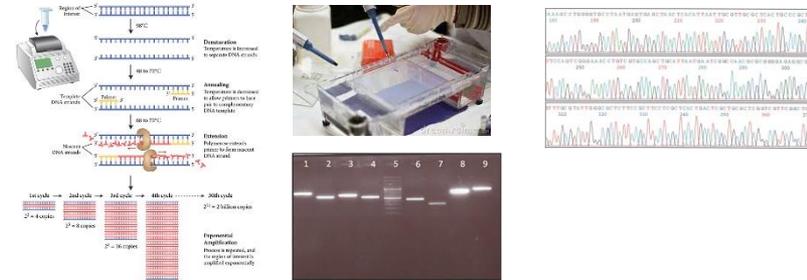
# Che cos'è il DNA

ATTTATATAGTTTAAAAAAACATTATATTTTCAATATAAAAAATAATTAAATTTAATTTATAAATATAAT  
TAAGTCAAATTTAATTTAAATAACAAATAAATAACCTAAAAATTATTTATTAATAAAGAAATATCAATAA  
ATAAAGCTTCTAACTTTAACTCTAGATTCGTAAATAATCTATATTTCTTATTATATAAATTTAAATAAATA  
TTAATTTTAAAATAAAATTATATAATAAGCTAAATAAAGCTAACAGGTTTCATACCCTGTCGATAAATTAA  
TAATTTTATATAAATTATTAAATTTATTTTAGTGTTTAAGCACATAAAATTTTGAATTTTATAGTATTA  
ATTAATTAATAAATTGGATATTAGTTATAAATAATAACATTTAAATTGCATTTAAAAATTAATATTTTA  
TATATTATATCTAAAAAGTAATATGTCTGATAAAAGAAATATTTTGATAAAATATTAATGTATAATTTTT  
ATATATACTATTACTTATCTTCTTCATAAATTTTAAATACCCTGATTTATCTATCTTTTTAATTACTATC  
TTTGTATTAATAATAAATTTCCAATAATATTTTTATTCAATGAATATTAATAGAATTTGGTACAATCATT  
GAATTAGACTAATTAATATTAATCCACAAATAAAACCCCGAGATTAATTTATTATTTCAGTATCAGTAAT  
TTCAAGAATTTTTTTTATTCTTTATAATTATTGTATACTTATCATCTATTAGATTTACTAAAACAGATACT  
TTTAATTTTATAGTTCAAATAATATTTTTTTTTAAAATTGGAACTTTCCCTTTTCATTTTTGAATAATTT  
ATTCTTATGAAATAATAAATTGAAAGCAAATTTTTTTAATATCAACATTAATCAAATTTATTCCAATTTA  
TATAATAGTTTCAATAACTAAAATTAATTCATGAACATTATATTTTTTAATTACAAATAGATTATATATT  
TCATTTTATGCTAATAAATTTTACACTCTAAAAAATTACTAGCATGTTCAACAATTTTTAATTCATTCT  
ATTTTATTTTTTATTTTAGAATTAATAAAAAATATATTTATTGCTATAATTATTTTATATTCATTTAATTA  
TTTTTTATTAATTAGATTCTTAAATAAATTTAATATTCAAATTTTAATTTTATATTTTATAAATAAATAT  
CAAATATACACATTCTTAACATTAATATTTAATTATTCAATATATCCAATTTTTCTTTTCATTTGTAATTA  
AATGAAATCTAATTTTTTATAATAGTAAGAGTTAAAGCTTATAATTGAATTTTATTTCTTTTAATAATTT  
TAGAATATTAATAATTTGAAATTATATTATTATTTTAAAACGTGTATTTTTAAAATAAATTTTTATAAA  
AATAATTTTATTGATGATAAAGATAATAAATATATATATCATAGATATTTTGCCTTATACTTCTTTTCAT  
TTAATGTTTCATTTTTTTATTACATTAAATTTTTTATAAATTATTATAATTATGATGATAATAATTAATCT  
TCAAATTTGCAATCTGATGTTTTATATTTTAACTATAATAATTTATTTACCATGATATAGTATAGTATT  
AGAAAAATTTAATTTTCAATTTTAAATTTACAATTTAACTCTTATTTAGATTTAATACTAAGTAAGAT



# Come si analizza il DNA

## 1a) End-point PCR analyses



## 1) Analisi target

## 1b) Next generation sequencing



## 2) Analisi non-target

Next generation sequencing:  
Shotgun metagenomic analysis



illumina®



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# La struttura del progetto BEE-RER

Il progetto è suddiviso in:

- **4 azioni**
- **3 fasi operative**



# La struttura del progetto BEE-RER

## Le 4 azioni:

- 1) Messa a punto e utilizzo di sistemi per l'identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera* dal miele e analisi della loro diffusione nella Regione Emilia-Romagna;
- 2) Applicazione di nuovi approcci molecolari per l'identificazione dell'origine botanica del miele della Regione Emilia-Romagna, per la sua valorizzazione geografica;

....



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# La struttura del progetto BEE-RER

## Le 4 azioni:

....

- 3) Caratterizzazione multifattoriale del miele per la messa a punto di sistemi integrati di valutazione qualitativa e sanitaria di questo prodotto e per la valutazione e il monitoraggio sanitario degli apiari;
- 4) Analisi della distribuzione e messa a punto di metodi per il monitoraggio di diversi patogeni sul territorio regionale.



# La struttura del progetto BEE-RER

## Le 3 fasi:

- 1) La fase di preparazione: raccolta dei campioni di miele e di api sul territorio regionale;
- 2) La fase analitica e di elaborazione dei dati;
- 3) La fase di disseminazione e divulgazione.



# Gli obiettivi di BEE-RER

- 1) Salvaguardia *A. mellifera ligustica***  
(biodiversità – Legge Regionale)
- 2) Origine botanica del miele**  
(autenticazione – Frodi)
- 3) Patogeni/sanità delle api e delle produzioni**  
(monitoraggio – epidemiologia)



I diversi livelli dell'informazione genetica

1) Morfologia

2) DNA mitocondriale

3) DNA nucleare

## Salvaguardia *A. mellifera ligustica*

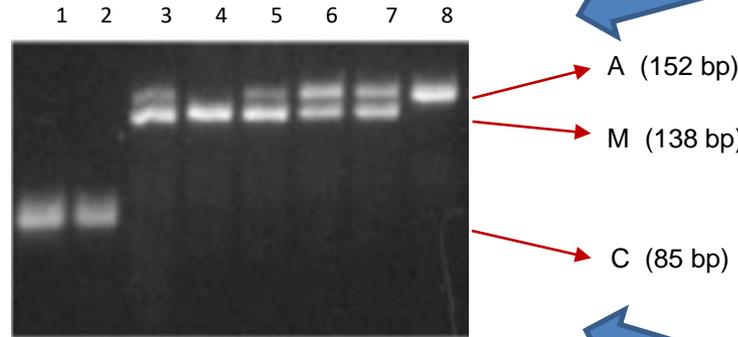
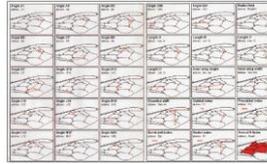
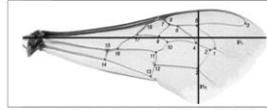
- 1) Agganciare l'analisi morfometrica delle api all'analisi del DNA delle api e del miele (mtDNA)
- 2) Miglioramento della mappatura della distribuzione delle linee mitocondriali nella regione (mediante analisi del DNA del miele)
- 3) Messa a punto preliminare di un possibile metodo per l'identificazione della sottospecie mediante analisi del DNA nucleare direttamente da miele



- 1) Agganciare l'analisi morfometrica delle api all'analisi del DNA delle api e del miele (mtDNA)**
- 2) Miglioramento della mappatura della distribuzione delle linee mitocondriali nella regione (mediante analisi del DNA del miele)
- 3) Messa a punto preliminare di un possibile metodo per l'identificazione della sottospecie mediante analisi del DNA nucleare direttamente da miele

# Salvaguardia *A. mellifera ligustica*

Agganciare  
l'analisi  
morfometrica  
delle api  
all'analisi del  
DNA delle api e  
del miele  
(**mtDNA**)



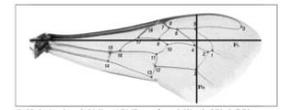
70-100 famiglie  
(2 campioni di 50 api)

+

Un pezzo di favo  
con miele da  
ciascuna famiglia

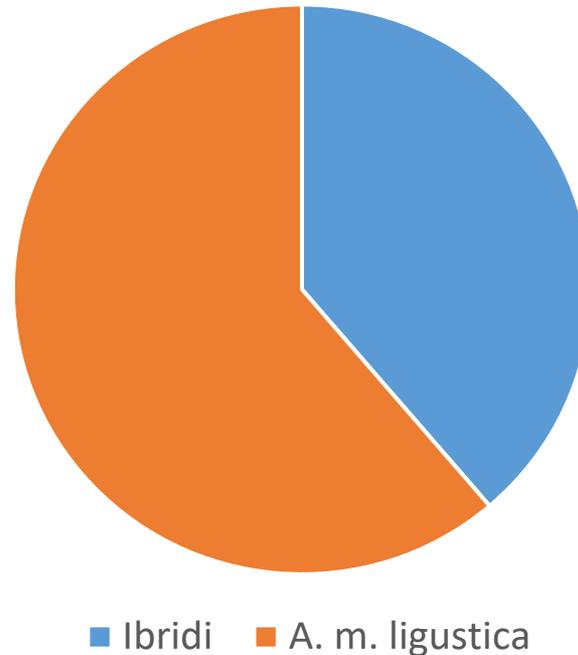


# Salvaguardia *A. mellifera ligustica*



## Risultati dell'analisi morfometrica (n. = 80)

[effettuata in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana]

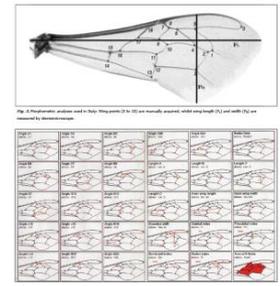


Soglia per definire  
Ligustica: 90%  
di rispondenza



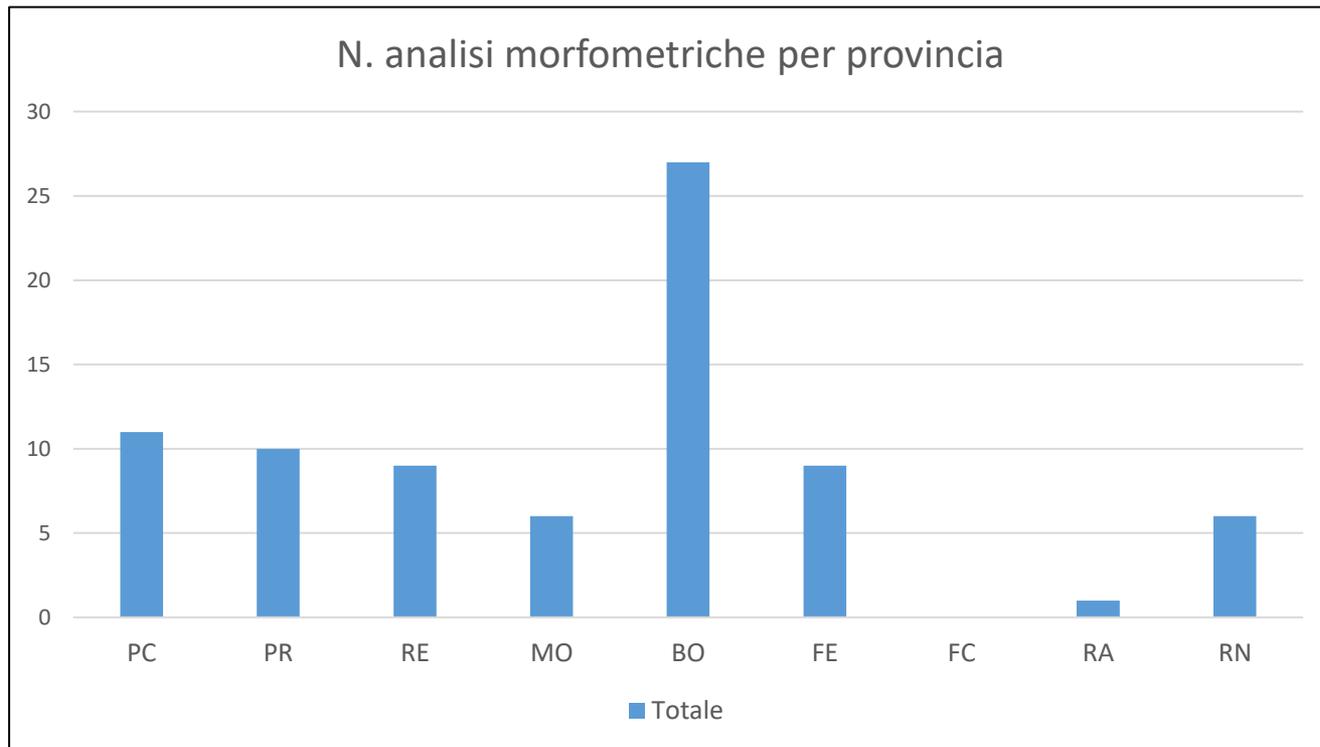
ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# Salvaguardia *A. mellifera ligustica*



## Risultati dell'analisi morfometrica (n. = 79)

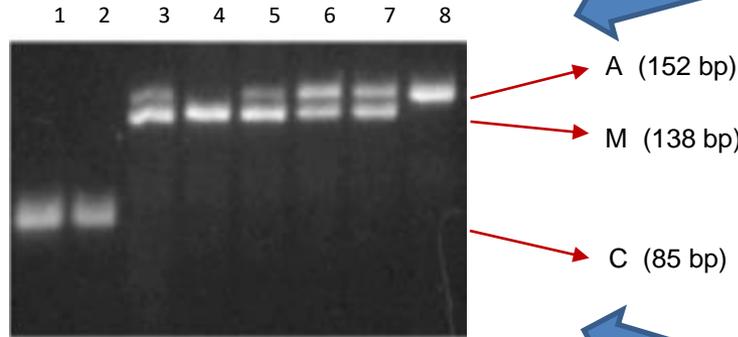
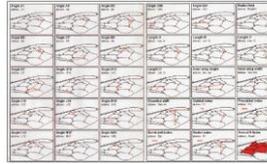
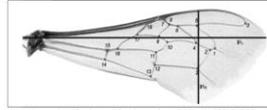
[effettuata in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana]



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# Salvaguardia *A. mellifera ligustica*

Agganciare  
l'analisi  
morfometrica  
delle api  
all'analisi del  
DNA delle api e  
del miele  
(**mtDNA**)



70-100 famiglie  
(2 campioni di 50 api)

+

Un pezzo di favo  
con miele da  
ciascuna famiglia



# Analisi del DNA



Analisi del DNA del miele (da favo)

- DNA mitocondriale
- DNA nucleare



Analisi del DNA delle api

- DNA mitocondriale



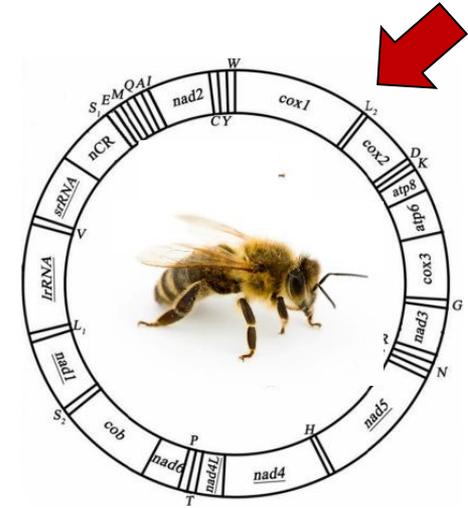
# Salvaguardia *A. mellifera ligustica*

## DNA mitocondriale

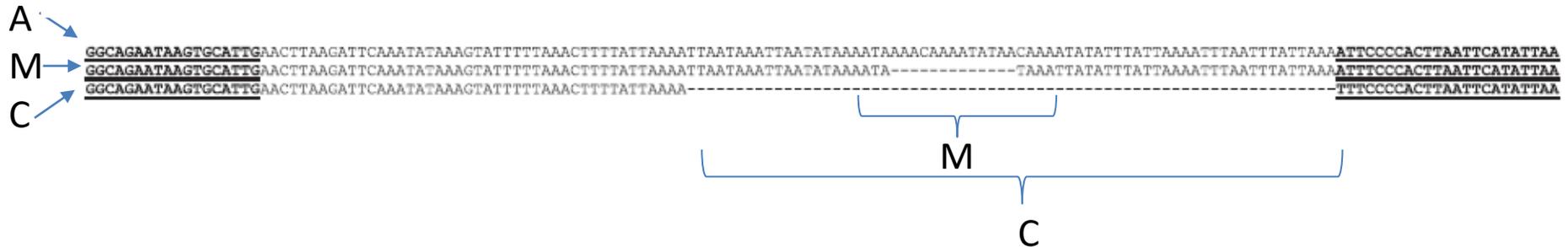
3 principali linee mitocondriali in Europa:

**A, C, M**

Diversa lunghezza della regione COI-COII intergenomic spacer

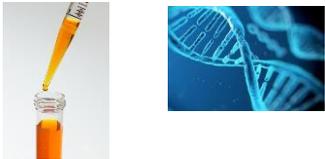


***Apis mellifera* mtDNA**



## Analisi del DNA mitocondriale

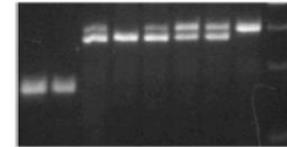
Isolamento  
del DNA



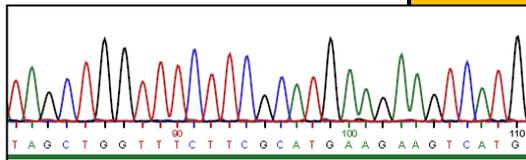
PCR con  
primer specifici  
disegnati sulla  
regione di  
mtDNA



Analisi con gel  
elettroforetico

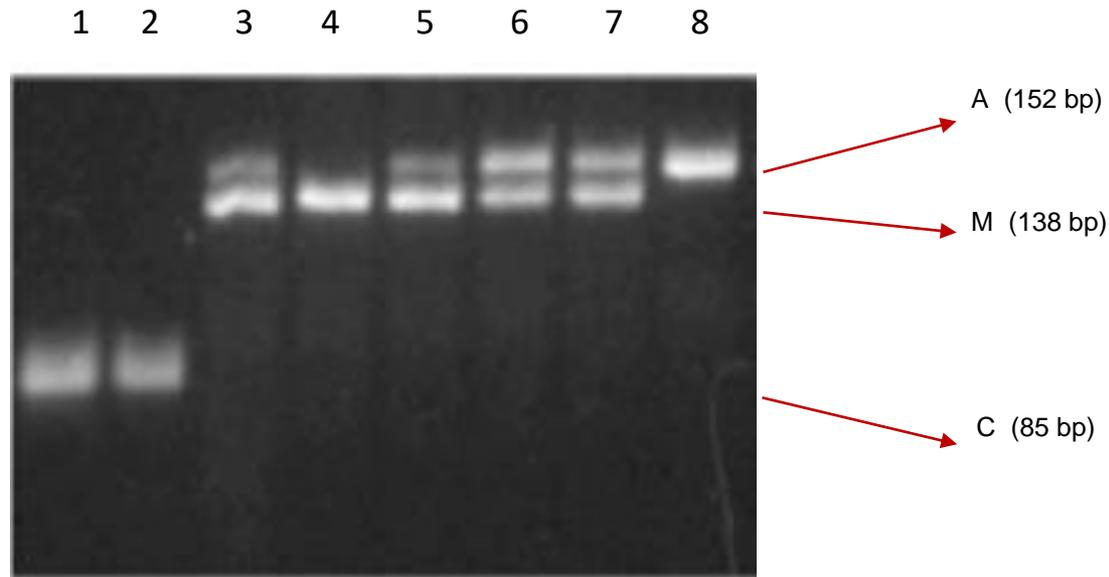


Sequenziamento  
Sanger per  
confermare i prodotti  
amplificati



# Salvaguardia *A. mellifera ligustica*

## DNA mitocondriale

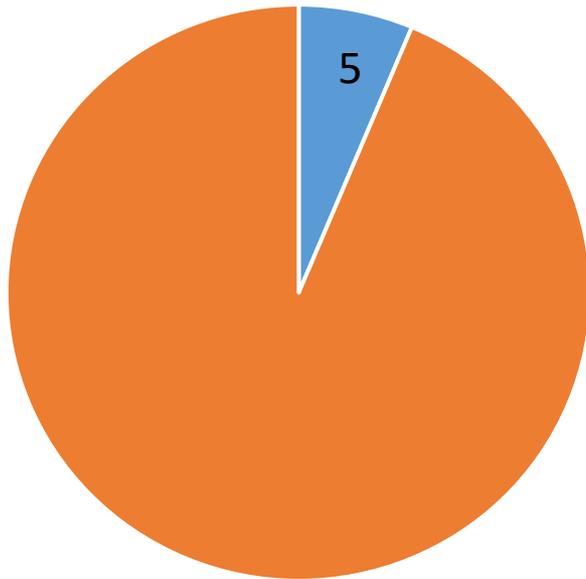


ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

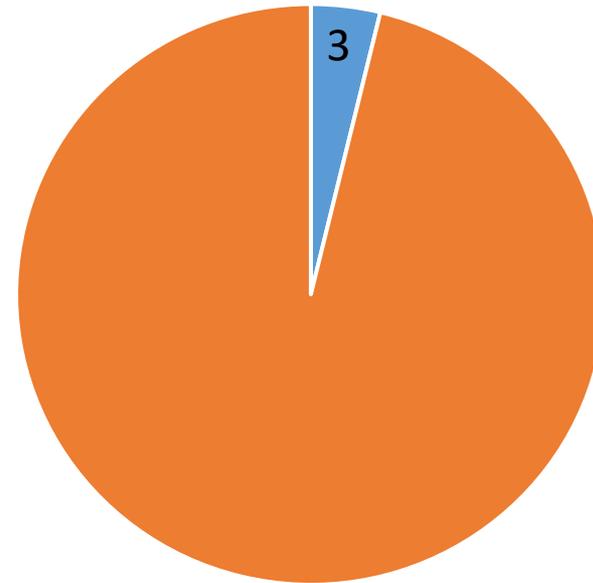
## DNA mitocondriale

Miele da favo (n. 80)

1 ape per famiglia (n. 80)



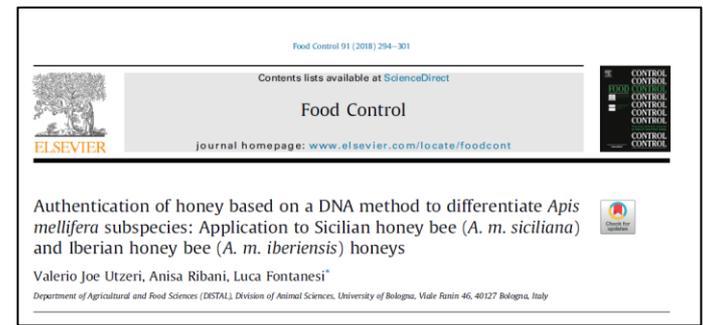
■ A+C+M ■ C



■ A/C/M ■ C

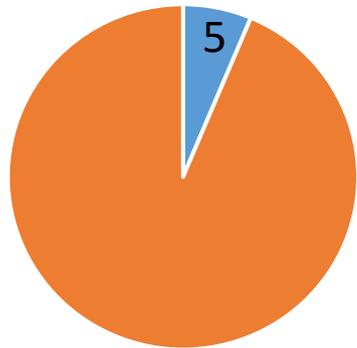


# Salvaguardia *A. mellifera ligustica*



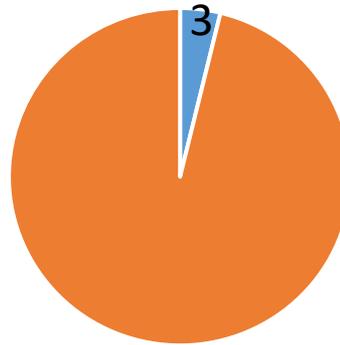
## DNA mitocondriale

Miele da favo (n. 80)



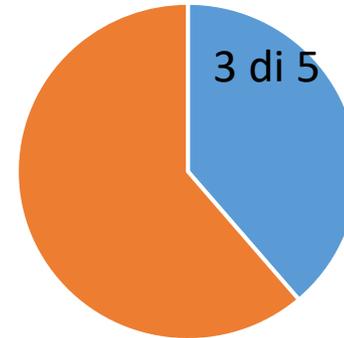
■ A+C+M ■ C

1 ape per famiglia (n. 80)



■ A/C/M ■ C

Da analisi morfometriche



■ Ibridi ■ A. m. ligustica



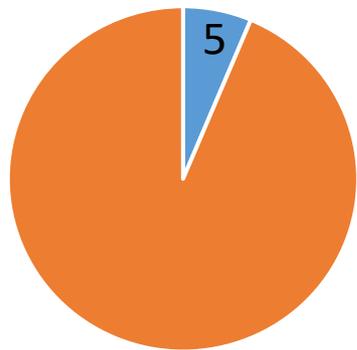
ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# Salvaguardia *A. mellifera ligustica*



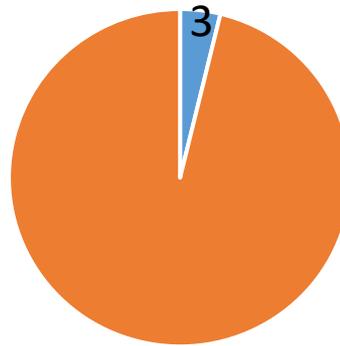
## DNA mitocondriale

Miele da favo (n. 80)



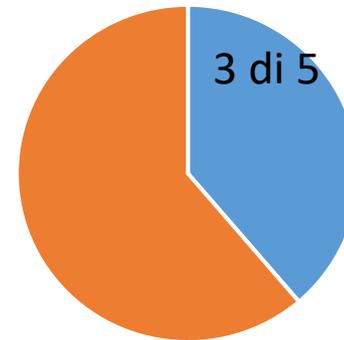
■ A+C+M ■ C

1 ape per famiglia (n. 80)



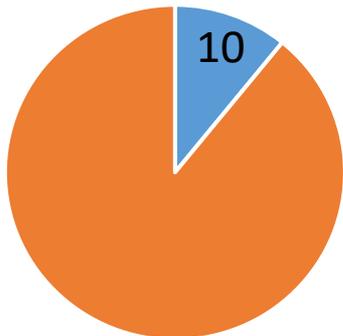
■ A/C/M ■ C

Da analisi morfometriche



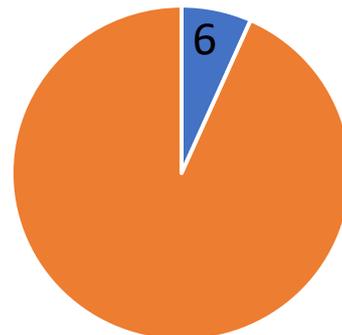
■ Ibridi ■ A. m. ligustica

Miele da favo (n. 92)



■ A+C+M ■ C

1 ape per famiglia (n. 90)



■ A/C/M ■ C



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



ALMA MATER STUDIORUM • UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI



## Lettera di comunicazione dei risultati agli apicoltori

Indirizzo

Oggetto: Comunicazione dei risultati delle analisi effettuate nell'ambito del progetto BEE-RER

Egr. xxxxxx,

Nel ringraziarla per la collaborazione e per la disponibilità mostrata nell'ambito del progetto BEE-RER, con la presente le vorrei comunicare i risultati delle analisi effettuate sui campioni di api e favi che ci ha gentilmente fornito.

Identificativo del campione o matricola	Analisi morfometrica delle api	Analisi del DNA mitocondriale delle api effettuata sul DNA estratto da favo	Analisi del DNA mitocondriale delle api effettuata sul DNA estratto da ape

### Commento tecnico

Per quanto riguarda l'analisi morfometrica, si riporta la dicitura *Apis mellifera ligustica* quando il grado di rispondenza derivato dall'analisi è almeno pari alla soglia minima del 90%. Nel caso in cui il livello di rispondenza sia inferiore, si riporta la dicitura "ibrido". Le diciture sono definite sulla base dei risultati delle analisi effettuate presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana.

Per quanto riguarda l'analisi del DNA mitocondriale, si riportano le indicazioni delle tre linee genetiche principali: A, C ed M. La linea C è compatibile con la sottospecie ligustica. La linea M potrebbe essere compatibile con la sottospecie ligustica, ma servono ulteriori analisi per verificare il mitotipo preciso. La linea A non è compatibile con la sottospecie ligustica. Nel caso in cui sia indicata la dicitura C+ come risultato dell'analisi del DNA estratto da favo, si intende che oltre alla linea C, le analisi hanno evidenziato la presenza di almeno un'altra linea genetica.

Per alcuni campioni, non è stato possibile ottenere risultati attendibili, causa i problemi di conservazione e spedizione del materiale nel periodo COVID-19. Ci scusiamo per l'inconveniente.

Rimango a completa disposizione per ogni eventuale chiarimento.

Nel ringraziarla ancora per la collaborazione, le porgo i miei più cordiali saluti.

Bologna, 30 Luglio 2020

Luca Fontanesi

Prof. Luca Fontanesi,  
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari  
Viale Fanin 46, 40127 Bologna, Italy  
Tel: +39 051 2096535 – Cell: +39 335 1798857  
Email: luca.fontanesi@unibo.it



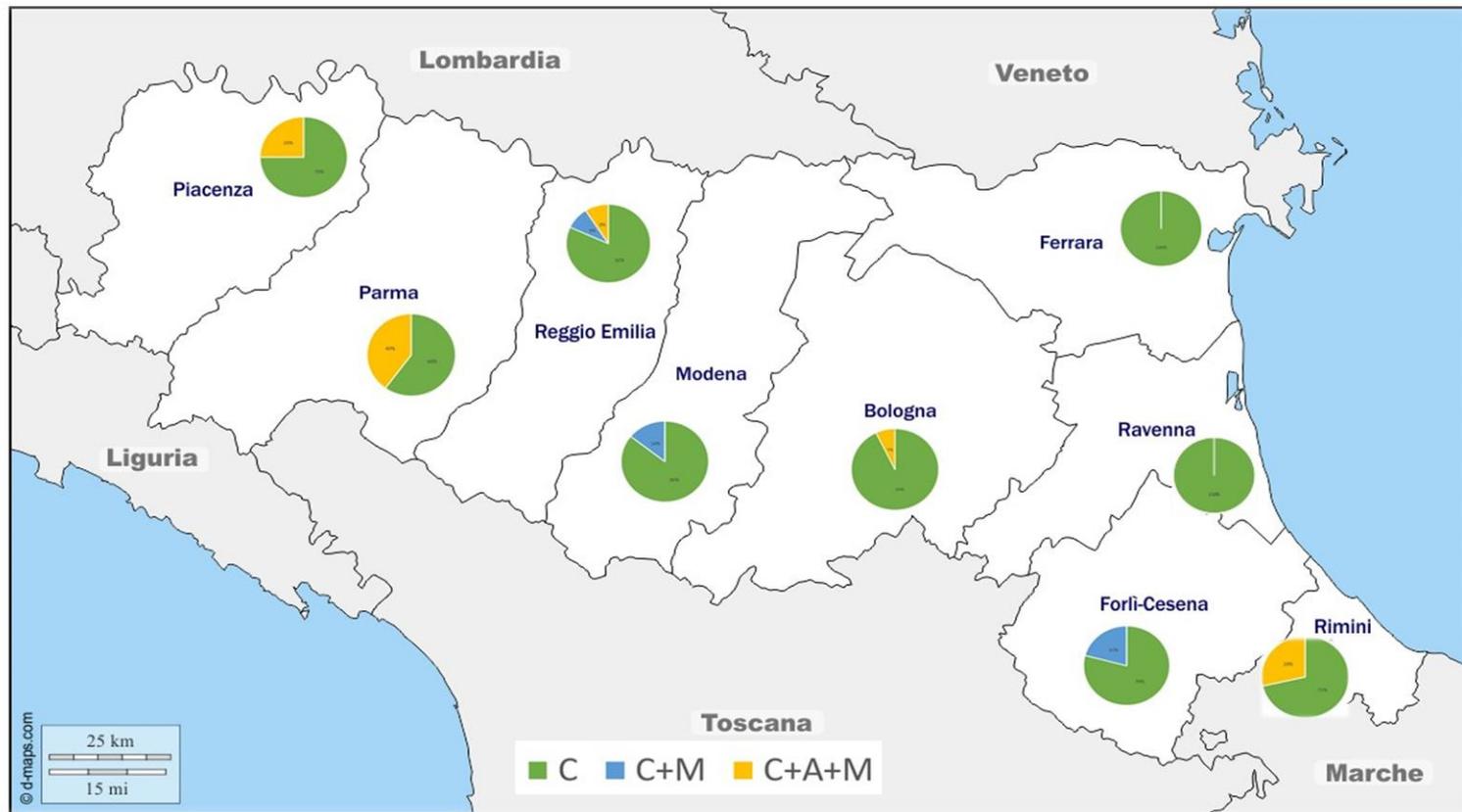
ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# Salvaguardia *A. mellifera ligustica*

- 1) Agganciare l'analisi morfometrica delle api all'analisi del DNA delle api e del miele (mtDNA)
- 2) Miglioramento della mappatura della distribuzione delle linee mitocondriali nella regione (mediante analisi del DNA del miele)**
- 3) Messa a punto preliminare di un possibile metodo per l'identificazione della sottospecie mediante analisi del DNA nucleare direttamente da miele



# Salvaguardia *A. mellifera ligustica*



Analisi mtDNA su 120 campioni di miele (vasetti) dalla Regione Emilia-Romagna



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# Salvaguardia *A. mellifera ligustica*

- 1) Agganciare l'analisi morfometrica delle api all'analisi del DNA delle api e del miele (mtDNA)
- 2) Miglioramento della mappatura della distribuzione delle linee mitocondriali nella regione (mediante analisi del DNA del miele)
- 3) Messa a punto preliminare di un possibile metodo per l'identificazione della sottospecie mediante analisi del DNA nucleare direttamente da miele**



# Salvaguardia *A. mellifera ligustica*

**SCIENTIFIC  
REPORTS**

natureresearch

 Check for updates

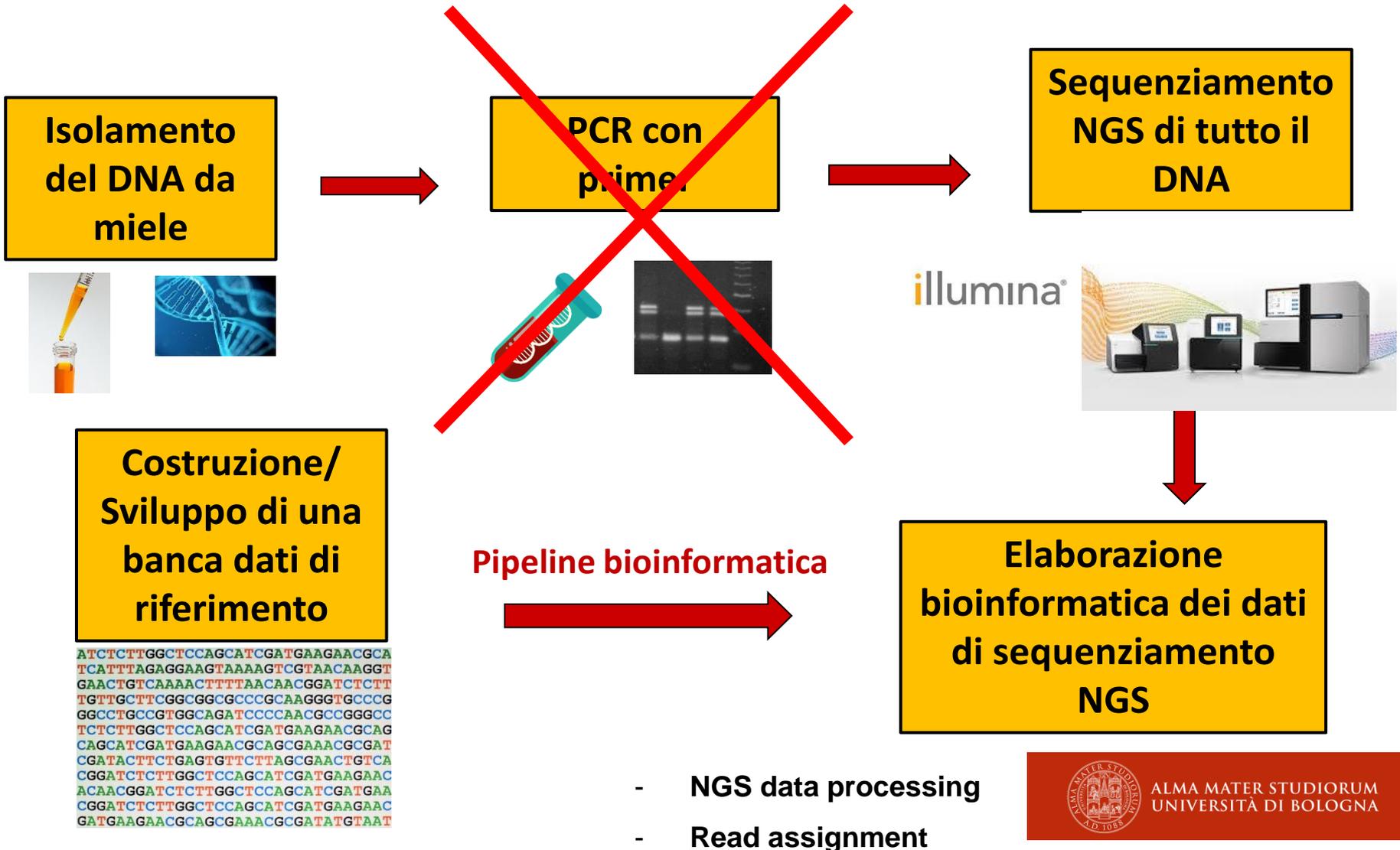
**OPEN** Shotgun sequencing of honey DNA  
can describe honey bee derived  
environmental signatures and the  
honey bee hologenome complexity

Samuele Bovo<sup>1</sup>, Valerio Joe Utzeri<sup>1</sup>, Anisa Ribani<sup>1</sup>, Riccardo Cabbri<sup>2</sup> & Luca Fontanesi<sup>1</sup> 



# Salvaguardia *A. mellifera ligustica*

## Sequenziamento shotgun



# Salvanguardia *A. mellifera ligustica*

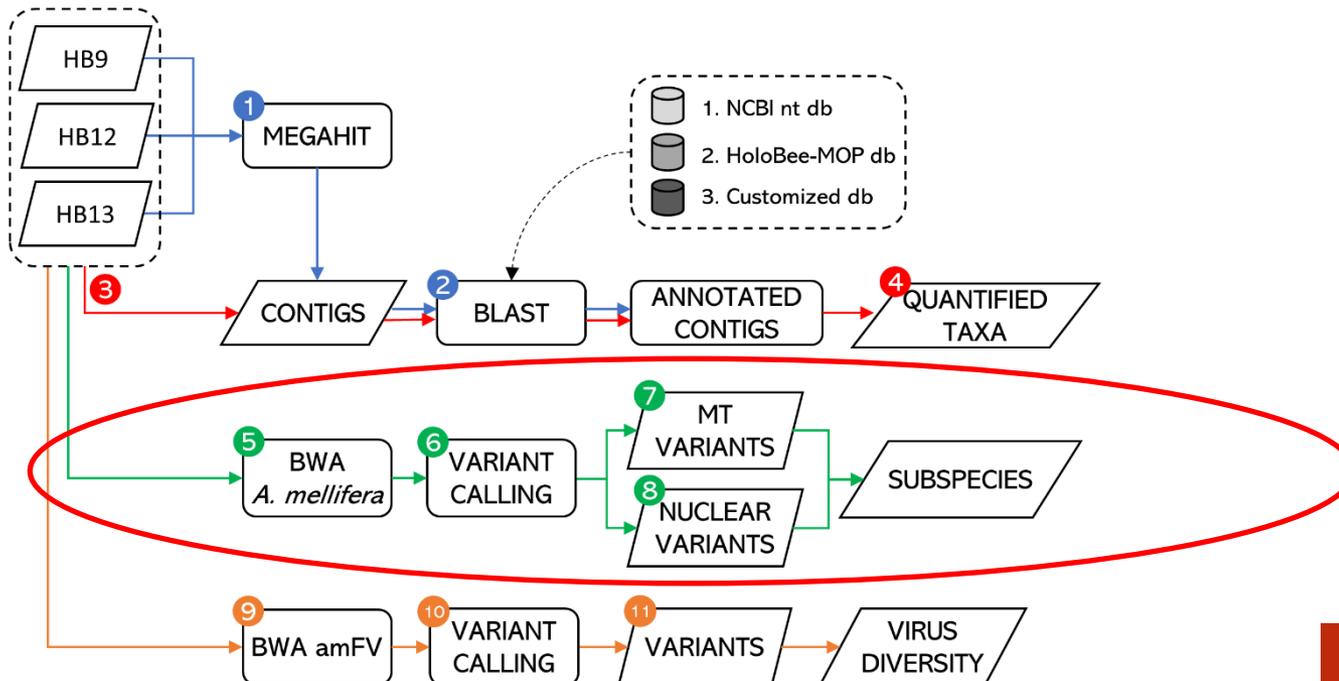
SCIENTIFIC  
REPORTS

nature research

Check for updates

OPEN Shotgun sequencing of honey DNA can describe honey bee derived environmental signatures and the honey bee hologenome complexity

Samuele Bovo<sup>1</sup>, Valerio Joe Utzeri<sup>1</sup>, Anisa Ribani<sup>1</sup>, Riccardo Cabbri<sup>2</sup> & Luca Fontanesi<sup>1</sup>✉



# Salvaguardia *A. mellifera ligustica*

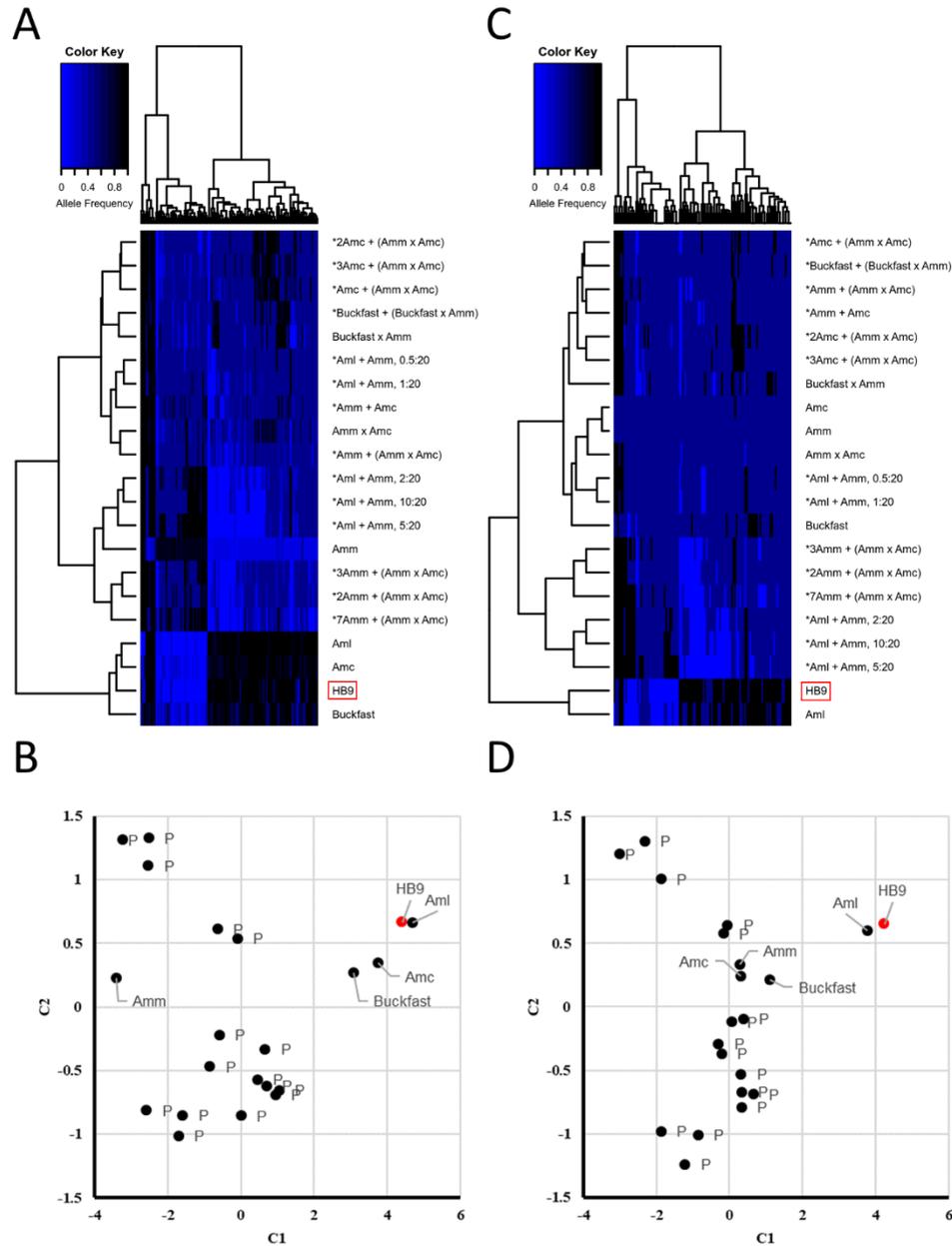
Distanza Euclidea, basata su 106 SNP, tra il campione di miele HB9 e diverse popolazioni o informazioni genomiche di *Apis mellifera* populations/pools

Population/pool <sup>1</sup>	D <sub>AF</sub> <sup>2</sup>	D <sub>AF-0.5</sub> <sup>3</sup>
*2Amc + (Amm x Amc)	4.38	4.53
*2Amm + (Amm x Amc)	6.42	5.72
*3Amc + (Amm x Amc)	4.20	4.66
*3Amm + (Amm x Amc)	6.58	6.08
*7Amm + (Amm x Amc)	7.35	6.63
Amc	1.93	4.61
*Amc + (Amm x Amc)	4.47	4.64
Aml	1.89	2.92
*Aml + Amm, 0.5:20	4.90	4.77
*Aml + Amm, 1:20	5.39	4.90
*Aml + Amm, 2:20	7.16	6.38
*Aml + Amm, 5:20	7.90	7.57
*Aml + Amm, 10:20	7.21	6.82
Amm	8.15	4.64
*Amm + Amc	5.38	4.90
*Amm + (Amm x Amc)	5.69	5.07
Buckfast	2.69	4.30
*Buckfast + (Buckfa	4.36	4.44
Amm x Amc	5.03	4.77
Buckfast x Amm	4.89	4.90

# Salvaguardia *A. mellifera ligustica*

OPEN Shotgun sequencing of honey DNA can describe honey bee derived environmental signatures and the honey bee hologenome complexity

Samuele Bovo<sup>1</sup>, Valerio Joe Utzeri<sup>1</sup>, Anisa Ribani<sup>1</sup>, Riccardo Cabbi<sup>1</sup> & Luca Fontana<sup>1\*</sup>



# Gli obiettivi di BEE-RER

- 1) **Salvaguardia *A. mellifera ligustica***  
(biodiversità – Legge Regionale)
- 2) **Origine botanica del miele**  
(autenticazione – Frodi)
- 3) **Patogeni/sanità delle api e delle produzioni**  
(monitoraggio – epidemiologia)



# Origine botanica del miele



# Origine botanica 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

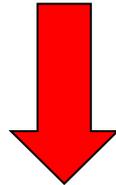
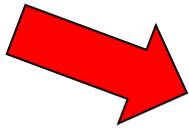
<sup>b</sup> Department of Animal Science, Iowa State University, 2255 Kildee Hall, 50011 Ames, Iowa, USA

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

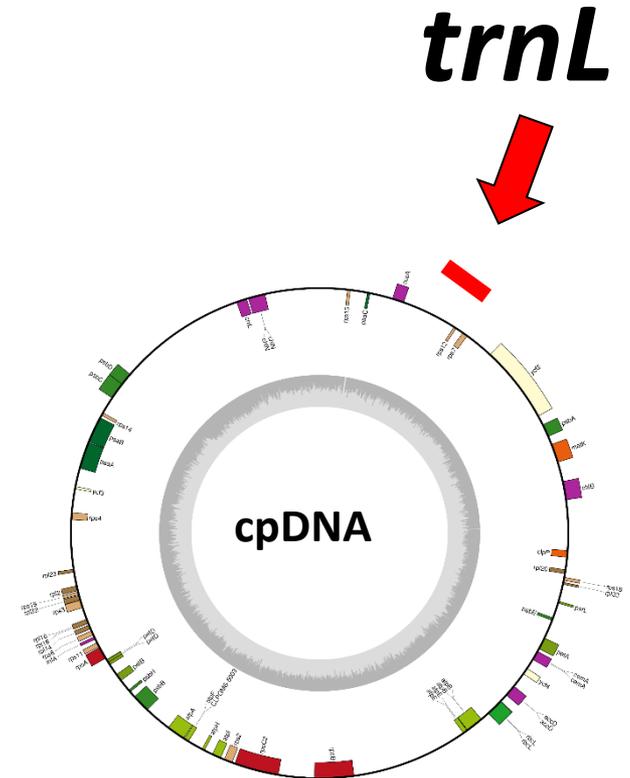
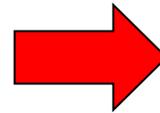


ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

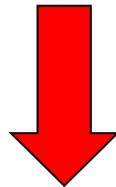
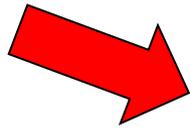
# Origine botanica del miele



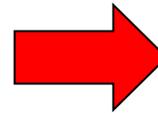
**DNA delle piante  
(DNA cloroplastico)**



# Origine botanica del miele



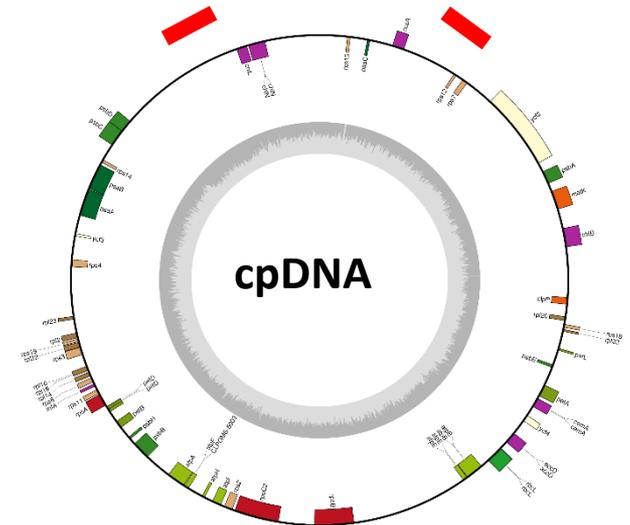
**DNA delle piante  
(DNA cloroplastico)**



*rbcl*



*trnL*



# Origine botanica del miele

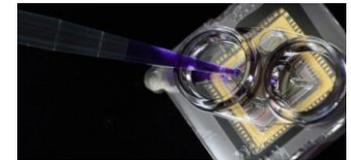
Isolamento  
del DNA da  
miele



PCR  
con primer  
universali



Sequenziamento  
NGS



Database di  
riferimento con  
sequenze della  
regione target



Elaborazione  
bioinformatica dei  
dati derivati dal  
sequenziamento NGS

```
ATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAACGCA  
TCATTTAGAGGAAGTAAAAAGTCGTAACAAGGT  
GAACTGTCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTT  
TGTTCCTCGGCGGGCGCCCGCAAGGTGCCCCG  
GGCCTGCCGTGGCAGATCCCCAACGCCGGGCC  
TCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAACGCAG  
CAGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGAT  
CGATACCTCTGAGTGTCTTAGCGAATGTCA  
CGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAAC  
ACAACGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAA  
CGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAAC  
GATGAAGAACGCAGCGAAACCGATATGTAAT
```

- NGS data processing
- Read assignment



# Origine botanica del miele



## Obiettivo

- Correlare i dati melissopalnologici con l'analisi del DNA del miele
- Aumentare le informazioni della banca dati genomica



# Origine botanica del miele



14 campioni di miele

Forniti da:

- Osservatorio Nazionale Miele
- Lucia Piana

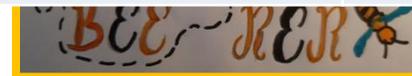


# Origine botanica del miele



## Mieli analizzati

Numero miele	Analisi melissopalnologica	Provincia
1	Indaco bastardo	Parma
2	Erba medica	Piacenza
3	Indaco bastardo	Piacenza
4	Coriandolo	Bologna
5	Coriandolo	Forlì - Cesena
6	Indaco bastardo	Parma
7	Carota	Bologna
8	Erba medica	Parma
9	Lavanda	Rimini
10	Coriandolo	Rimini
11	Amorpha fruticosa	Parma
12	Ombrellifere	Forlì - Cesena
13	Edera	Forlì - Cesena
14	Coriandolo	Rimini
15	Miele sospetto	Italia
16	Miele sospetto	Croazia

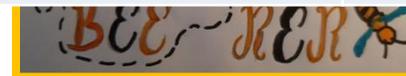


# Origine botanica del miele



## Mieli analizzati

Numero miele	Analisi melissopalinoologica	Provincia
1	Indaco bastardo	Parma
2	Erba medica	Piacenza
3	Indaco bastardo	Piacenza
4	Coriandolo	Bologna
5	Coriandolo	Forlì - Cesena
6	Indaco bastardo	Parma
7	Carota	Bologna
8	Erba medica	Parma
9	Lavanda	Rimini
10	Coriandolo	Rimini
11	Amorpha fruticosa	Parma
12	Ombrellifere	Forlì - Cesena
13	Edera	Forlì - Cesena
14	Coriandolo	Rimini
15	Miele sospetto	Italia
16	Miele sospetto/Salvia	Croazia



# Origine botanica del miele

## Miele di lavanda



Numero di reads (trnL)	Gruppo botanico	Numero di reads (rbcl)	Gruppo botanico
2490	Anacardiaceae	7648	Lamiales
2114	Lamiaceae	6532	Shorea zeylanica
1871	Cistus laurifolius	6139	Pistacia
1065	Rhamnus	2882	Sapindales
899	Fagaceae	772	mimosoid clade
695	Pyrus	424	Asteraceae
532	Ericaceae	395	Berchemiella
474	mimosoid clade	264	Amygdaloideae
429	Saliceae	222	genistoids sensu lato
384	Asphodelus	194	lamiids
282	Asphodelus albus	163	Lamiaceae
219	Oxalis	152	Eutrema
166	Nelsonia sp. Harris 5722	116	malvids
165	Pentapetalae	115	Oxalis
140	Castanea	107	Pentapetalae
138	Erica carnea	103	Mesangiospermae
111	Lamiales	95	Ericaceae
156	Altri gruppi botanici	1475	Altri gruppi botanici
12330	Totale	27798	Totale

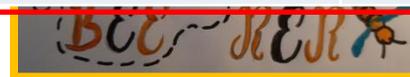


# Origine botanica del miele



## Mieli analizzati

Numero miele	Analisi melissopalnologica	Provincia
1	Indaco bastardo	Parma
2	Erba medica	Piacenza
3	Indaco bastardo	Piacenza
4	Coriandolo	Bologna
5	Coriandolo	Forlì - Cesena
6	Indaco bastardo	Parma
7	Carota	Bologna
8	Erba medica	Parma
9	Lavanda	Rimini
10	Coriandolo	Rimini
11	Amorpha fruticosa	Parma
12	Ombrellifere	Forlì - Cesena
13	Edera	Forlì - Cesena
14	Coriandolo	Rimini
15	Miele sospetto	Italia
16	Miele sospetto/Salvia	Croazia



# Origine botanica del miele

## Miele sospetto (salvia)



Numero di reads (trnL)	Gruppo botanico	Numero di reads (rbCL)	Gruppo botanico
14487	Acer	15119	Acer
2644	Umtiza clade	11204	Amorpha
2463	Amorpha	2892	Caesalpinioideae
1581	Vitaceae	2828	Adenanthera
1067	Chelidonium majus	1776	Vitis
947	Acereae	1614	Papaveroideae
849	Pentapetalae	1354	Asteraceae
577	Asteraceae	1343	Crepis tectorum
535	Robinia	1246	Papaver rhoeas
497	Papaveroideae	1114	Brassica rapa subsp. oleifera
460	Robinieae	1012	Embryophyta



# Gli obiettivi di BEE-RER

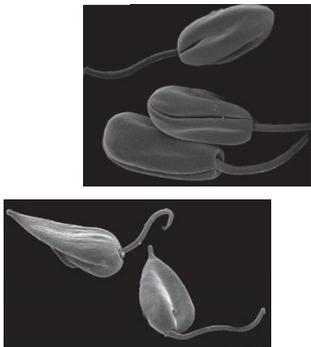
- 1) **Salvaguardia *A. mellifera ligustica***  
(biodiversità – Legge Regionale)
- 2) **Origine botanica del miele**  
(autenticazione – Frodi)
- 3) **Patogeni/sanità delle api e delle produzioni**  
(monitoraggio – epidemiologia)



# Patogeni/sanità delle api e delle produzioni

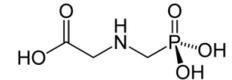
## Con vari disegni sperimentali

Analisi di alcuni patogeni

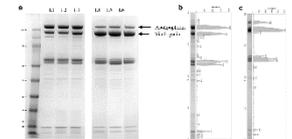


```
ATTTATATAGTTTAAAAAACCATTATATTTTCAA
TATAAATAATTAATTTAATTTATAAATATAAT
TAAGTCATTTAATTTAATAACAATTAATAAC
CTAAAATTATTTATTAATAAAGAAATATCAATAA
ATAAAGCTTCTAACTTAACTCTAGATTCGTAAAT
AATCTATATTTCTTATATATAATTAAATAAATA
TTAATTTTAAAATAAATTATATAATAAGCTAAAT
AAAGCTAACAGGTTTCATACCCTGTCGATAAATTAA
```

Analisi di contaminanti nel miele e nelle api



Analisi dell'emolinfa delle api



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# Patogeni/sanità delle api e delle produzioni

- 1) Campioni di miele (favi) e api da famiglie con problemi di spopolamento non attribuibili ad avvelenamento o altri problemi sanitari evidenti
- 2) Campioni di miele (favi) e api da famiglie senza evidenti problemi di spopolamento
- 3) Messa a punto metodi per identificare Tripanosomidi
- 4) Analisi della distribuzione di tripanosomidi negli apiari della regione



- 1) Campioni di miele (favi) e api da famiglie con problemi di spopolamento non attribuibili ad avvelenamento o altri problemi sanitari evidenti**
- 2) Campioni di miele (favi) e api da famiglie senza evidenti problemi di spopolamento
- 3) Messa a punto metodi per identificare Tripanosomidi
- 4) Analisi della distribuzione di tripanosomidi negli apiari della regione

# Patogeni/sanità delle api e delle produzioni



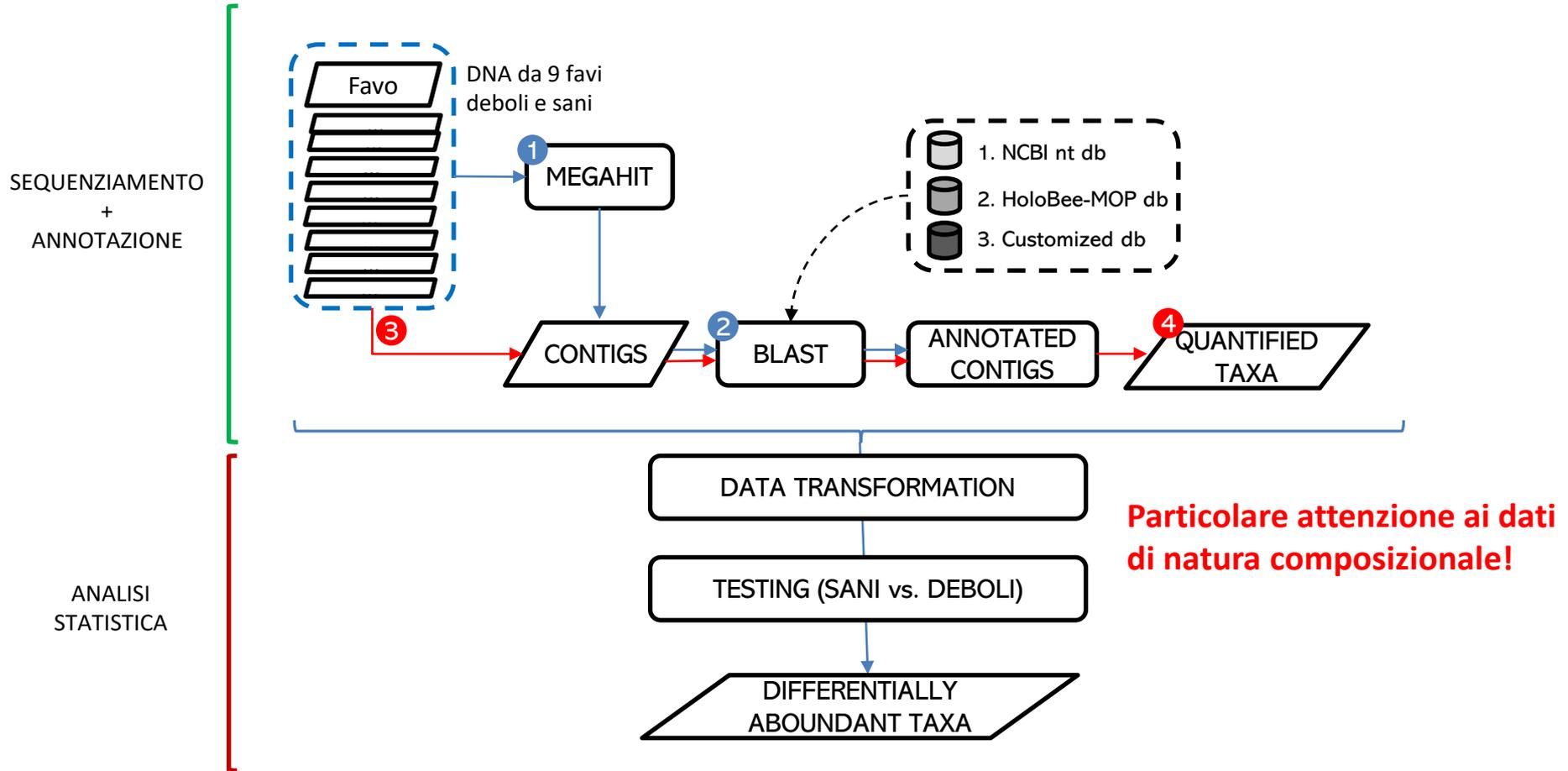
Campioni di miele (favi) e api da famiglie con problemi di spopolamento non attribuibili ad avvelenamento o altri problemi sanitari evidenti

- a) Analisi basate sul disegno sperimentale di *case and control*
- 6 famiglie con problemi (case) e 3 famiglie senza problemi (control);
  - Famiglie dallo stesso apiario.
- b) Da altre famiglie con problemi di spopolamento e normali



# Patogeni/sanità delle api e delle produzioni

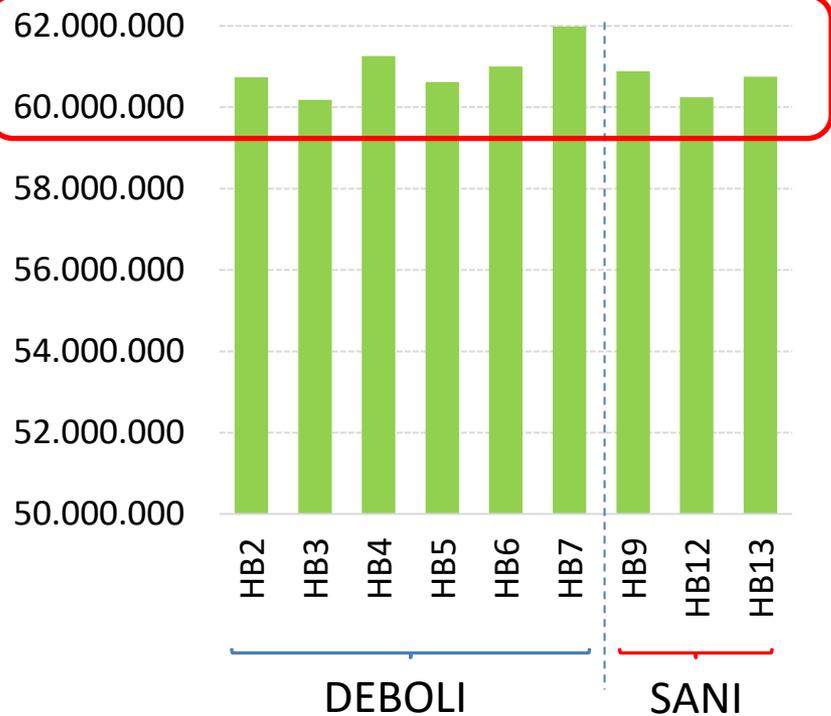
## Data mining: overview



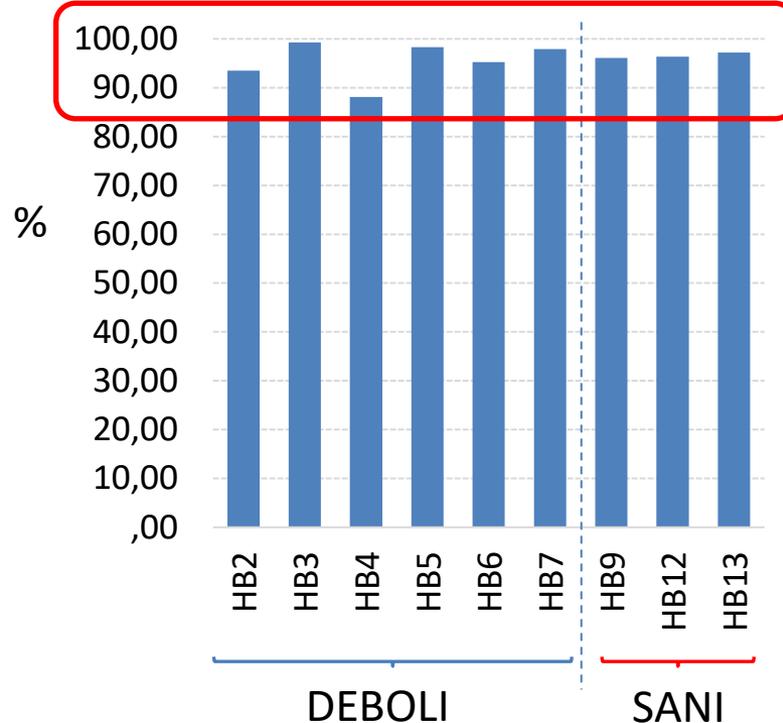
# Patogeni/sanità delle api e delle produzioni

## Sequenziamento e produzione di contigui

Reads sequenziate



Reads mappate su contigui



839,743 CONTIGUI  
ASSEMBLATI



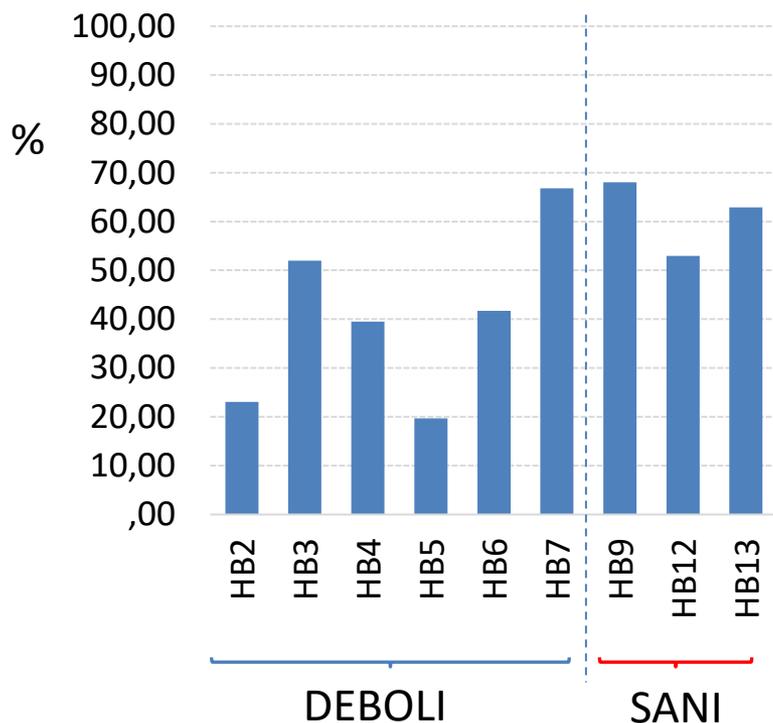
# Patogeni/sanità delle api e delle produzioni

## ANNOTAZIONE DEI CONTIGUI

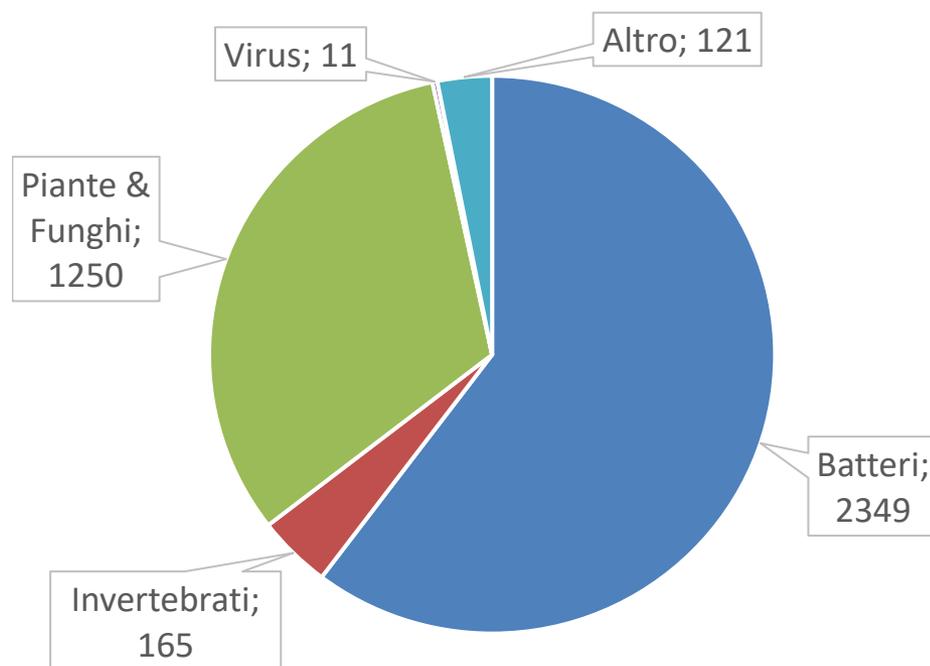
Contigui annotati → 284,211 (~34% dei contigs totali)

Taxa identificati → 3,897

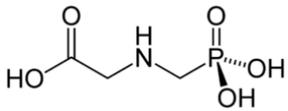
### Reads mappate su contigui ANNOTATI



### No. taxa identificati



## Determinazione del livello di glifosato nel miele



In tutti i mieli analizzati il livello di glifosato era sotto soglia di determinazione

# Patogeni/sanità delle api e delle produzioni

1) Campioni di miele (favi) e api da famiglie con problemi di spopolamento non attribuibili ad avvelenamento o altri problemi sanitari evidenti

**2) Campioni di miele (favi) e api da famiglie senza evidenti problemi di spopolamento**

3) Messa a punto metodi per identificare Tripanosomidi

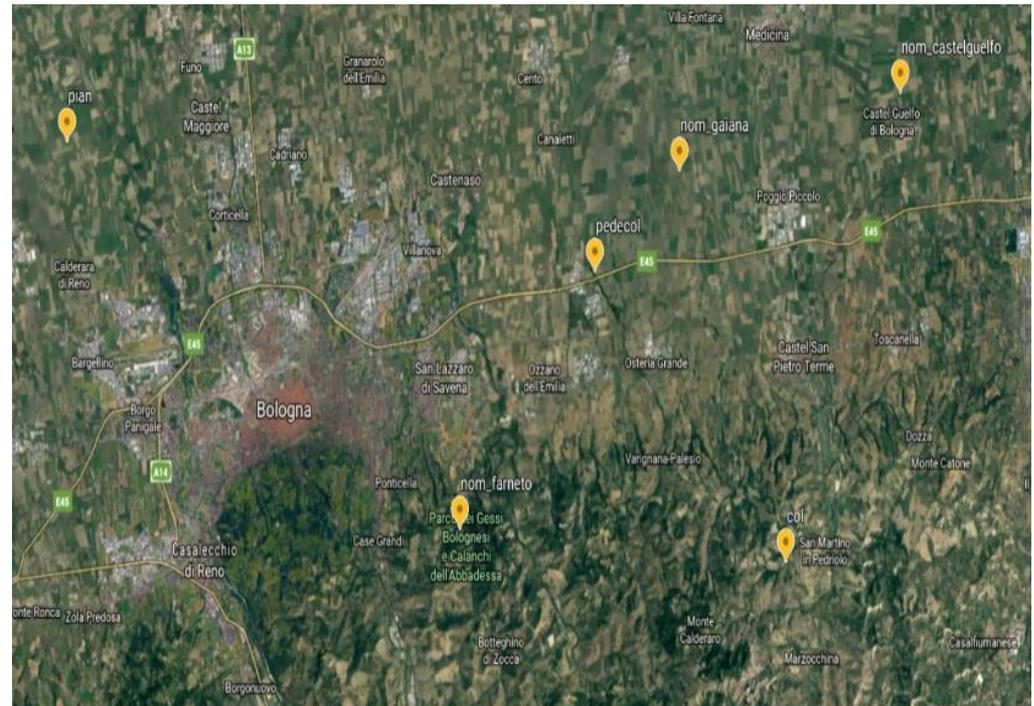
4) Analisi della distribuzione di tripanosomidi negli apiari della regione



# Patogeni/sanità delle api e delle produzioni

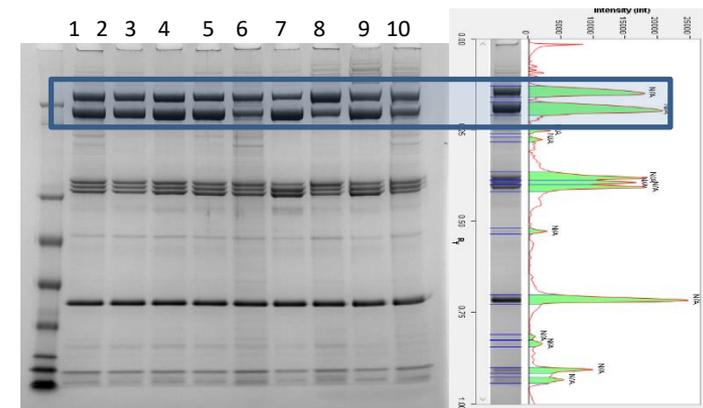
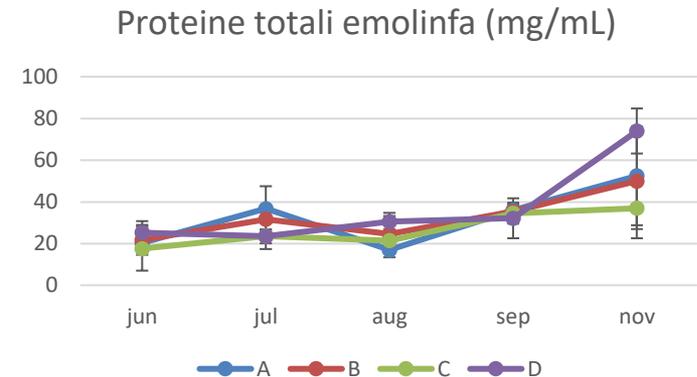
Determinazione di biomarcatori e contaminati per valutare lo stato di salute delle colonie

## Siti di campionamento



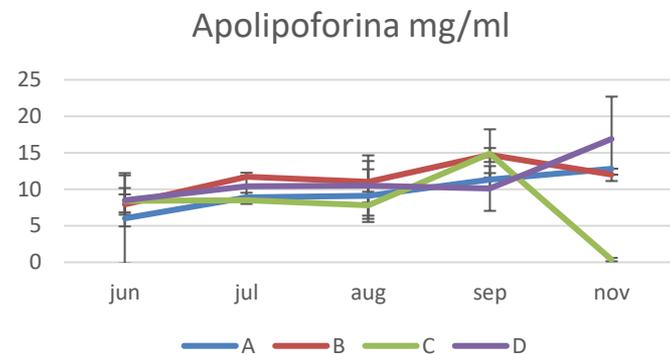
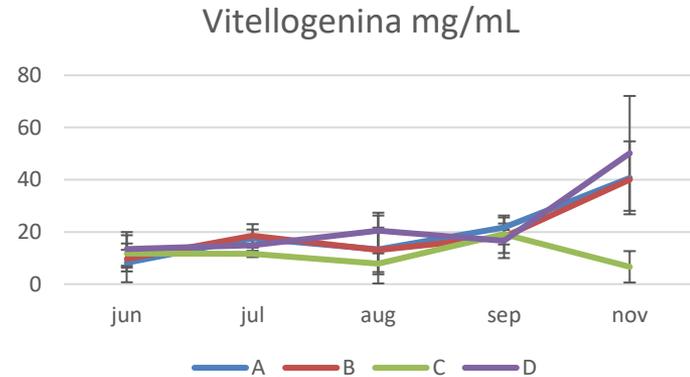
## Proteine totali dell'emolinfa delle api

- A giugno i valori medi erano molto simili nei quattro apiari
- tendenza all'aumento delle concentrazioni in autunno, significativo ( $P < 0,05$ ) per gli apiari A e D.
- Il minor aumento si è verificato per l'apiario C



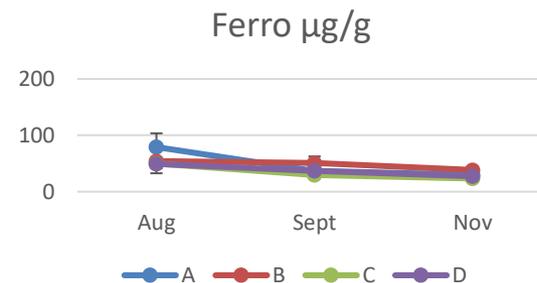
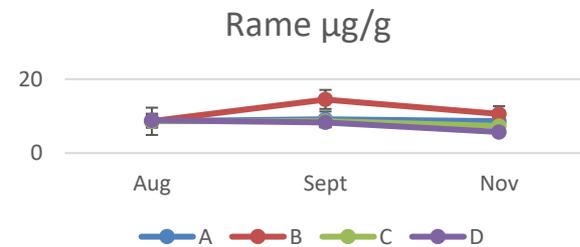
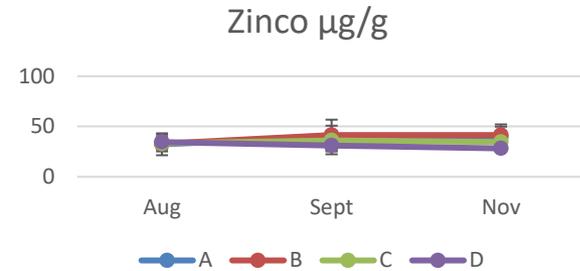
## Apolipoforina e Vitellogenina

- La vitellogenina si conferma come la più abbondante proteina dell'emolinfa, con aumento in autunno, tranne che per apiario C.
- L'apolipoforina è la maggiore lipoproteina circolante negli insetti e la sua concentrazione nell'emolinfa è strettamente correlata con la mobilitazione dei lipidi. Tendenza all'aumento, tranne che nell'apiario C.
- I valori a giugno sono simili tra i 4 apiari, le maggiori differenze si evidenziano a novembre



## Elementi traccia

- A parte il Ferro nell'apiario A, i valori ad agosto sono molto simili.
- L'apiario B, che si trova in prossimità di colture orticole e vigneti accumula maggiori concentrazioni di Rame.
- Tutti gli apiari presentano una diminuzione delle concentrazioni di Ferro a novembre.
- Concentrazioni molto basse per Cd e Pb (inferiori al limite di rilevazione, 0,1  $\mu\text{g/g}$ ).



# Patogeni/sanità delle api e delle produzioni

- 1) Campioni di miele (favi) e api da famiglie con problemi di spopolamento non attribuibili ad avvelenamento o altri problemi sanitari evidenti
- 2) Campioni di miele (favi) e api da famiglie senza evidenti problemi di spopolamento
- 3) Messa a punto metodi per identificare Tripanosomidi**
- 4) Analisi della distribuzione di tripanosomidi negli apiari della regione**



*Lotmaria passim*

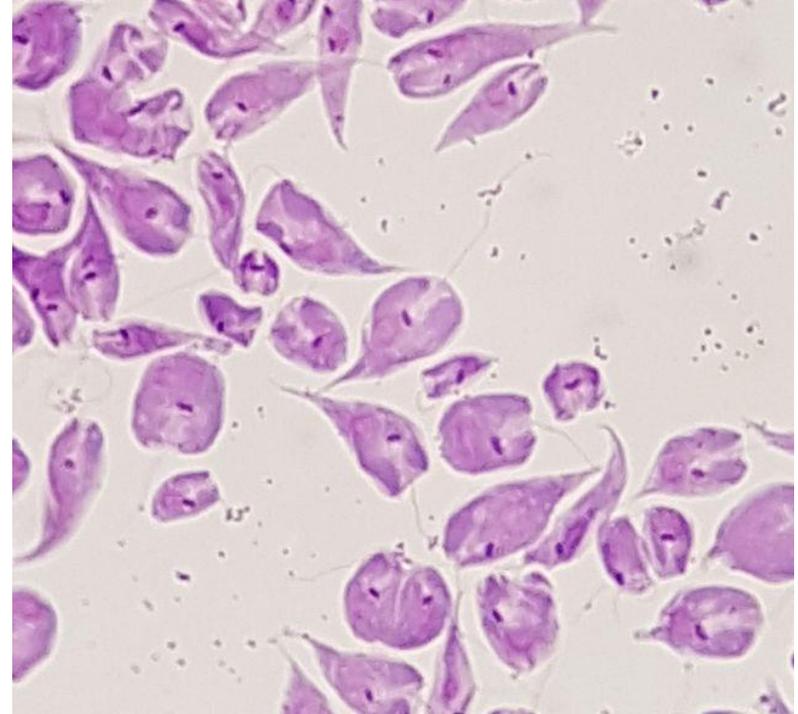
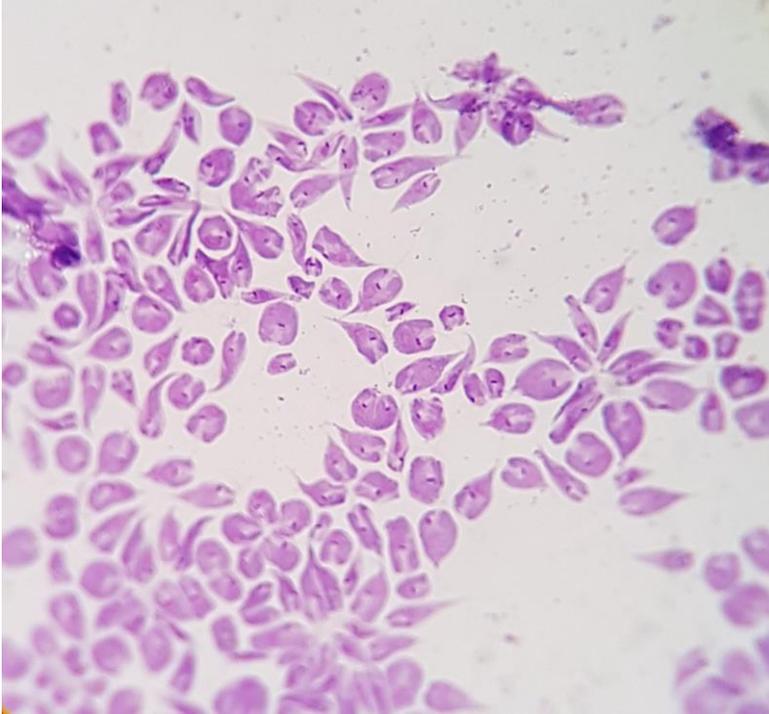


*Crithidia mellificae*



# Patogeni/sanità delle api e delle produzioni

Isolamento da intestino di ape: *Lotmaria passim*



Esame microscopico dopo colorazione di Giemsa 1000X  
Forme allungate promastigoti (predominanti) e forme di transizione

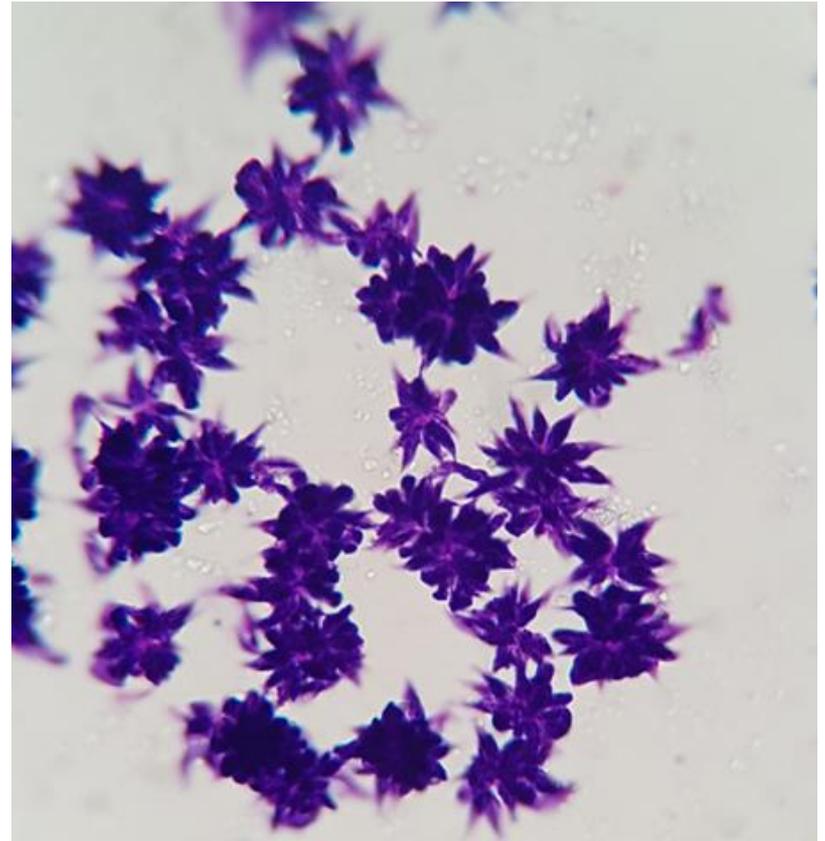


# Patogeni/sanità delle api e delle produzioni

Isolamento da intestino di ape: *Lotmaria passim*



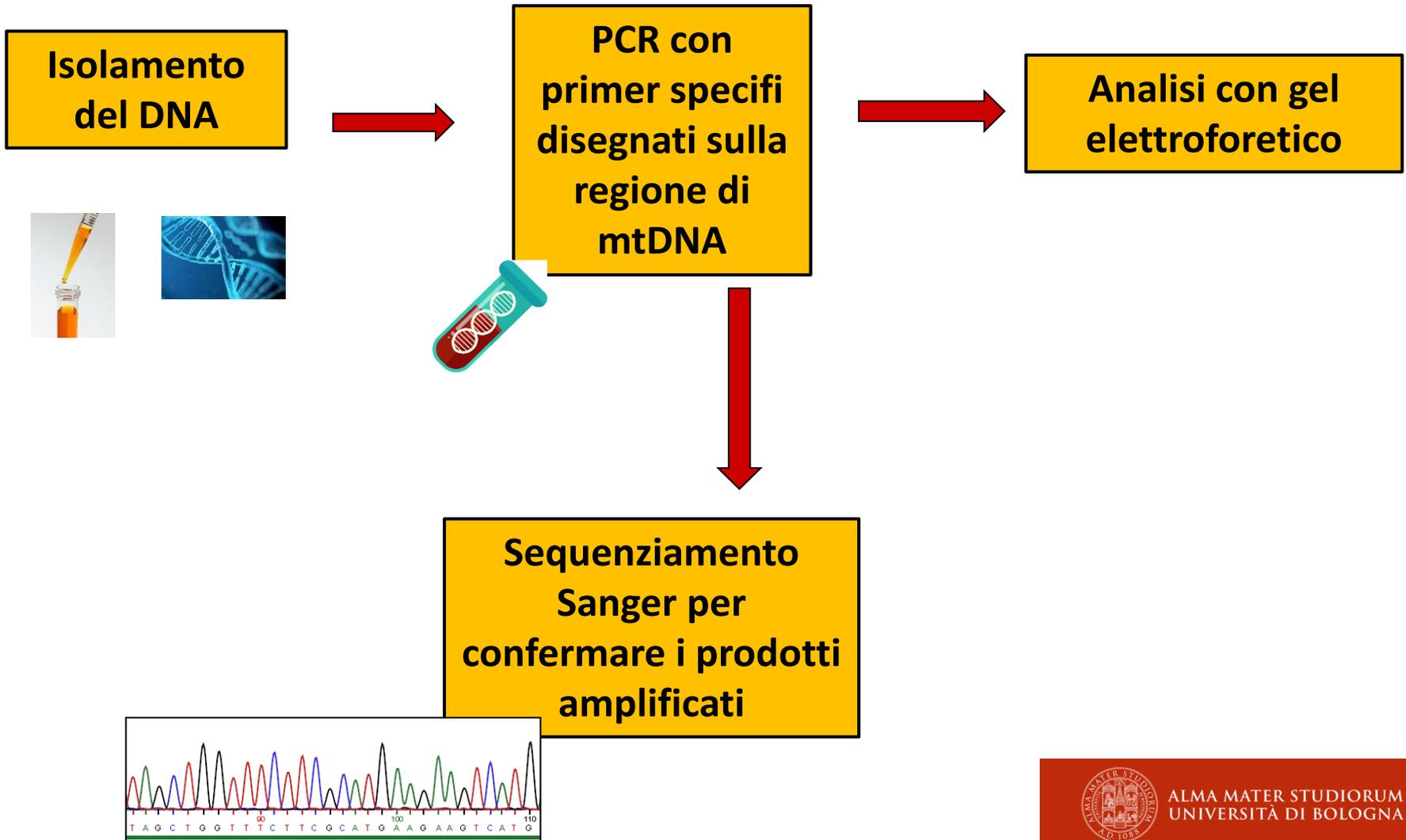
Esame microscopico a fresco 1000X  
Presenza di «rosette»



Esame microscopico dopo colorazione di Giemsa  
1000X Presenza di «rosette»

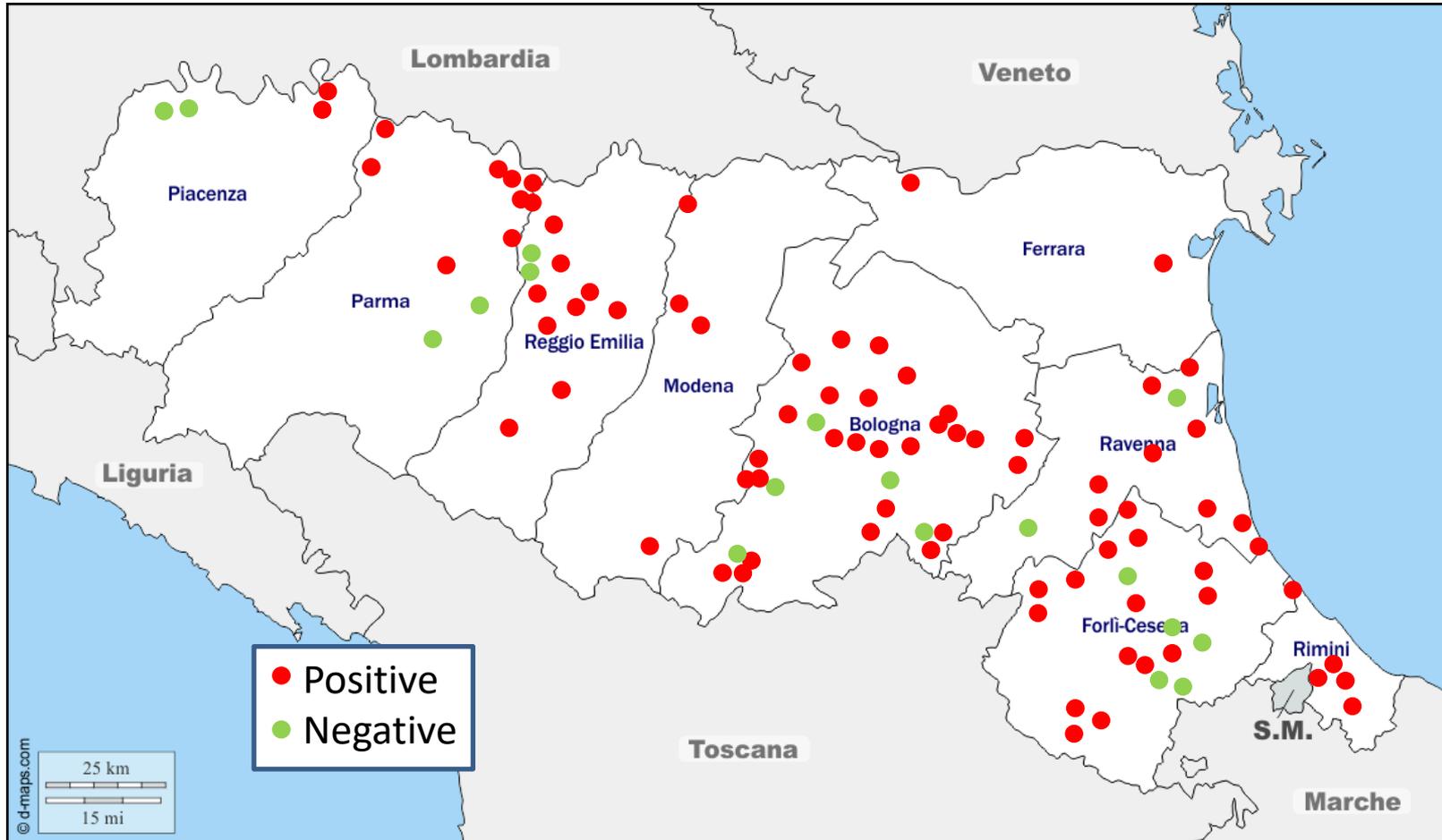


## Identificazione di *Lotmaria passim* nel miele



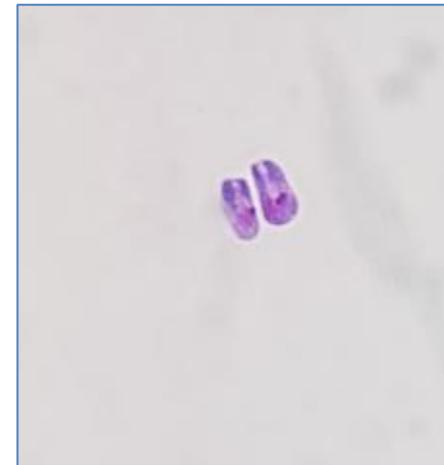
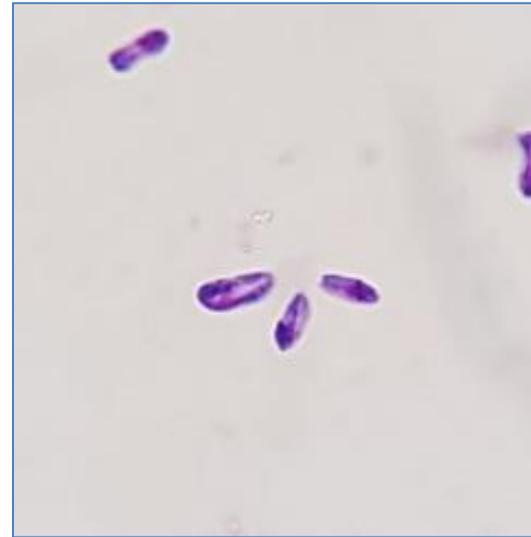
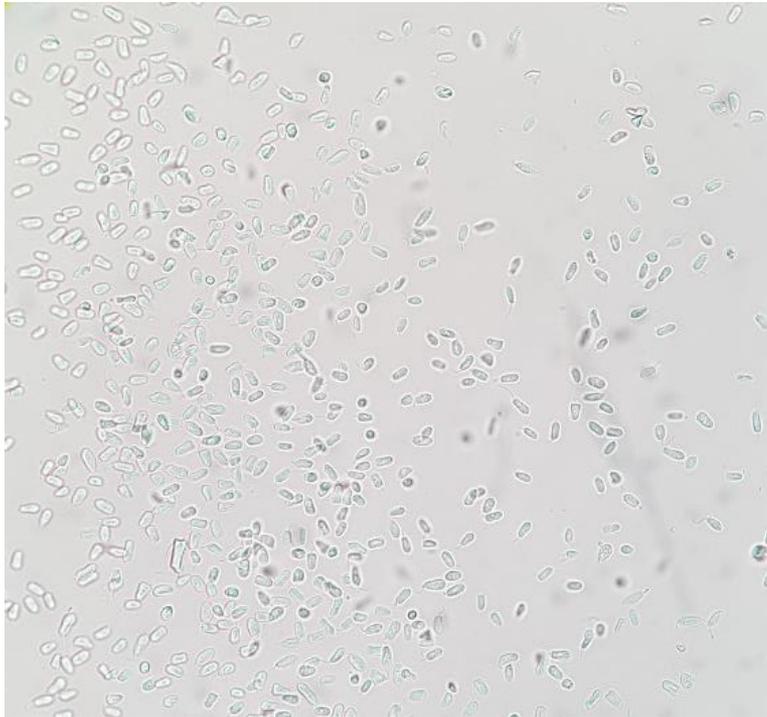
# Patogeni/sanità delle api e delle produzioni

## *Lotmaria passim*



# Patogeni/sanità delle api e delle produzioni

*Crithidia mellifica* ATCC - 30254 1



# Conclusioni

- **BEE-RER** è stato strutturato in diverse azioni per cercare di contribuire alla soluzione di diversi problemi del settore apistico regionale – come da bando
- Abbiamo ottenuto diversi risultati che aprono nuove possibilità ma anche nuovi quesiti
- L'applicazione pratica necessiterà di altre attività e di un lavoro insieme alle Associazioni e organizzazioni apistiche



<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



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

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

Samuele Bovo

Anisa Ribani

Giuseppina Schiavo

Valerio Joe Utzeri

Luca Fontanesi



## Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET)

Gloria Isani

Roberta Galuppi

Giulia Andreani



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



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 2019/2020, sottoprogramma ministeriale Regione Emilia-Romagna, Misura F (DELIBERAZIONE DELL'ASSEMBLEA LEGISLATIVA DELLA REGIONE EMILIA-ROMAGNA 27 LUGLIO 2019, N. 216 – OCM Apicoltura)



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# Ringraziamenti

- L'Osservatorio Nazionale Miele (Alberto Contessi e Giancarlo Naldi)
- Lucia Piana
- L'Associazione Apicoltori Felsinei
- Tutte le Associazioni Apicoltori della Regione
- Molti apicoltori
- Riccardo Cabbri
- L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana



Regione Emilia-Romagna



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

27 Luglio 2020

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



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

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