

L'ape mellifera

protegge le larve dalle tossine presenti nel polline producendo pappa larvale

Nel corso dell'evoluzione, le piante hanno sviluppato numerosi metaboliti secondari, che sono dei composti chimici, alcuni dei quali preposti alla difesa contro altri organismi. Questi metaboliti, spesso tossici per uomo e animali, possono essere presenti in differenti organi vegetali, quali radici, foglie e, soprattutto, fiori. Il fatto che li si ritrovi anche nel nettare e nel polline fa sì che le api bottinatrici possano trasportarli nelle rispettive colonie. Durante la sua tesi di dottorato, svolta presso Agroscope e l'Università di Neuchâtel, il ricercatore scientifico Matteo Lucchetti ha scoperto che le tossine contenute nel polline influenzano negativamente lo sviluppo delle api, ma che la pappa larvale prodotta dalle nutrici è in grado di proteggere le larve dal loro effetto negativo. Qui di seguito, si presentano i risultati sull'argomento pubblicati sulla rivista scientifica «Proceedings of the Royal Society B»^[1].

Flavie Roncoroni, Matteo Lucchetti,
Verena Kilchenmann e Christina Kast

Agroscope, Centro di ricerca apistica, 3003 Berna

Il fatto che il polline contenga spesso concentrazioni particolarmente elevate di metaboliti secondari rappresenta un fattore di rischio per le api che lo bottinano. Nelle colonie, il polline viene miscelato a miele, nettare e secrezioni ghiandolari, per poi essere conservato nei favi sotto forma di pane d'api. Le api adulte appena sfarfallate consumano molto pane d'api, che

apporta loro le proteine necessarie, tra le altre cose, per lo sviluppo delle ghiandole ipofaringee e della muscolatura alare^[2]. Ne consegue che i metaboliti secondari presenti nel polline possono avere un effetto negativo diretto sulle giovani api adulte.

Il pane d'api viene consumato anche dalle api nutrici, che lo utilizzano per produrre la pappa nutritiva destinata all'allevamento della covata. Inizialmente, le larve che diventeranno api operaie e fuchi ricevono una pappa di composizione simile a quella destinata alle future regine. Sia la pappa larvale sia quella reale utilizzate per nutrire le larve nei loro primi tre giorni di vita sono praticamente prive di polline e, anche in seguito, ne contengono molto poco^[3]. Ciò fa sì che le larve non entrino quasi mai in contatto diretto con «polline tossico». Tuttavia, se i metaboliti secondari presenti nel polline entrassero nella composizione della pappa larvale, potrebbero esercitare un effetto negativo indiretto sulle larve.

La viperina azzurra quale pianta modello per lo studio dei metaboliti secondari presenti nel polline

Per indagare queste problematiche si è scelto di lavorare con la viperina azzurra (*Echium vulgare*, figura 1), in quanto pianta mellifera largamente diffusa in Svizzera e molto gradita alle api, anche grazie alle grandi quantità di polline e nettare prodotte durante il suo lungo periodo di fioritura (da maggio a ottobre). Tra i metaboliti secondari prodotti dalla viperina azzurra si trovano i cosiddetti alcaloidi pirrolizidici (AP), quali echimidina e echivulgarina. In Svizzera, questa pianta appartenente alle boraginacee è la fonte

principale di AP indesiderati nel miele e nel polline^[4; 5]. Il polline prodotto dalla viperina azzurra ha un tenore in AP particolarmente elevato^[6].

Sperimentazione

Allo scopo di testare la tossicità del polline di viperina azzurra su ape mellifera in condizioni di laboratorio, Matteo Lucchetti ha isolato diversi AP dai suoi fiori. Tutte le prove di tossicità eseguite sulle api e descritte in questo articolo sono state tuttavia condotte utilizzando la sola echimidina. Una volta isolata, l'echimidina è stata aggiunta al polline privo di AP, alla dieta larvale o al pane d'api. Le analisi sono state eseguite sulla pappa reale perché più abbondante e facilmente reperibile rispetto a quella larvale.

Sono state esaminate le domande seguenti (figura 2):

- 1. Gli AP sono tossici per le api adulte appena sfarfallate?**
- 2. Gli AP sono tossici per le larve?**
- 3. Quale quota di AP si ritrova nella pappa reale?**

1. Danni subiti dalle api adulte appena sfarfallate

L'echimidina isolata dalla viperina azzurra è stata miscelata con polline privo di AP, a sua volta somministrato, in «arnie tipo Liebefeld», ad api adulte appena sfarfallate, per verificarne gli eventuali effetti sulla loro durata di vita. Api nutrite con polline privo di echimidina hanno funto da testimone. Le serie di prove hanno preso in considerazione polline contenente tre diverse concentrazioni di echimidina. L'ordine di grandezza della concentrazione più elevata di



Ruedi Ritter



Ruedi Ritter

Figura 1: La viperina azzurra (*Echium vulgare*) è una pianta mellifera particolarmente frequentata dalle api. Tra i suoi metaboliti secondari si trova l'echimidina, un alcaloide pirrolizidico (AP), il cui isolato è stato utilizzato per condurre la presente ricerca.

echimidina è stato calibrato sul contenuto complessivo di AP presente naturalmente nel polline di viperina azzurra. Durante la prova, le «arnie tipo Liebefeld» sono state messe in incubatrice. Le api morte sono state contate e allontanate quotidianamente. Le prove sono state ripetute più volte. I risultati della sperimentazione, riassunti nel grafico sottostante (figura 3), evidenziano la relativamente buona tolleranza delle api adulte nei confronti dell'echimidina (non è stato osservato nessun aumento del tasso di mortalità nei primi 15 giorni). Le api nutrite con le due dosi più basse di echimidina (curva gial-

la e curva rossa) hanno mostrato un tasso di sopravvivenza simile a quello delle api del testimone non trattato, rappresentato dalla curva nera (nessuna differenza statisticamente significativa), mentre il tasso di sopravvivenza delle api nutrite con la dose più elevata di echimidina (curva verde) è risultato sensibilmente minore (differenza statisticamente significativa).

2. Danni subiti dalle larve

Le prove sulle larve (figura 4) sono state eseguite secondo il protocollo di Aupinel et al.^[7],

aggiungendo diverse concentrazioni di echimidina alla loro dieta.

Somministrando alle larve una concentrazione di echimidina pari a 15 µg/g (curva azzurra della figura 5) non si osserva nessun effetto negativo sul loro tasso di sopravvivenza, come attestato dal 75% di api adulte sfarfallate dopo 21 giorni; risultato praticamente analogo a quello che ha caratterizzato il testimone non trattato (curva nera). Se la concentrazione di echimidina aumenta leggermente, a 20 µg/g (curva rossa), la percentuale di api adulte sfarfallate risulta sen-

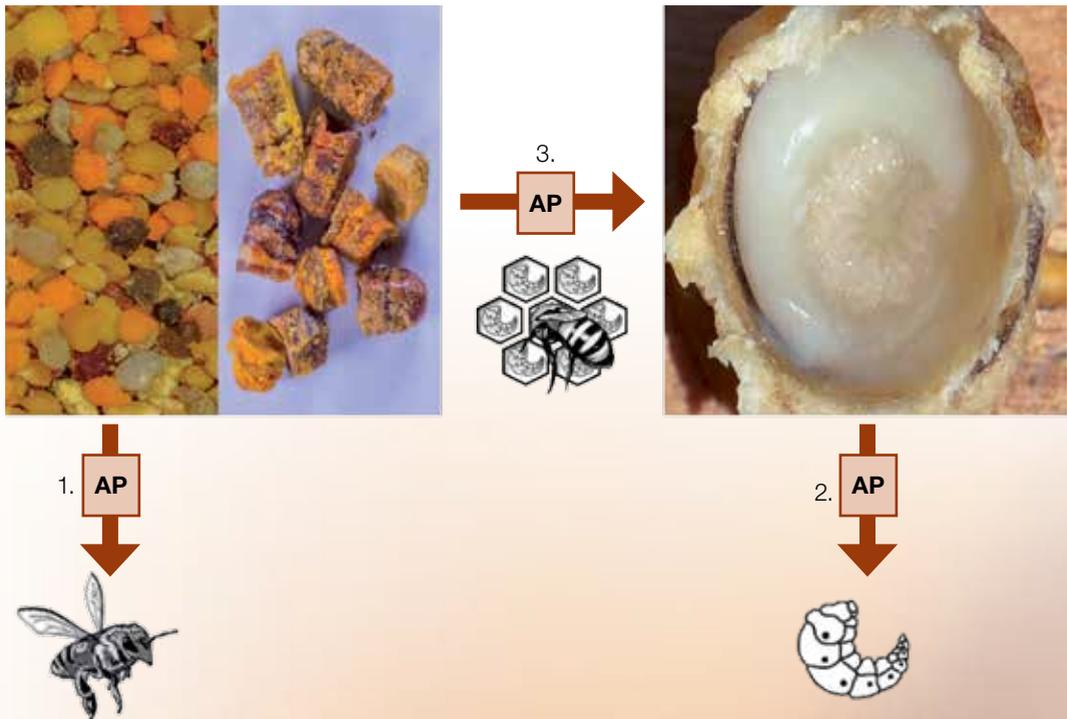


Figura 2: L'echimidina, un AP contenuto nella viperina azzurra, è stata aggiunta a polline privo di AP e alla dieta larvale, per verificarne la tossicità sulle api adulte (esperimento n° 1) e sulle larve (esperimento n° 2). Per rispondere alla terza domanda (quota di AP che dal pane d'api raggiunge la pappa destinata alle larve), l'echimidina è stata aggiunta a del pane d'api privo di AP, poi consumato dalle api nutrici deputate alla produzione di pappa reale. Una volta determinata la concentrazione di AP nella pappa reale, è possibile verificare l'esistenza di un eventuale «effetto filtro» svolto dalle api nutrici.

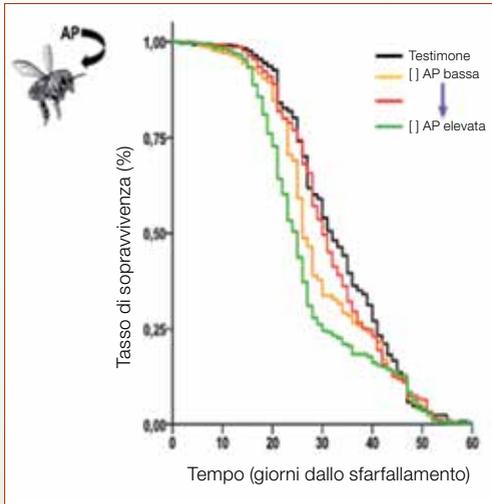


Figura 3: Tossicità degli AP (mg d'echimidina/g di polline) sulle api adulte. Curva nera = testimone non trattato, curva gialla = [0,2 mg/g], curva rossa = [1,5 mg/g] e curva verde = [7,7 mg/g].

sibilmente minore, attestandosi attorno al 50%. Con concentrazioni di echimidina ancora più elevate questo effetto appare molto più pronunciato, tanto che somministrando 40 $\mu\text{g/g}$ (curva verde) o più (curva arancione e curva verde oliva) di echimidina il tasso di sopravvivenza delle larve e quello di sfarfallamento delle api adulte si riduce drasticamente (la metamorfosi non avviene o avviene solo in casi isolati). A differenza delle api adulte, le larve risultano quindi essere molto sensibili all'aggiunta di AP nella loro dieta.

3. Trasferimento degli AP dal pane d'api alla pappa reale

Per convalidare l'ipotesi «le api nutrici proteggono le larve dai metaboliti secondari presenti nel polline» bisogna che la quantità di AP rilevata nella pappa reale (terza prova) sia compresa in

un intervallo di concentrazione per il quale, durante la seconda prova, non è stata osservata nessuna riduzione della percentuale di api adulte sfarfallate. Per determinare le concentrazioni di AP nella pappa reale ci si è serviti di sistemi Miniplus modificati, che sono delle colonie ridotte di api, con riserve nutritive, ma prive di regina (figura 6).

Durante la prova, 2'000 $\mu\text{g/g}$ (2 mg/g) d'echimidina sono stati miscelati al pane d'api e alcune giovani larve sono state trasferite nei cupolini usualmente utilizzati per l'innesto. Sia il pane d'api sia le giovani larve sono poi stati introdotti nella colonia ridotta tramite appositi favi, per far sì che le api potessero costruire celle reali, da cui prelevare la pappa reale a fini sperimentali.

Dopo tre giorni, si è proceduto a raccogliere la pappa reale e a determinarne la concentrazione di echimidina. Mediamente, sono stati rilevati 2 microgrammi di echimidina per grammo di pappa reale (figura 7); una concentrazione significativamente minore dei 15 $\mu\text{g/g}$ che, somministrati alla dieta larvale nella prova n. 2, non hanno influito negativamente né sul tasso di sopravvivenza delle larve né su quello di sfarfallamento delle api adulte (figura 5, similitudine tra la curva azzurra e la curva nera del testimone non trattato). Il fatto che la concentrazione di AP si riduca di circa 1'000 volte durante la produzione di pappa reale consente di affermare che le api nutrici agiscono come un «filtro» che protegge le larve dagli AP.

Stima del rischio per le api adulte

Si può affermare che le api adulte tollerano relativamente bene le tossine prese in considerazione in questa sperimentazione, poiché



Figura 4: Le larve sono state nutrite artificialmente con una dieta a base di zucchero, estratto di lievito e pappa reale, quindi poste in incubatrice.

non è stato osservato nessun sintomo d'avvelenamento acuto durante i primi giorni di somministrazione. Tuttavia, livelli elevati di tossine hanno influito negativamente sul loro tasso di sopravvivenza. Nei casi in cui le api bottinino quasi esclusivamente la viperina azzurra, la loro durata di vita può risultare ridotta. Il fatto che, in condizioni naturali, le api bottinatrici raccolgano polline da più piante (questo comportamento fa sì che l'ape si definisca un insetto poliletico) e lo conservino sotto forma di pane d'api, consente la miscelazione di diversi tipi di polline e la conseguente diluizione delle eventuali tossine presenti. Oltre a ciò, un contenuto elevato di AP nel polline può avere un effetto deterrente sulle api che, quindi, ne raccolgono di meno^[9]. Tutti questi motivi permettono di affermare che, probabilmente, le api adulte corrono pochi rischi, purché le colonie vivano in un ambiente variegato.

Stima del rischio per le larve

Contrariamente alle api adulte, le larve sono estremamente sensibili agli AP, che già in piccole dosi causano la riduzione significativa del loro tasso di sopravvivenza e della percentuale di sfarfallamento delle api adulte. Tuttavia, poiché le concentrazioni massime di AP nella pappa larvale sono molto basse, le larve non risultano praticamente mai esposte a queste tossine. Per determinare il rischio effettivo che gli AP rappresentano per la sopravvivenza delle larve, è comunque importante determinare la quantità di tossine trasferita dal pane d'api alla pappa larvale / pappa reale. In questo ambito, è stato possibile dimostrare che solo una piccola quota di AP presenti nel polline e nel pane d'api raggiunge effettivamente la pappa larvale / pappa reale prodotta dalle api nutrici. Di conseguenza, sembra ragionevole affermare che gli

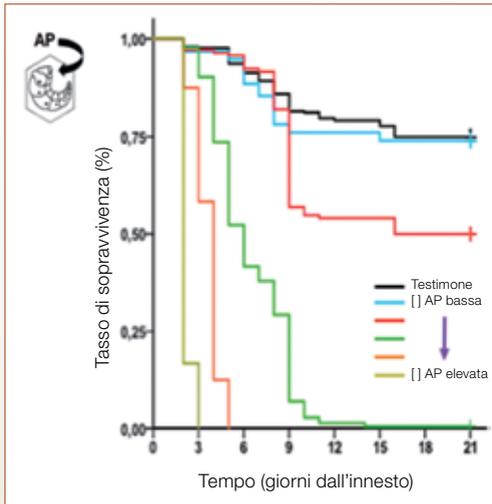


Figura 5: Tossicità degli AP (μg d'echimidina/g di polline) sulle larve. Curva nera = testimone non trattato, curva azzurra = [15 $\mu\text{g}/\text{g}$], curva rossa = [20 $\mu\text{g}/\text{g}$], curva verde = [40 $\mu\text{g}/\text{g}$], curva arancione = [400 $\mu\text{g}/\text{g}$] e curva verde oliva = [4'000 $\mu\text{g}/\text{g}$].

AP rappresentano un rischio trascurabile per le larve. Nel corso dell'evoluzione, l'ape mellifera si è adattata bene a questo fattore negativo, nutrendo le larve con la pappa reale.

Vantaggi della produzione di pappa reale

Agli insetti sociali come l'ape mellifera, la produzione di pappa reale offre notevoli vantaggi. In primo luogo, essa è più facilmente digeribile rispetto ad una dieta basata sul solo polline, come quella che sostiene le larve di api selvatiche e bombi. In secondo luogo, favorisce la crescita delle larve, accelerando lo sviluppo delle colonie. Infine, possiede un effetto antimicrobico, che può prevenire le infezioni larvali, e, come dimostrato con questa ricerca, protegge le larve

dalle tossine presenti nel polline (effetto «filtro» svolto dalle api nutrici)^[1].

Protezione dai prodotti fitosanitari

Oltre alle tossine naturali, il polline può contenere anche prodotti fitosanitari. Analogamente a quanto visto nel caso delle tossine naturali prodotte dalle piante a fiore, queste sostanze possono entrare a far parte della composizione di polline, pane d'api e pappa destinata alle larve, compromettendo, a loro volta, lo sviluppo delle colonie. Di conseguenza, ricerche sperimentali come quella presentata in queste pagine rivestono una grande importanza, perché consentono di valutare la pericolosità dei prodotti fitosanitari nei confronti delle api al fine di garantire loro una buona salute.



Figura 6: Sistema Miniplus modificato. Una gabbia con rete delimita uno spazio di volo senza accesso esterno.



Figura 7: Le api nutrici hanno consumato pane di api contenente 2'000 µg/g di echimidina e prodotto pappa reale, la cui concentrazione dell'AP è risultata essere pari a soli 2 µg/g. Ciò consente di affermare che le api nutrici agiscono da «filtro», riducendo mediamente la concentrazione di echimidina di un fattore 1'000.

Questo ricerca è il risultato della collaborazione tra il Centro di ricerca apistica e Christophe Praz / Gaëtan Glauser dell'Università di Neuchâtel. Sul nostro sito web (www.apis.admin.ch Api > Prodotti apistici > Miele > Sostanze nocive nel miele > Alcaloidi pirrolizidinici) troverete il link verso questa pubblicazione e ulteriori informazioni sugli AP nei prodotti apistici.

Bibliografia

- [1] Lucchetti, M. A., Kilchenmann, V., Glauser, G., Praz, C., & Kast, C. (2018). Nursing protects honeybee larvae from secondary metabolites of pollen. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1875), 20172849. (DOI: 10.1098/rspb.2017.2849).
- [2] Crailsheim, K. (1990). The protein balance of the honey bee worker. *Apidologie*, 21(5), 417-429.
- [3] Babendreier, D., Kalberer, N., Romeis, J., Fluri, P., & Bilger, F. (2004). Pollen consumption in honey bee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plant. *Apidologie*, 35, 293-300.
- [4] Kast, C., Dübecke, A., Kilchenmann, V., Bieri, K., Böhlen, M., Zoller, O., Beckh, G., & Lüllmann, C. (2014). Analysis of Swiss honeys for pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Apicultural Research*, 53(1), 75-83.
- [5] Kast, C., Kilchenmann, V., Reinhard, H., Droz, B., Lucchetti, M. A., Dübecke, A., Beckh, G., & Zoller, O. (2018). Chemical fingerprinting identifies *Echium vulgare*, *Eupatorium cannabinum* and *Senecio* spp. as plant species mainly responsible for pyrrolizidine alkaloids in bee-collected pollen. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(2), 316-327.
- [6] Lucchetti, M. A., Glauser, G., Kilchenmann, V., Dübecke, A., Beckh, G., Praz, C., & Kast, C. (2016). Pyrrolizidine alkaloids from *Echium vulgare* in honey originate primarily from floral nectar. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(25), 5267-5273.
- [7] Aupinel, P., Fortini, D., Dufour, H., Tasei, J., Michaud, B., Odoux, J., & Pham-Delegue, M. (2005). Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of insectology*, 58(2), 107.
- [8] Reinhard, A., Janke, M., von der Ohe, W., Kempf, M., Theuring, C., Hartmann, T., Schreier, P., & Beuerle, T. (2009). Feeding deterrence and detrimental effects of pyrrolizidine alkaloids fed to honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of chemical ecology*, 35(9), 1086.