

Analisi metagenomica di api del territorio italiano ed identificazione botanica del miele monofloreale

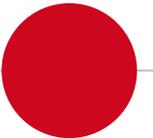
Anna Granato

IZSVE - SCS3 Diagnostica specialistica, Istopatologia ed Entomologia sanitaria

Centro di Referenza nazionale per l'Apicoltura, Laboratorio Nazionale di Riferimento per le malattie delle api

Seconda Giornata dei Centri e dei Laboratori di Referenza Nazionali degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali nell'ottica One Health
«Il mondo è nelle mani di coloro che hanno il coraggio di sognare e di correre il rischio di vivere i propri sogni» (Paulo Coelho)

Roma, 05 Novembre 2024



Introduzione

Microbiota: insieme di tutti i singoli microrganismi (batteri, funghi, protozoi, virus) che convivono con il nostro organismo

Metagenomica: studio della comunità microbica di un microbiota sulla base dell'isolamento e sequenziamento del suo DNA

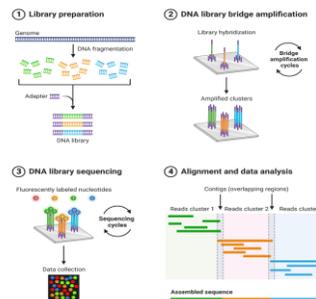
Permette di ottenere informazioni quali- e quantitative della popolazione microbica e al contempo individuare eventuali microrganismi poco noti o sconosciuti

Next Generation Sequencing (NGS): insieme di tecnologie di sequenziamento degli acidi nucleici che hanno in comune la **capacità di sequenziare, in parallelo, milioni di frammenti di DNA**

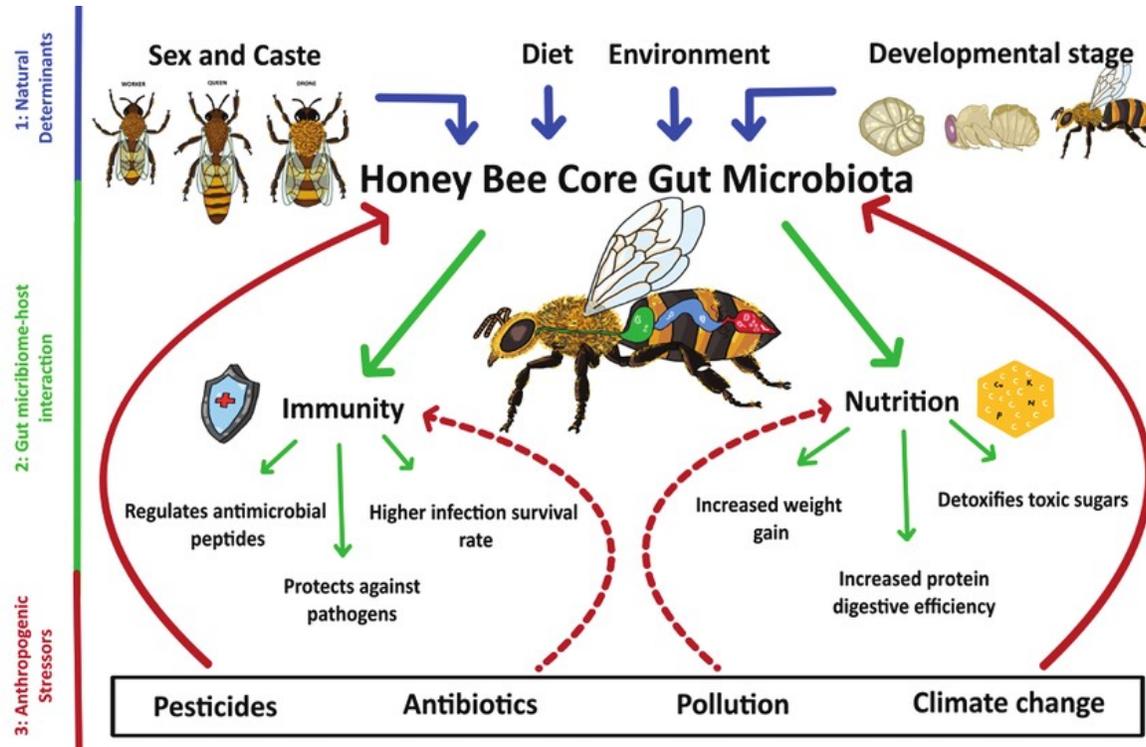
- Possibilità di caratterizzare genomi di grandi dimensioni
- Indagini metagenomiche delle comunità microbiche delle api per rilevare patogeni potenzialmente candidati ad essere associati ad eventi di mortalità
- Analisi del viroma di diversi organismi con scoperta di mutazioni virali e nuovi virus

illumina® NGS:

1. Preparazione libreria di DNA
2. Ibridazione della libreria su flow cell e *bridge amplification*
3. Reazione di sequenziamento con nucleotidi marcati con fluorofori
4. Le sequenze ottenute vengono allineate, analizzate e assemblate

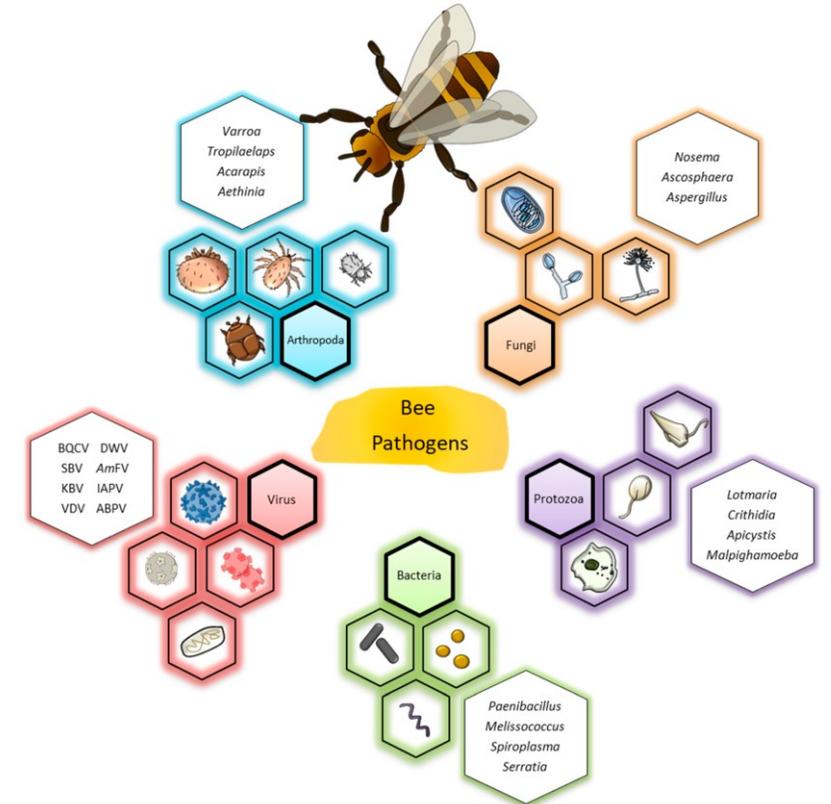


Introduzione



de Beer *et al.*, African Entomology 2023, 31: e14674

Qual è la composizione del microbiota delle api presenti nel nostro territorio?



Lanutti *et al.*, Veterinary Science 2022, 9: 221

Quali altri virus delle api circolano sul nostro territorio oltre a quelli noti?

Materiali e metodi

Scelta e campionamento api da 20 apiari distribuiti sul territorio italiano

Analizzati un pool di 30 api/apiario



Estrazione DNA

Estrazione RNA

CARATTERIZZAZIONE DELLA COMUNITA' BATTERICA

Amplificazione 16s rRNA (regioni V3-V4)

Preparazione librerie

(Illumina Nextera XT)



Sequenziamento delle librerie

MiSeq (Illumina) in 2x300 paired-end

Analisi bioinformatica

DADA2 e Phyloseq (Rstudio)

&
Assegnazione tassonomica

(SILVA database v138)

RILEVAZIONE PATOGENI NOTI

PCR: *Nosema apis*, *Nosema ceranae*,
Lotmaria passim, *Crithidia mellificae*

RT-PCR: virus IAPV e KBV

Real time RT-PCR: virus ABPV, CBPV,
DWV-A/B, SBV, BQCV

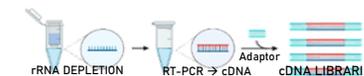


CARATTERIZZAZIONE DELLA COMUNITA' VIRALE

Deplezione rRNA, sintesi cDNA

Preparazione librerie

(Illumina Stranded Total RNA Prep Ligation with Ribo-Zero Plus
+ 86 specific probes for *A. mellifera* rRNA)



Sequenziamento delle librerie

NovaSeq (Illumina) in 150 paired-end

Analisi bioinformatica

FastQC v0.11.2, Scythe v0.991, Sickle v1.33, STAR v2.7.9,
Diamond v0.9.17

&
Assegnazione tassonomica

MEGAN v.6.18.50

Risultati - Apiari sul territorio italiano

Unico campionamento effettuato tra **metà luglio e fine agosto 2021**

3 zone di campionamento:

- **MONTAGNA (5 apiari)**
Valle d'Aosta, Liguria, Prov. Aut. di Trento,
Prov. Aut. di Bolzano, Basilicata
- **COLLINA (8 apiari)**
Piemonte, Emilia Romagna, Friuli Venezia Giulia,
Lazio, Abruzzo, Molise, Sicilia*, Sardegna
- **PIANURA (7 apiari)**
Lombardia, Veneto, Toscana, Campania, Puglia,
Sardegna



5 tipologie di territorio:

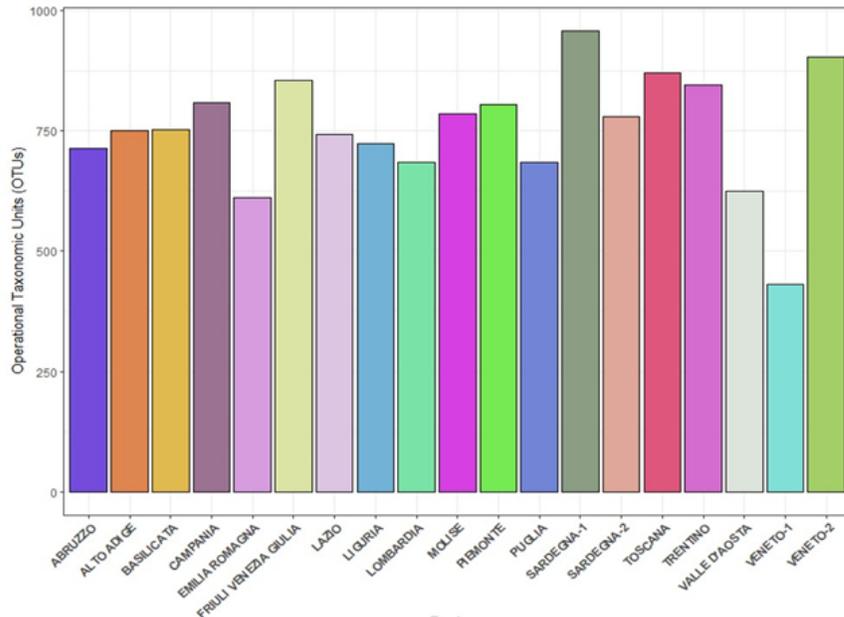
- **NATURALE**
- **AGRICOLO/NATURALE**
- **AGRICOLO**
- **AGRICOLO/URBANO**
- **URBANO**

*N.B. Le api dalla Sicilia sono arrivate quasi completamente scongelate → non idonee all'analisi

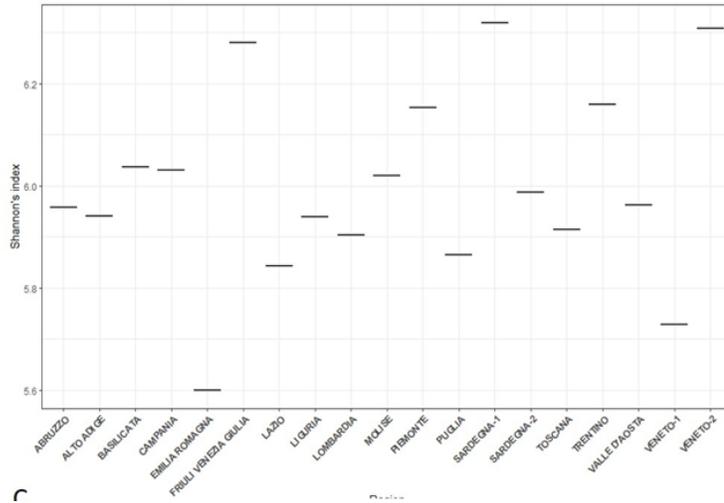
Risultati – Analisi metagenomica della comunità batterica

Sequenziamento del 16S rRNA ha fornito un totale di **2763 OTUs**

α -diversity: misura la diversità di batteri all'interno di ciascun campione e tiene conto dei diversi tipi di batteri e della loro abbondanza

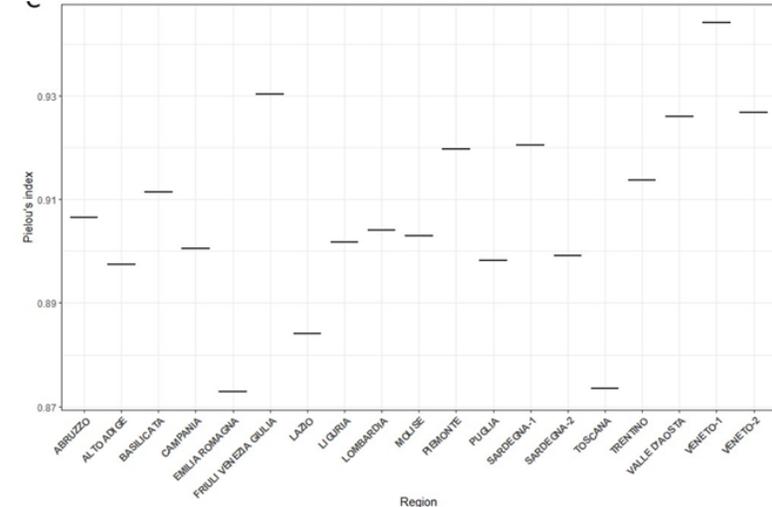


Distribuzione del numero di OTUs osservato in ciascun campione (*richness*)



Distribuzione dei valori degli indici di Shannon per ogni regione

Indice di Shannon: indice di diversità che considera sia la ricchezza in specie sia la loro uniformità



Rappresentazione dei valori di indice di Pielou per ogni regione

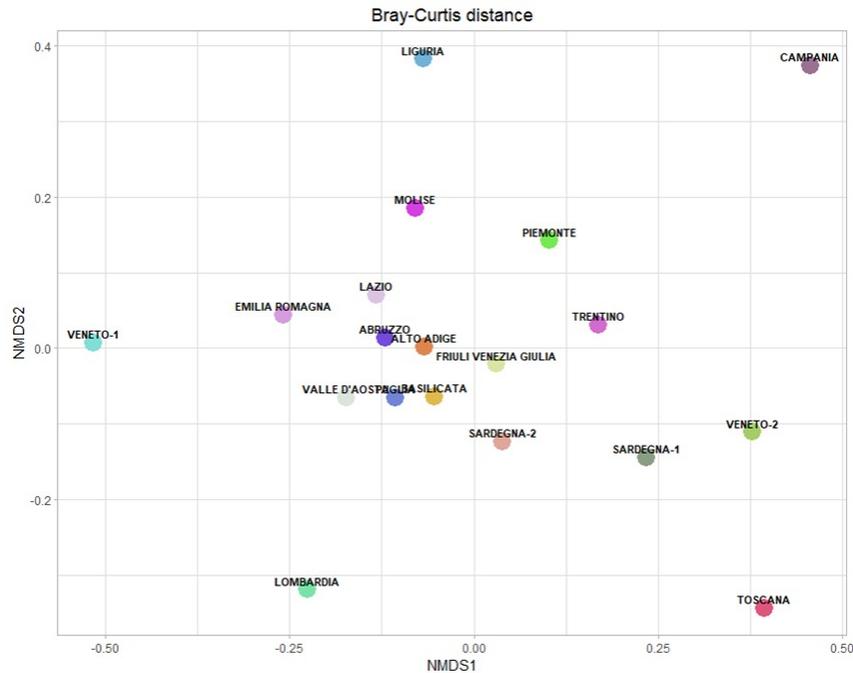
Indice di Pielou: indice di equità che esprime quanto gli individui in una comunità sono equamente distribuiti tra le diverse specie che la compongono

Kruskal-Wallis test

p-value > 0.05 → non significativo

Risultati – Analisi metagenomica della comunità batterica

β -diversity: è una misura di similitudine tra campioni mediante il confronto della loro comunità batteriche



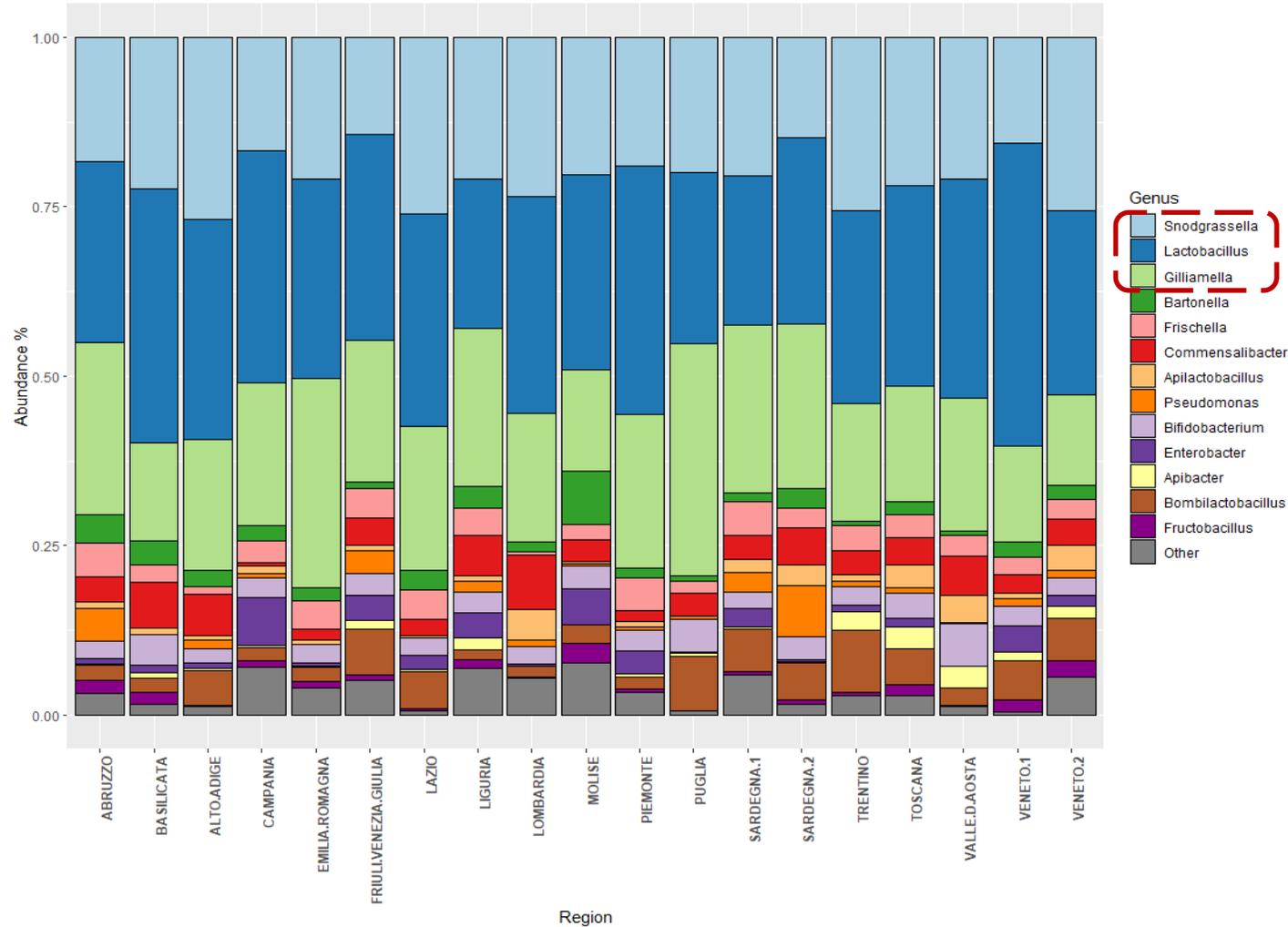
Indice di dissimilarità di Bray-Curtis: mette a confronto a due a due i campioni basandosi sull'abbondanza di ciascuna specie che li compone

PERMANOVA test
p-value > 0.05 → non significativo

Il microbiota delle api non presenta differenza statisticamente significative tra le varie regioni italiane sia in termini di indici di biodiversità che di composizione tassonomica (α -diversity e β -diversity con p -value > 0.05)

Risultati – Analisi metagenomica della comunità batterica

Barplot delle abbondanze relative (in %) dei generi batterici



Generi batterici più abbondanti:

- **Lactobacillus** (tra 22% e 44.6%)
- **Gilliamella** (tra 13.3% e 25.4%)
- **Snodgrassella** (tra 14.3% e 26.9%)

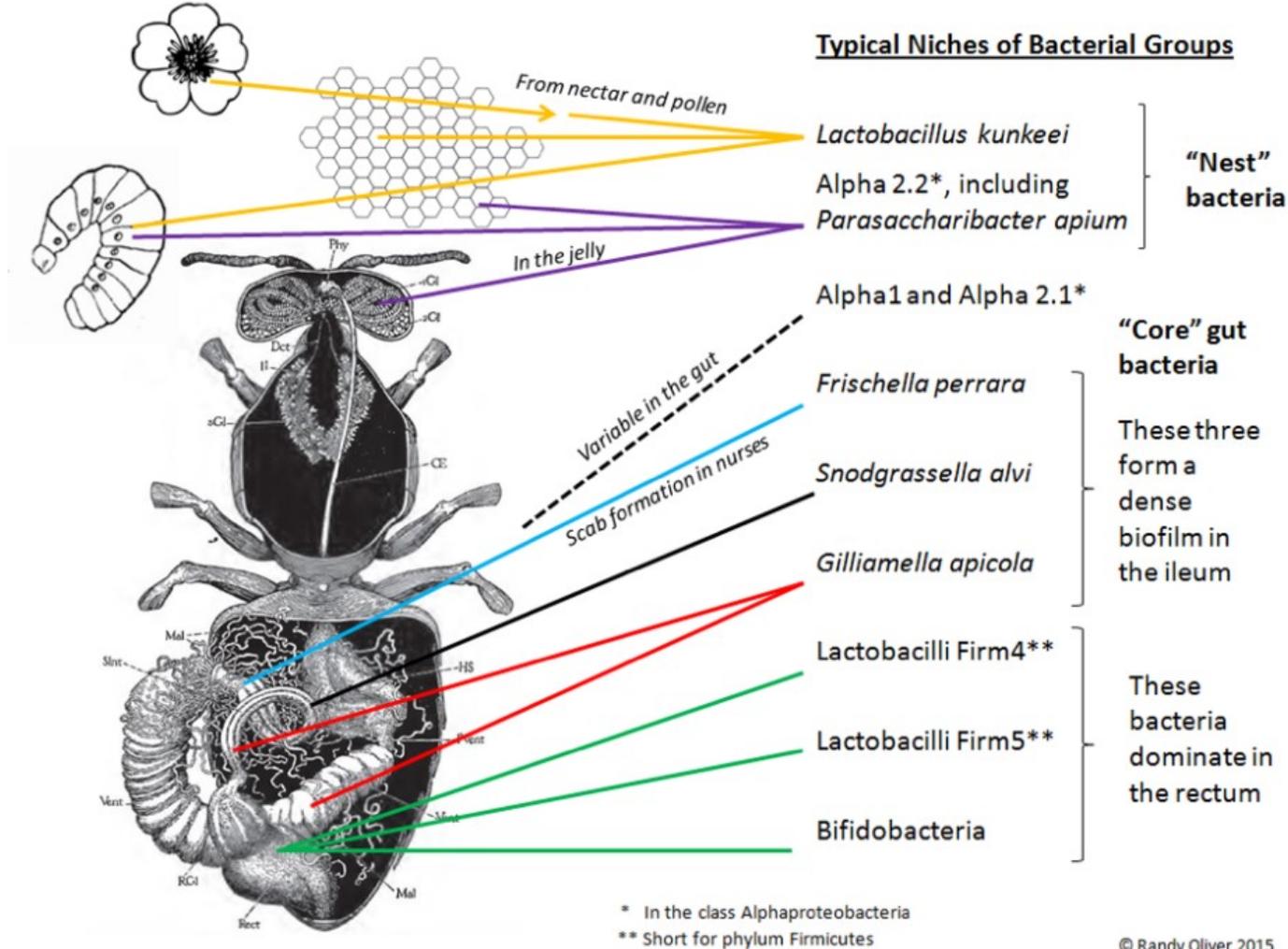
seguiti da

- **Bifidobacterium** (tra 2.1% e 6.3%)
- **Bombilactobacillus** (tra 1.4% e 9.2%)
- **Bartonella** (tra 0.6% e 8%)
- **Commensalibacter** (tra 0.4% e 8.1%)
- **Frischella** (tra 0.4% e 4.9%)
- **Enterobacter** (tra 0.1% e 7.1%)

Rilevata anche la presenza di:

- batteri patogeni (*Serratia*, *Melissococcus*)
- fitopatogeni (*Erwinia*)
- batteri tipici di altri apoidei (*Apibacter* e *Arsenophonus*)

Risultati – Analisi metagenomica della comunità virale



Gilliamella e *Snodgrassella*: metabolismo degli alimenti, neutralizzazione delle tossine alimentari e protezione contro parassiti e agenti patogeni intestinali

Lactobacillus e *Bifidobacterium*: contribuire alla trasformazione del nettare per la produzione del miele; inibire lo sviluppo di batteri patogeni

Bartonella (batteri simbiotici comuni a diversi insetti): coinvolto nella degradazione di metaboliti secondari delle piante presenti nel polline e nel nettare, nel metabolismo delle proteine e dell'azoto

Frischella: comune nel microbiota batterico delle api. talvolta un patogeno occasionale inducendo alterazioni nell'intestino delle api

<https://scientificbeekeeping.com/tag/microbiota/>

Risultati – Analisi metagenomica della comunità virale

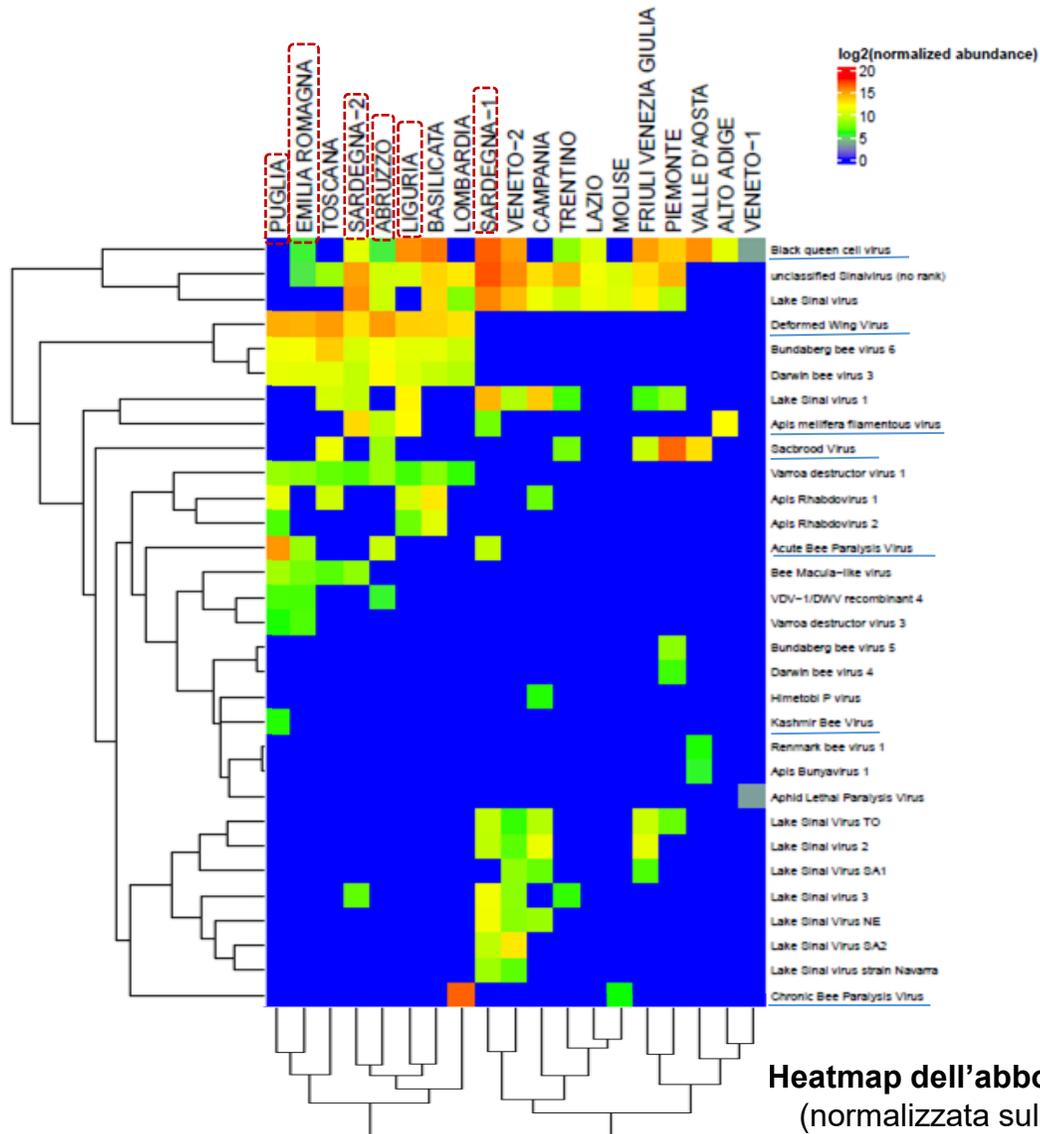
Rilevate in totale di **81 specie virali**

Virus delle api (n=30)	Virus di altri artropodi (n=24)	Virus delle piante (n=27)
Acute bee paralysis virus	Heliconius erato iflavirus	Broad bean wilt virus 1
Aphid lethal paralysis virus	Helicoverpa armigera iflavirus	Blackcurrant reversion virus
Apis bunyavirus 1	Lymantria dispar iflavirus 1	Blueberry leaf mottle virus
Apis mellifera filamentous virus	Euscelidius variegatus virus 1	Caraway yellows virus
Apis rhabdovirus 1	Graminella nigrifrons virus 1	Grapevine Bulgarian latent virus
Apis rhabdovirus 2	King virus	Hobart nepovirus 2
Bee Macula-like virus	La Jolla virus	Tomato ringspot virus
Black queen cell virus	Lampyris noctiluca iflavirus 2	unclassified Nepovirus (no rank)
Bundaberg bee virus 5	Laodelphax striatellus iflavirus 1	Brevicoryne brassicae virus
Bundaberg bee virus 6	Nesidiocoris tenuis iflavirus 1	Alfalfa mosaic virus
Chronic bee paralysis virus	Sogatella furcifera honeydew virus	Melandrium yellow fleck virus
Darwin bee virus 3	Changjiang picorna-like virus 1	Peanut virus C
Darwin bee virus 4	Hubei arthropod virus 1	Tobacco streak virus
Deformed wing virus	Hubei coleoptera virus 1	unclassified Ilarvirus (no rank)
Himetobi P virus	Hubei odonate virus 4	Pear alphapartitivirus
Kashmir bee virus	Hubei partiti-like virus 34	unclassified Alphapartitivirus (no rank)
Lake Sinai virus	Hubei picorna-like virus 26	Crimson clover cryptic virus 2
Lake Sinai virus 1	Hubei picorna-like virus 27	White clover cryptic virus 2
Lake Sinai virus 2	Hubei picorna-like virus 29	Pelargonium flower break virus
Lake Sinai virus 3	Hubei picorna-like virus 34	Raspberry bushy dwarf virus
Lake Sinai Virus NE	Hubei picorna-like virus 35	Sowbane mosaic virus
Lake Sinai Virus SA1	Shahe heteroptera virus 2	Turnip rosette virus
Lake Sinai Virus SA2	Wenzhou picorna-like virus 47	Gentian ovary ringspot virus
Lake Sinai virus strain Navarra	Wuhan insect virus 21	Actinidia virus X
Lake Sinai Virus TO		Alstroemeria virus X
Renmark bee virus 1		Asparagus virus 3
Sacbrood virus		Lettuce virus X
unclassified Sinaivirus (no rank)		
Varroa destructor virus 1 (o DWV-B)		
Varroa destructor virus 3		
VDV-1/DWV recombinant 4		

Prodotto in media 247 milioni paired end reads per campione; 75% appartenente a *A. mellifera*, di cui circa il 2% rRNA

Numero medio reads per analisi metagenomica = 39 milioni di paired end reads per campione

Risultati – Analisi metagenomica della comunità virale



“Nuovi” virus

- Apis rhabdovirus 1 e 2 (ARV-1/-2)
- Bee Macula-like virus (BMLV)
- Lake Sinai virus (LSV)
- Bundaberg bee virus (BBV)
- Darwin bee virus (DBV)
- Aphid lethal paralysis virus (ALPV)
- Apis bunyavirus-1 (ABV-1)
- Renmark bee virus (RBV)

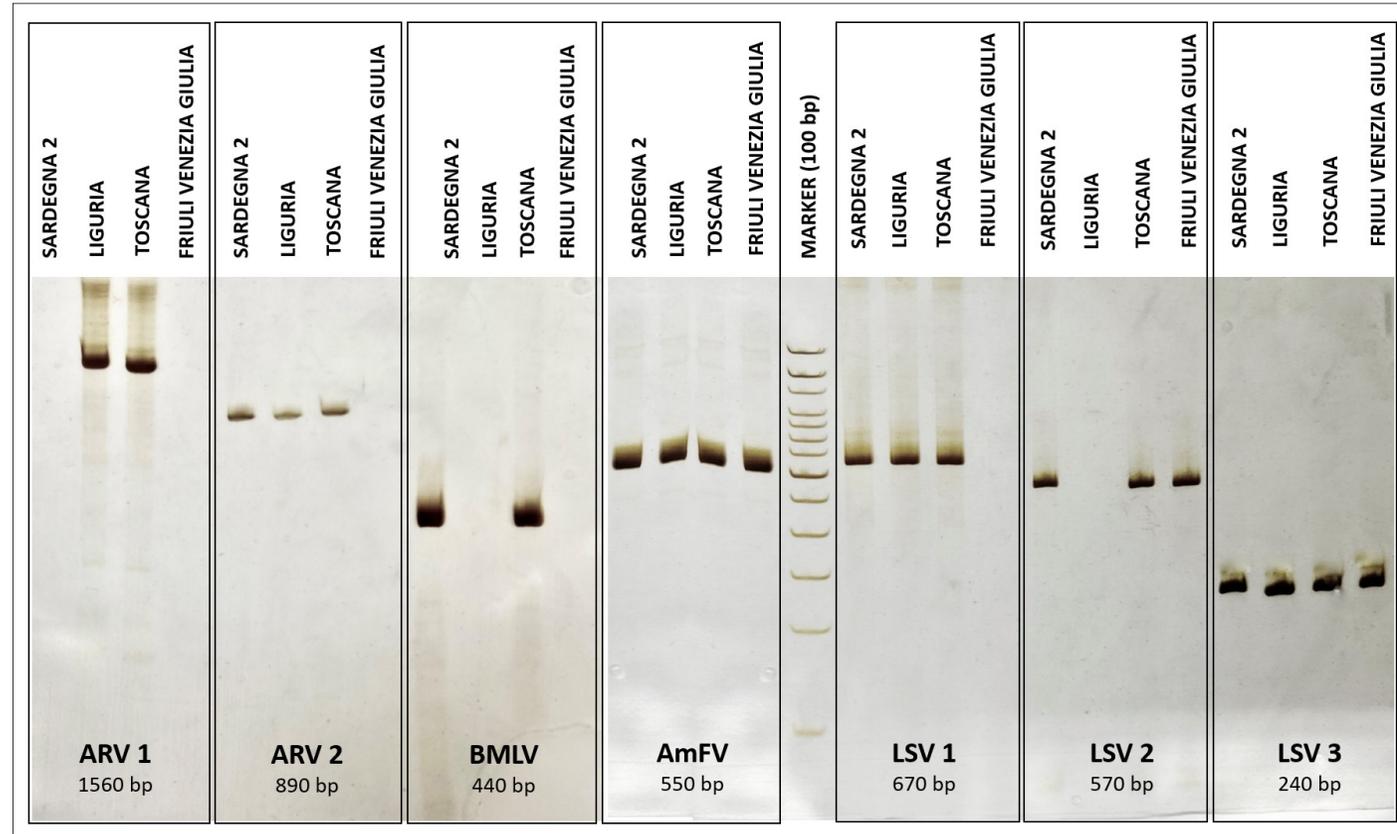
Virus noti

- ABPV
- CBPV
- DWV
- SBV
- BQCV
- AmFV
- KBV

- **BQCV e LSV:** virus con **maggior prevalenza**
- Sardegna (1 e 2), Abruzzo, Puglia, Emilia Romagna e Liguria **n>10 specie virali per apiario**
- Veneto 1, Provincia Autonoma di Bolzano, Molise solo 2 - 3 specie virali per apiario

Heatmap dell'abbondanza delle *read* delle specie virali delle api (normalizzata sul numero totale di *read* ed espressa come log2)

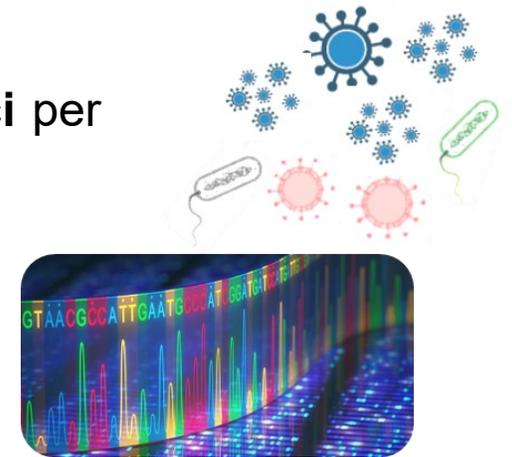
Risultati – Analisi metagenomica della comunità virale



Elettroforesi su gel di acrilamide 7% e colorazione con nitrato d'argento dei prodotti di PCR di **ARV 1**, **ARV 2**, **BMLV**, **AmFV**, **LSV 1**, **LSV 2**, **LSV 3** di 4 apiari oggetto di indagine (Sardegna 2, Liguria, Toscana e Friuli Venezia Giulia)

Conclusioni

- ✓ **Descrizione della composizione della comunità batterica delle api presenti nel nostro territorio**
- ✓ **La composizione della comunità batterica delle api sembra mantenersi pressoché costante tra gli apiari, nonostante l'eterogeneità dell'habitat, del territorio, del clima e della dieta**
- ✓ **Identificazione di diverse specie virali**, alcune già note e altre mai descritte sul territorio italiano, incrementando le informazioni disponibili in ambito epidemiologico
- ✓ **Porre le basi per la messa a punto di specifici test diagnostici per la rilevazione dei "nuovi" virus presenti sul territorio italiano**





Ringraziamenti

Lo studio è stato realizzato nell'ambito del progetto IZS VE 09/20 RC “Applicazione di tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS) per l'identificazione e la caratterizzazione di patogeni emergenti e simbiotici di Apis mellifera nel territorio italiano e per incrementare le conoscenze sul trascrittoma dell'ape” finanziato dal Ministero della Salute.

Apicoltori

IZS Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

Paola Mogliotti

IZS Lombardia e Emilia Romagna

Monica Pierangela Cerioli

IZS Lazio e Toscana

Giovanni Formato

IZS Abruzzo e Molise

Luciano Ricchiuti

IZS del Mezzogiorno

Anna Cerrone

IZS Puglia e Basilicata

Pasquale Troiano

IZS Sicilia

Antonio Salvaggio

IZS Sardegna

Antonio Pintore

IZS delle Venezie

Fulvio Bordin

Franco Mutinelli

Massimiliano Orsini

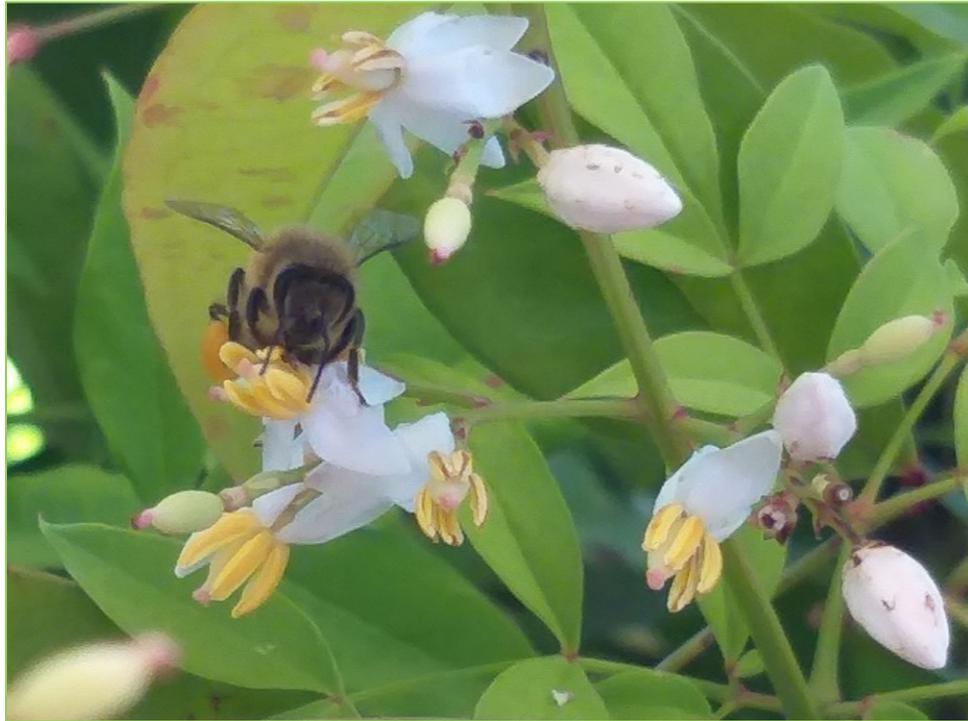
Peruzzo Arianna

Alice Fusaro

Gianpiero Zamperin

Adelaide Milani

Elisa Palumbo



Grazie per l'attenzione

