



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Nuove frontiere della genomica applicata all'apicoltura

Luca Fontanesi

Dipartimento di Scienze e
Tecnologie Agroalimentari
Università di Bologna

luca.fontanesi@unibo.it

Genomica

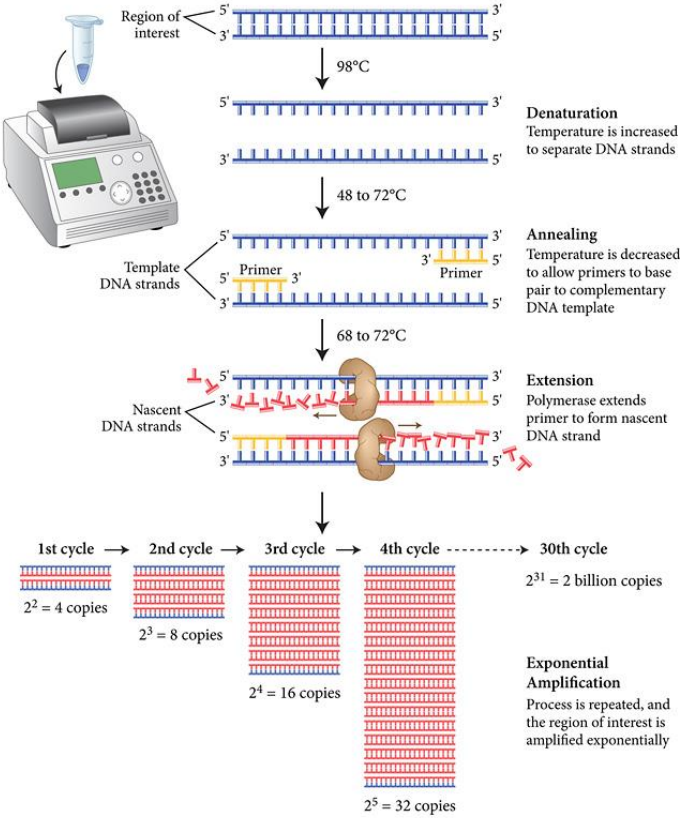
La genomica è la disciplina che si occupa della struttura, sequenza, funzione ed evoluzione del genoma, vale a dire di tutta l'informazione genetica contenuta nel **DNA** presente nelle cellule di una particolare specie.

Enciclopedia Treccani



Come si analizza il DNA

Polymerase Chain Reaction (PCR)



Come si analizza il DNA

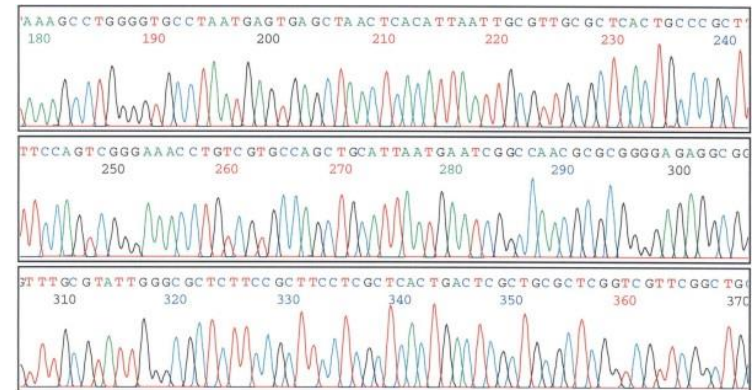
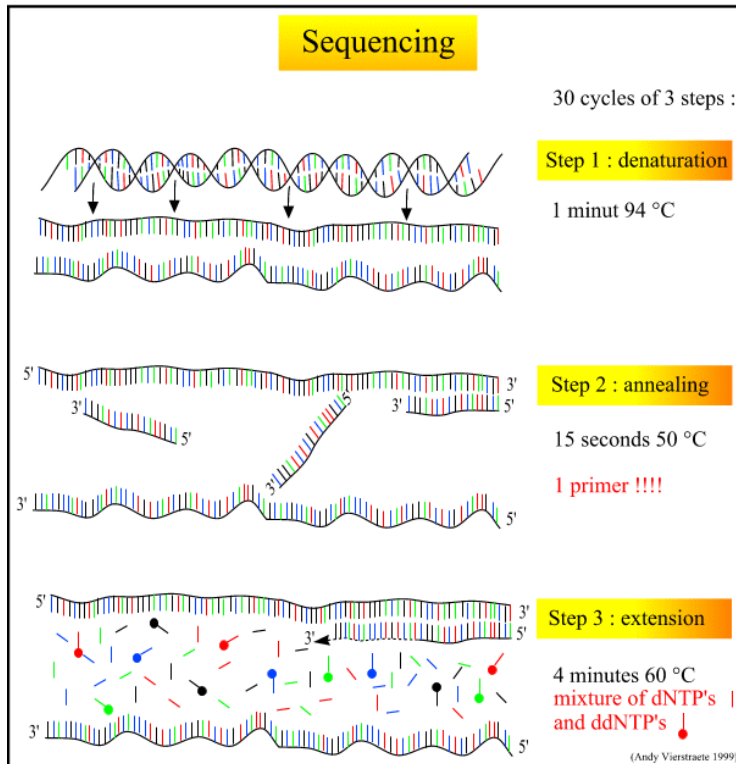
Sequenziamento

- 1) Metodo tradizionale (Sanger)
- 2) Next Generation Sequencing



Come si analizza il DNA

Sequenziamento – Metodo Sanger



Come si analizza il DNA

Sequenziamento – Next Generation Sequencing

ARTICLE

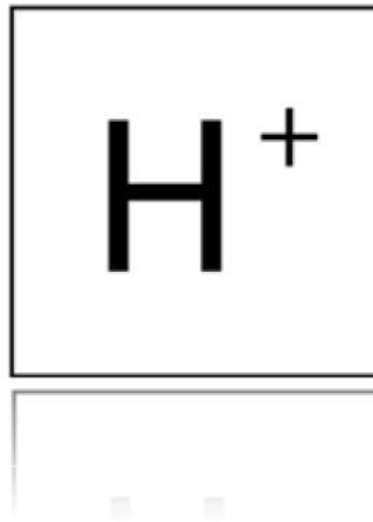
doi:10.1038/nature10242

An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing

Jonathan M. Rothberg¹, Wolfgang Hahn¹, Todd M. Ayres¹, Jonathan Schnitz¹, William Miller¹, Mel Tower¹, John H. Leamon¹, Kim Johnson¹, Mark J. Milgram¹, Matthew Kitzman¹, James Haver¹, Jan E. Sorenson¹, Frank Kertzel¹, James W. Meyer¹, John P. Davidson¹, Anyika Manning¹, John E. Nobile¹, Bernard P. Doo¹, David Lige¹, Travis A. Clark¹, Martin Huber¹, Jeffrey F. Brantford¹, Juan B. Sorensen¹, Steven E. Caskey¹, Michael Tower¹, Yuzuo Shi¹, Sili Horner¹, Maria Soderqvist¹, Xia Miao¹, Brian Koop¹, Jeffrey Schmitz¹, Erika Fokrennes¹, Michelle Schmitt¹, Mohammad Alizadeh¹, Eileen Dandekar¹, Devin Drenthorn¹, Rachel Lankford¹, Tanya Shteynberg¹, Josephine A. Hiltner¹, Eugene Sussman¹, Kersti Mollerstrom¹, Alan Wilton¹, G. Thomas Koch¹ & James Bonville¹

The essential 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 100 million semiconductor sensors on a single silicon chip. The ion chip contains ion-sensitive, field-effect transistor-based sensors in perfect register with 1.2 million wells, which provide confinement and flow 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 bacterial genomes, its robustness and scalability by producing ion chips with up to 10 times as many sensors and sequencing a human genome.

ion torrent



Come si analizza il DNA

Sequenziamento – Next Generation Sequencing

```
@WRHH9:4:19
TTGTCATTTCAGAGAATGTCTCTTGGACTTTTTCCAAACTGGACCATTAGGGATTGCTCCACTGATTATGG
+
C@CCC@@@<@ECCCC@DDCCCEE@B7A9>@@@->2:<3;@@<DD<DDE9CCC<AA>DD?>:>C@ACC9><:<
@WRHH9:5:6
AAAACGTTTGTCCAAAACCCCAAGATCTATTTTGTCTGGAGCTGAAATCCCAGGGACCTCTGAAGCTG
+
CCC:BBBB=BDE@EEE8EEEE6<<6;@=?22222&2@AC=EDCCCEE;DDDD=B@@4..(.;=<9?BA
@WRHH9:5:7
CAATGGCCGCCGCTGCAGCCGGCGCACC GCGCTGATCCGATGGCAGGAGCCAGGATCCAGGTGCTTTC
+
CC@CE@E@CC@CDEEEECC@C?DCCBA=@CBBACCCC?CCCD?DCC?CCC>CD?DCC?CE=@@222*,
@WRHH9:5:13
CCTGCCTAGGAGACCCACGTTTACCGAGGCAGACTTAGAGCCATGCTTCCCACCAATGACGCCGACGCT
+
```



Il miele

- a) Contiene il **DNA ambientale (eDNA)**: il DNA di tutti gli organismi che direttamente o indirettamente sono venuti a contatto con il miele durante il suo «percorso» di produzione
- b) Il suo DNA può essere analizzato per molteplici scopi
- c) E' facile da reperire



Alcune sfide dell'apicoltura

- 1) Biodiversità/genetica
- 2) Frodi
- 3) Malattie/avversità
- 4) Interazioni con l'ambiente
- 5) ...



- 1) Identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera*
- 2) Determinazione dell'origine botanica (e geografica) del miele
- 3) Identificazione e caratterizzazione di patogeni e parassiti delle api
- 4) La firma del DNA ambientale nel miele



- 1) **Identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera***
- 2) Determinazione dell'origine botanica (e geografica) del miele
- 3) Identificazione e caratterizzazione di patogeni e parassiti delle api
- 4) La firma del DNA ambientale nel miele

1) Identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera*

Food Control 91 (2018) 294–301



Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont



Authentication of honey based on a DNA method to differentiate *Apis mellifera* subspecies: Application to Sicilian honey bee (*A. m. siciliana*) and Iberian honey bee (*A. m. iberiensis*) honeys



Valerio Joe Utzeri, Anisa Ribani, Luca Fontanesi*

Department of Agricultural and Food Sciences (DISTAL), Division of Animal Sciences, University of Bologna, Viale Fanin 46, 40127 Bologna, Italy



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

1) Identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera*

Analisi morfometrica

A. m. ligustica



A. m. mellifera



A. m. siciliana



A. m. carnica X *A. m. ligustica*



Foto da
Fontana et al. (2018)

1) Identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera*

Analisi morfometrica

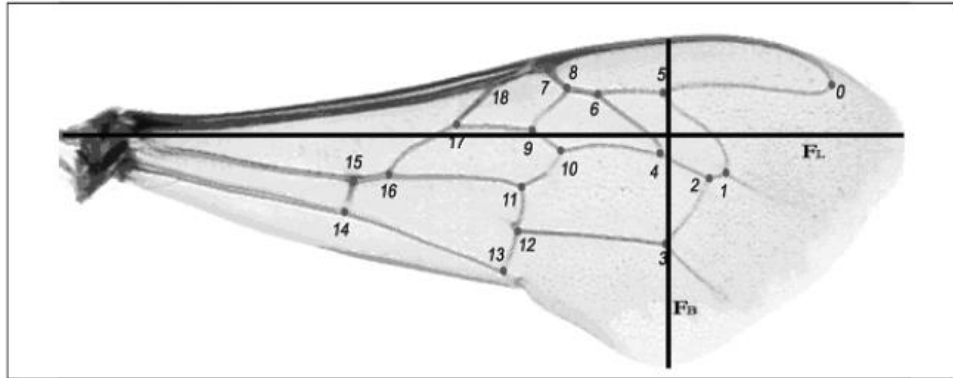
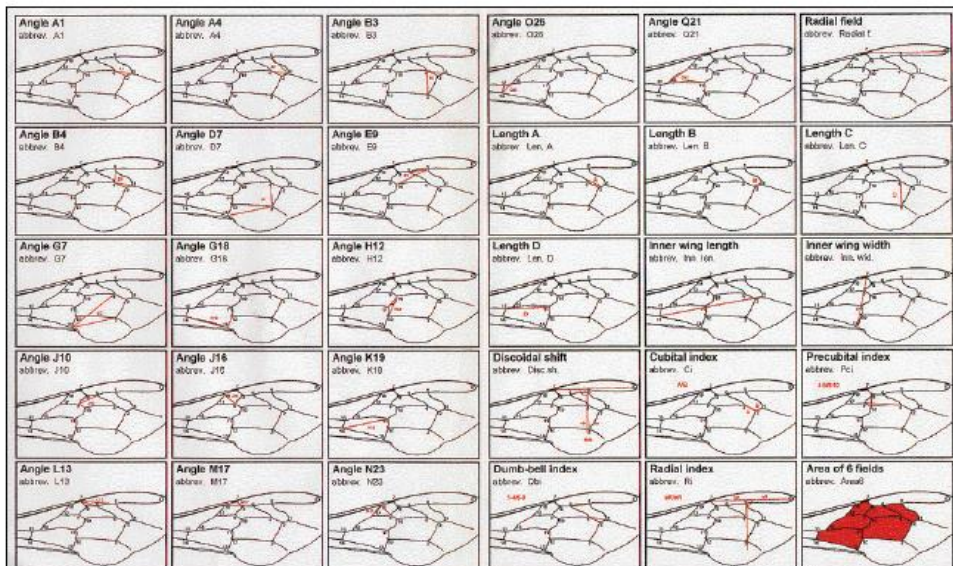


Fig. 3. Morphometric analyses used in Italy: Wing points (0 to 18) are manually acquired, whilst wing length (F_L) and width (F_B) are measured by stereomicroscope.



From Bouga et al. 2011

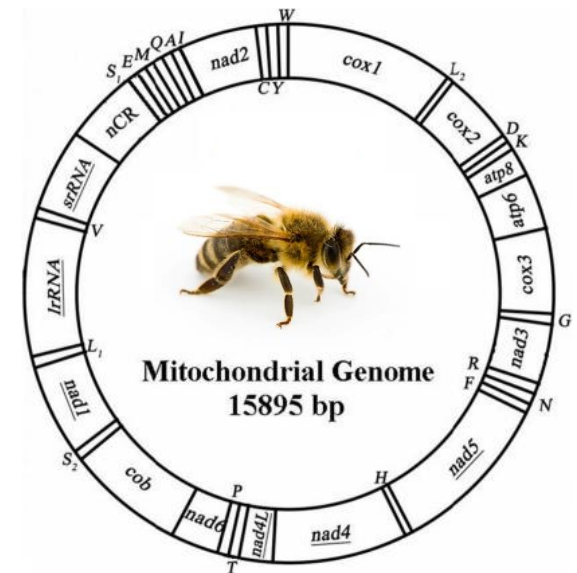


ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

1) Identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera*

3 principali linee mitocondriali in Europa:

A, C, M



***Apis mellifera* mtDNA**



1) Identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera*



From Ruttner, 1988

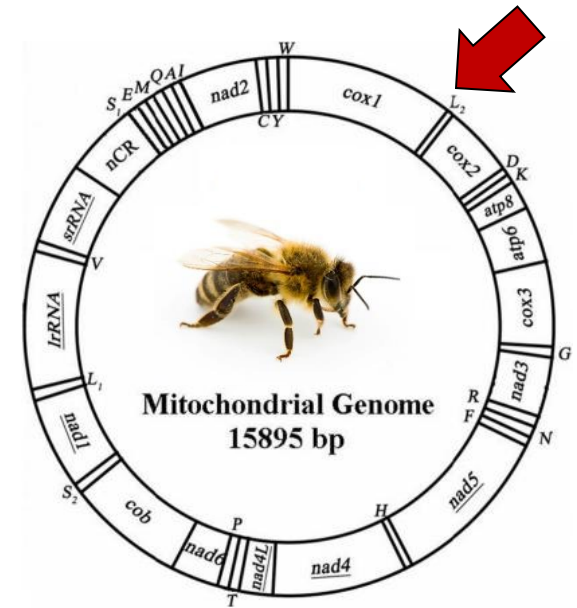


1) Identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera*

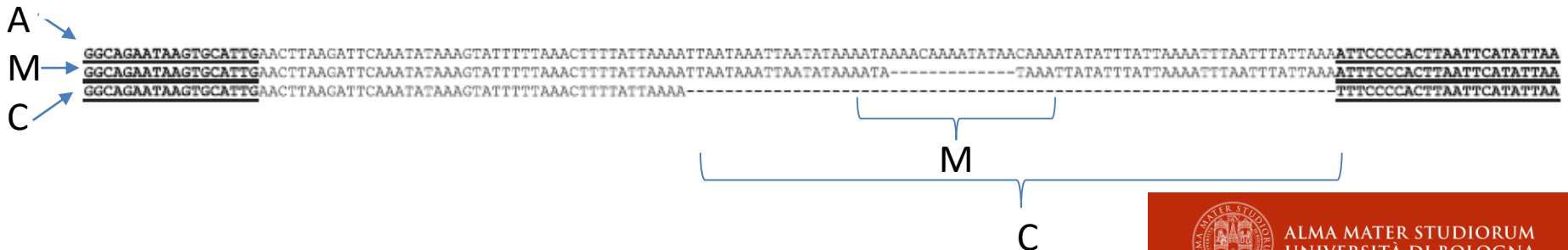
3 principali linee mitocondriali in Europa:

A, C, M

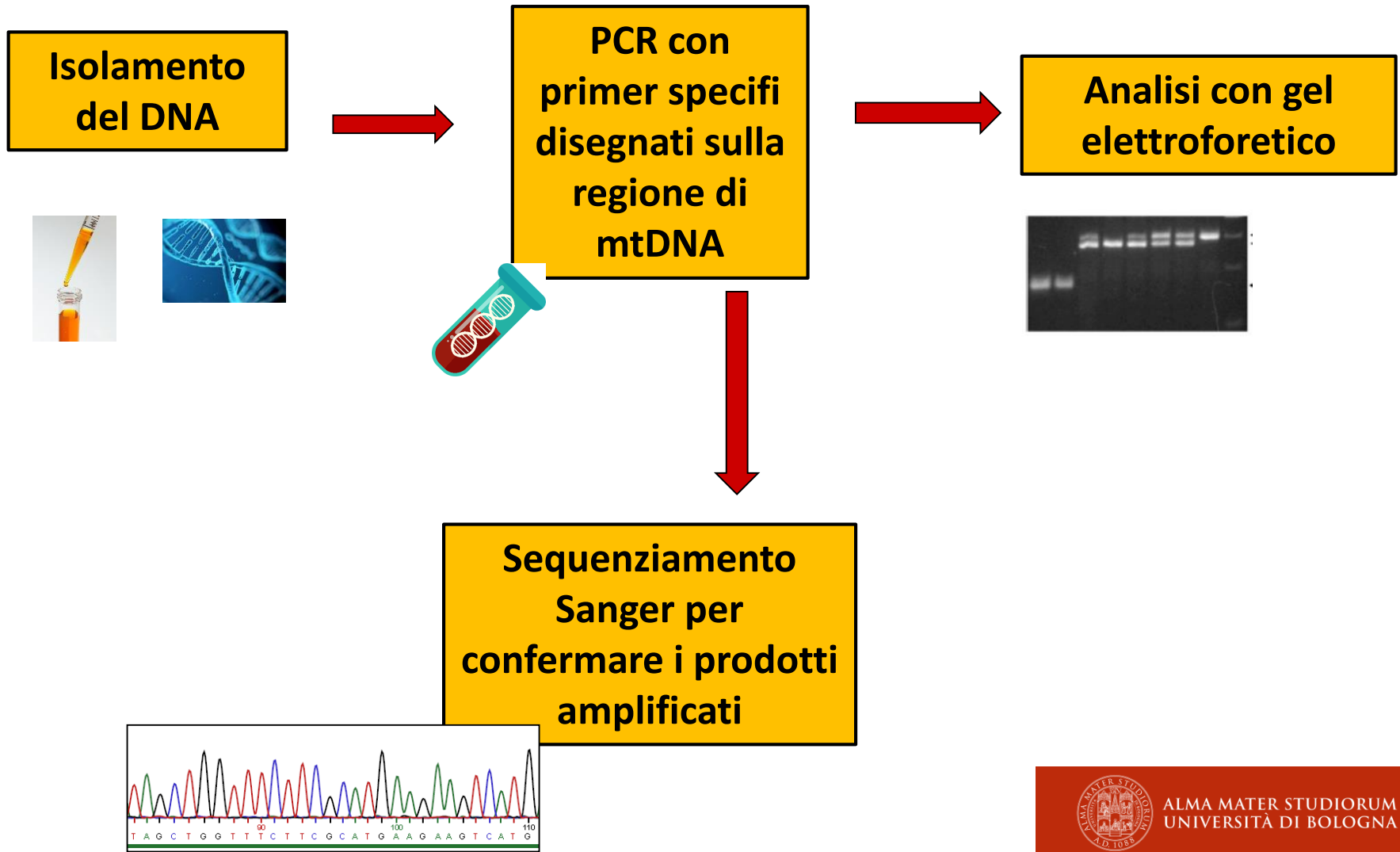
- Diversa lunghezza della regione COI-COII intergenic spacer



***Apis mellifera* mtDNA**



1) Identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera*



1) Identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera*

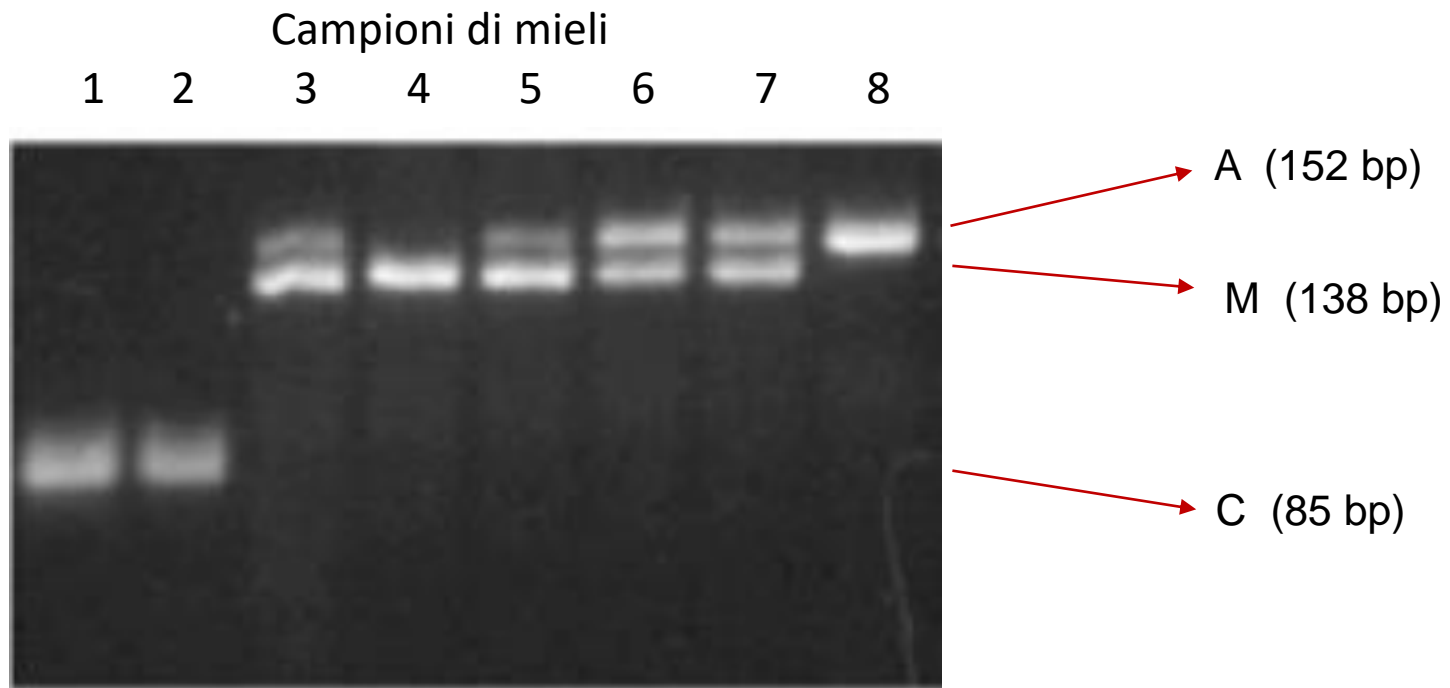


Table 1
Analyzed honeys and amplification results with assigned *Apis mellifera* mitochondrial DNA (mtDNA) lineage.

Progressive no.	Honey denomination	Country of origin	Region of origin	Year of production	Amplified fragment size	mtDNA lineage
1	Chestnut blossom honey	Italy	Piedmont (Novara province; hills)	2015	85 + 138 bp	C and M
2	Forest honeydew honey	Italy	Lombardia (Bergamo province)	2016	85 bp	C
3	Poly-flower honey	Italy	Lombardia (Sondrio province)	2017	85 bp	C
4	Apple tree honey	Italy	Trentino-Alto Adige (Valle dell'Adige, Trento province)	2015	85 bp	C
5	Rhododendron honey	Italy	Trentino Alto-Adige (Bolzano province)	2016	85 bp	C
6	Forest honeydew honey	Italy	Trentino Alto Adige (Bolzano province)	2017	85 bp	C
7	Forest honeydew honey	Italy	Veneto (Verona province)	2017	85 bp	C
8	Oak honeydew honey	Italy	Veneto (Verona province)	2017	85 bp	C
9	Linden/Lime Tree (Tilia) honey	Italy	Friuli-Venezia-Giulia (Udine province)	2015	85 bp	C
10	Forest honeydew honey	Italy	Emilia Romagna (Forlì-Cesena province)	2015	85 bp	C
11	Dandelion honey	Italy	Emilia Romagna (Modena province)	2014	85 bp	C
12	Cherry tree blossom honey	Italy	Emilia Romagna (Modena province)	2015	85 bp	C
13	Ailanthus honey	Italy	Emilia Romagna (Bologna province)	2016	85 bp	C
14	Silver Fir honeydew honey	Italy	Emilia Romagna (Foreste Casentinesi, Forlì province)	2014	85 bp	C
15	Alfalfa honey	Italy	Emilia Romagna (Ravenna province)	2016	85 bp	C
16	Sunflower honey	Italy	Tuscany (Pistoia province)	2015	85 bp	C
17	Acacia honey	Italy	Tuscany (Arezzo province)	2015	85 bp	C
18	Coriander honey	Italy	Umbria (Perugia province)	2015	85 bp	C
19	Rapeseed honey	Italy	Abruzzo (Chieti province)	2017	85 + 138 bp	C and M
20	Summer savory honey	Italy	Abruzzo (Majella National Park)	2017	85 bp	C
21	Rockrose honey	Italy	Sardinia (Oristano province)	2015	85 bp	C
22	Cardoon honey	Italy	Sardinia (Cagliari province)	2014	85 bp	C
23	Asphodel honey	Italy	Sardinia (Cagliari province)	2014	85 bp	C
24	Lavender honey	Italy	Sardinia (Nuoro province)	2014	85 bp	C
25, 26	Thistle honey from Sicilian honey bees (2 production batches)	Italy	Sicily (Unknown)	2015–2017	152 bp	A
27, 28, 29	Mediterranean polyfloral honey from Sicilian honey bees (3 production batches)	Italy	Sicily (Unknown)	2016–2017	152 bp	A
30	Giant fennel honey from Sicilian honey bees	Italy	Sicily (Trapani province)	2017	153 bp	A
31	Mediterranean polyfloral honey from Sicilian honey bees	Italy	Sicily (Lampedusa island)	2017	152 bp	A
32	Dill honey from Sicilian honey bees	Italy	Sicily (Filičudi island)	2017	152 bp	A
33	Rosemary honey (Mel do Parque de Montesinho PDO; from Iberian honey bee)	Portugal	Parque de Montesinho	2017	152 + 138 bp	A and M
34	Forest honeydew honey (Mel do Parque de Montesinho PDO; Iberian honey bee)	Portugal	Parque de Montesinho	2017	138 bp	M
35	Chestnut honey (Mel do Parque de Montesinho PDO; from Iberian honey bee)	Portugal	Parque de Montesinho	2017	152 + 138 bp	A and M
36	Polyfloral honey (Mel do Parque de Montesinho PDO; from Iberian honey bee)	Portugal	Parque de Montesinho	2017	152 + 138 bp	A and M
37	Heather honey (Mel do Parque de Montesinho PDO; from Iberian honey bee)	Portugal	Parque de Montesinho	2017	152 + 138 bp	A and M
38	Polyfloral honey (Mel do Ribatejo Norte PDO; from Iberian honey bee)	Portugal	Bairro ecological sub-region of the PDO honey	2016	152 + 138 bp	A and M
39	Heather honey	Portugal	Serra da Malcata Natural Reserve	2017	152 bp	A and M
40	Orange blossom honey	Portugal	Algarve	2017	152 bp	A
41	Rosemary honey	Portugal	Unknown	2017	152 + 138 bp	A and M
42	Anise honey (from Iberian honey bee)	Spain	Comunidad Valenciana	2016	152 bp	A
43	Rosemary honey (from Iberian honey bee)	Spain	Madrid region	2017	152 + 138 bp	A and M
44	Lavender honey (from Iberian honey bee)	Spain	Madrid region	2017	152 + 138 bp	A and M
45	Thyme honey (from Iberian honey bee)	Spain	Madrid region	2017	152 bp	A
46	Almond honey (from Iberian honey bee)	Spain	Alicante, Terragona, Murcia	2017	152 bp	A
47	Loquat honey (from Iberian honey bee)	Spain	Alicante	2017	152 bp	A
48	Orange blossom honey (from Iberian honey bee)	Spain	Comunidad Valenciana	2017	152 bp	A
49	Heather honey (from Iberian honey bee)	Spain	Burgos and Cuenca	2017	152 bp	A
50	Forest honeydew honey	Spain	Unknown	2016	152 + 138 bp	A and M
51	Orange blossom honey	Spain	Unknown	2016	152 + 138 bp	A and M
52	Rosemary honey	Spain	Unknown	2016	85 bp	C
53	Forest honeydew honey (from Iberian honey bee)	Spain	Comunidad Valenciana	2017	152 bp	A
54	Eucalyptus honey (from Iberian honey bee)	Spain	Comunidad Valenciana	2017	152 bp	A
55	Orange blossom honey (from Iberian honey bee)	Spain	Comunidad Valenciana	2017	152 bp	A
56	Rosemary honey (from Iberian honey bee)	Spain	Comunidad Valenciana	2017	152 bp	A
57	Blend of East Europe polyfloral honey	Croatia, Romania, Serbia	Unknown	2015	85 bp	C
58	Poly-flower honey	USA	Colorado	2017	85 bp	C
59	Poly-flower honey	Chile	Valdivia	2015	85 bp	C
60	Manuka honey	New Zealand	Unknown	2017	85 bp	C

20 mieli dalla penisola italiana
C (+ M)

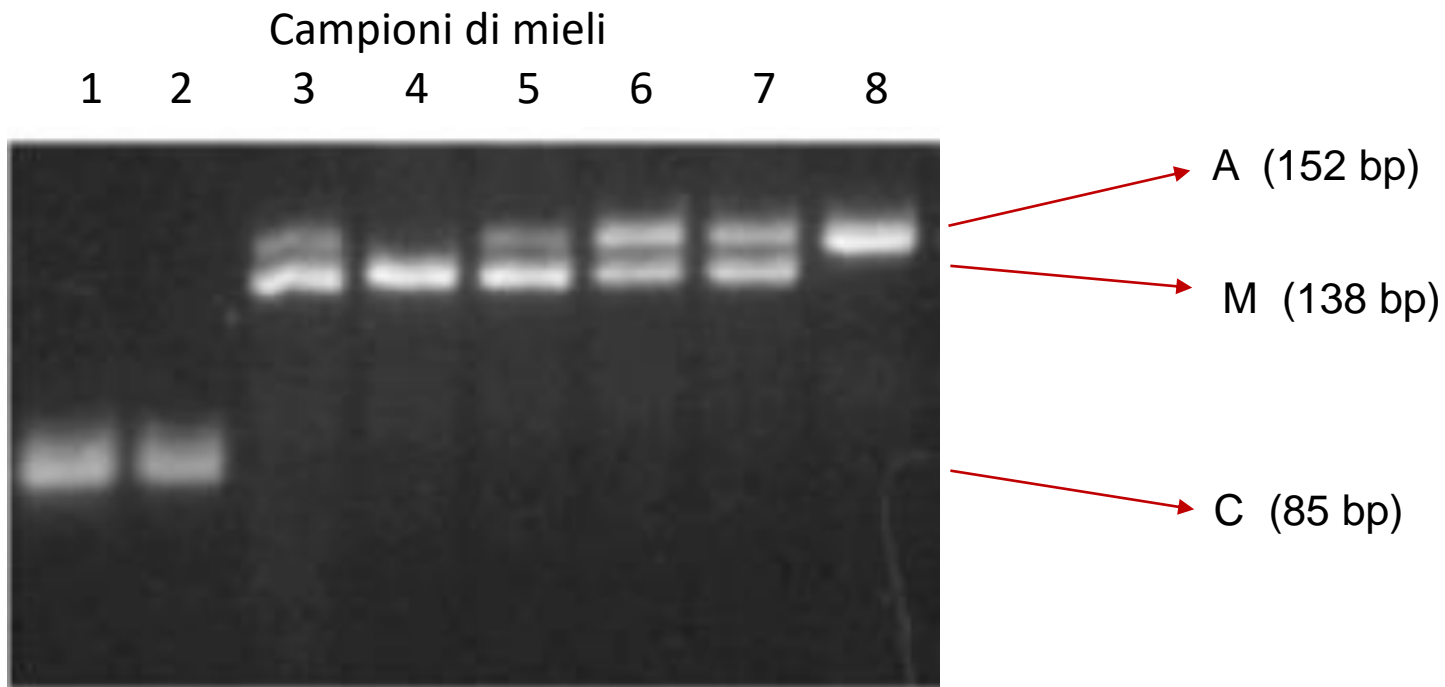
5 mieli dalla Sicilia
A (*A. m. siciliana*)

24 mieli dalla penisola iberica
A e M



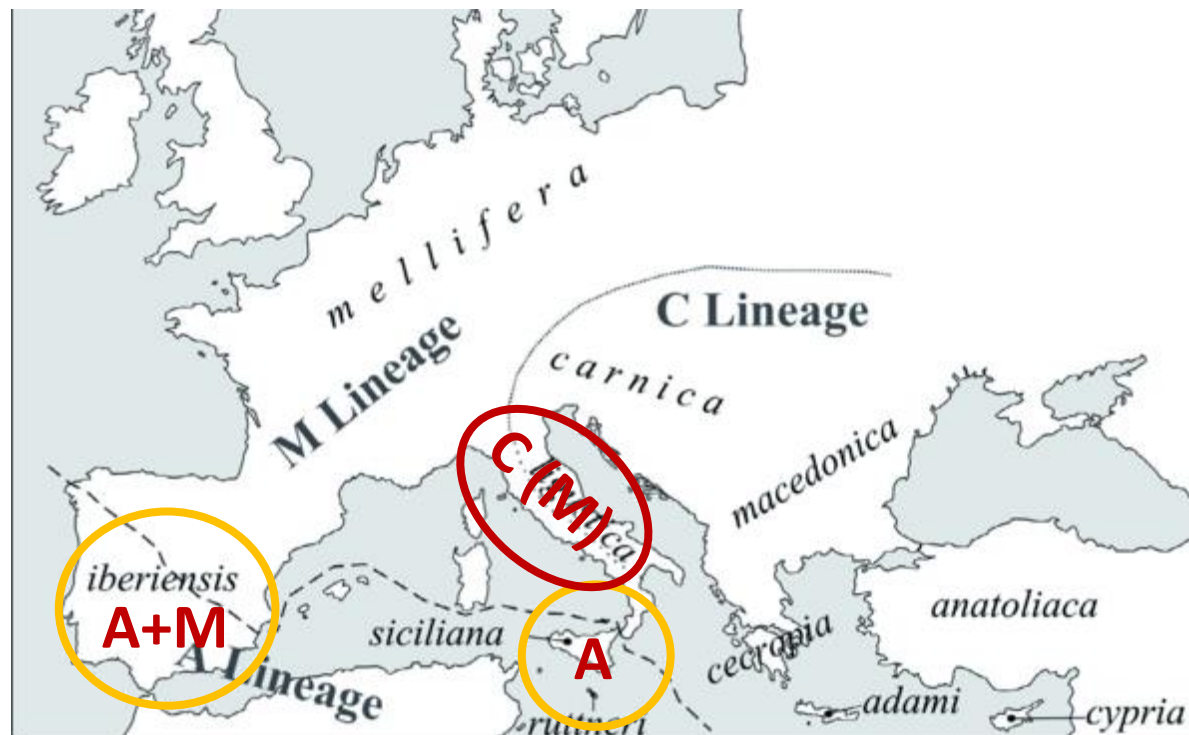
1) Identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera*

Il metodo può essere utilizzato per autenticare l'origine entomologica del miele



1) Identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera*

Il metodo può essere utilizzato per autenticare l'origine entomologica del miele



From Ruttner, 1988



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

1) Identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera*

Il metodo può essere utilizzato per autenticare l'origine entomologica del miele

Ad esempio:

Diversi mieli DOP portoghesi hanno indicato nel disciplinare di produzione anche la sottospecie di *A. mellifera*:

A. m. iberiensis



1) Identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera*

Il metodo può essere utilizzato per autenticare l'origine entomologica del miele

Ad esempio:

Diversi mieli DOP portoghesi hanno indicato nel disciplinare di produzione anche la sottospecie di *A. mellifera*:

A. m. iberiensis

<u>Dossier Number</u>	<u>Designation</u>	<u>Type</u>	<u>Registration date</u>	<u><i>A. m. iberica</i></u>
PT/PDO/0117/0229	Mel de Barroso	DOP	05/05/2005	YES
PT/PDO/0017/0240	Mel do Ribatejo Norte	DOP	23/11/1996	YES
PT/PDO/0017/0222	Mel da Serra da Lousã	DOP	21/06/1996	NO
PT/PDO/0017/0234	Mel do Parque de Montezinho	DOP	21/06/1996	YES
PT/PDO/0017/0244	Mel das Terras Altas do Minho	DOP	21/06/1996	YES
PT/PDO/0017/0245	Mel da Terra Quente	DOP	21/06/1996	YES
PT/PDO/0017/0250	Mel da Serra de Monchique	DOP	21/06/1996	YES
PT/PDO/0017/0252	Mel do Alentejo	DOP	21/06/1996	NO
PT/PDO/0017/0268	Mel dos Açores	DOP	21/06/1996	NO



1) Identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera*

Il metodo può essere utilizzato anche per valutare la diffusione delle diverse linee in un territorio

Dispersion of *Apis mellifera* subspecies in the Emilia Romagna region (North of Italy) estimated using honey DNA analysis

Valerio Joe Utzeri¹, Anisa Ribani¹, Luca Fontanesi¹

In preparation



1) Identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera*

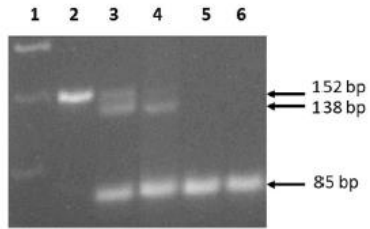


Fig. 14.1 Distribution of honeybee races in S and SE Europe

From Ruttner, 1988

Food Control 91 (2018) 294–301
Contents lists available at ScienceDirect
Food Control
journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont

Authentication of honey based on a DNA method to differentiate *Apis mellifera* subspecies: Application to Sicilian honey bee (*A. m. siciliana*) and Iberian honey bee (*A. m. iberiensis*) honeys

Valerio Joe Utzeri, Anisa Ribani, Luca Fontanesi^{*}
Department of Agricultural and Food Sciences (DISFAS), Division of Animal Sciences, University of Bologna, Viale Risin 46, 40127 Bologna, Italy



1) Identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera*

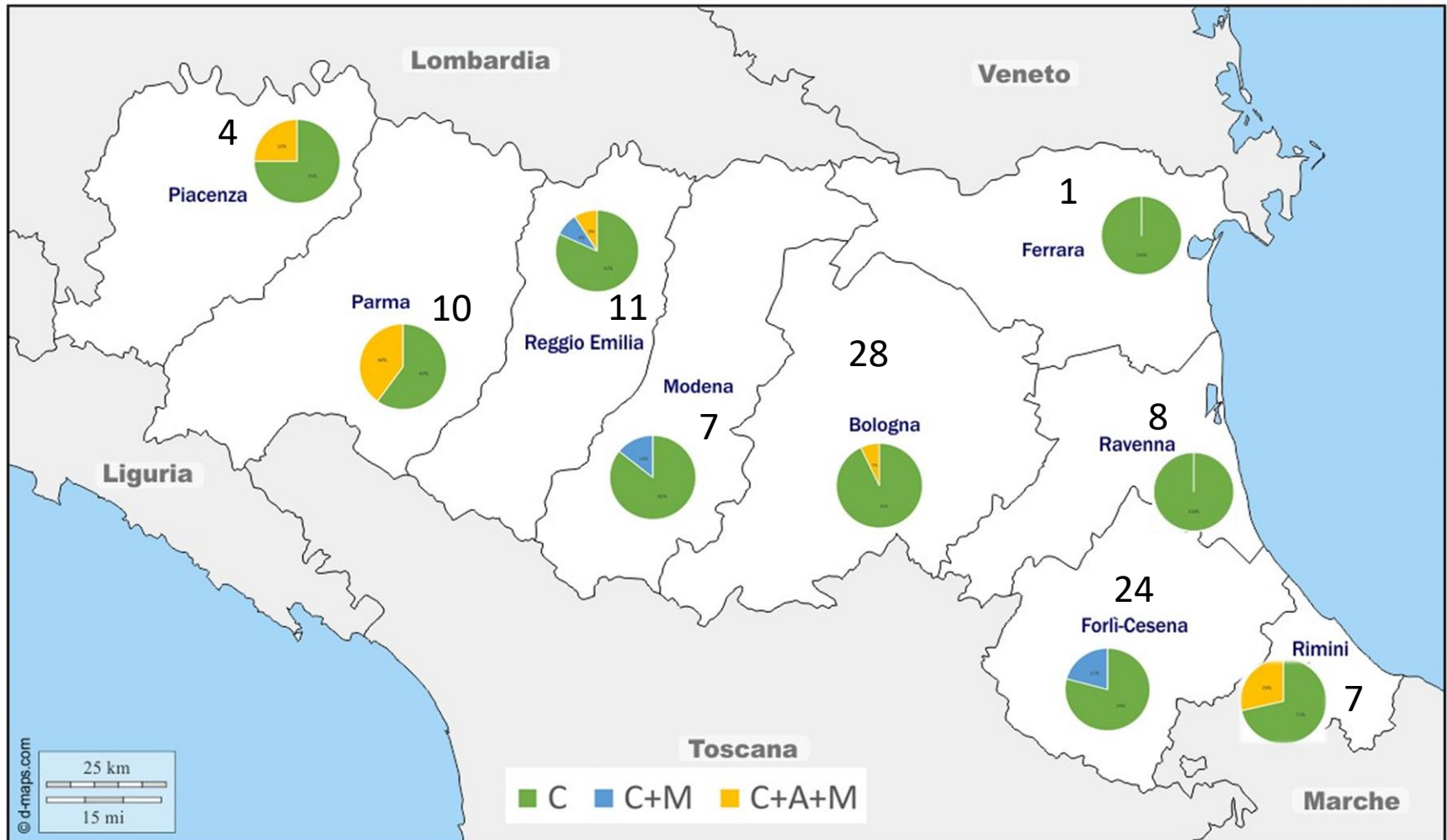
Prima indagine sulla diffusione dei mitotipi di *Apis mellifera* in Emilia Romagna

Province	N. di mieli
Bologna	28
Ferrara	1
Forlì-Cesena	24
Modena	7
Parma	10
Piacenza	4
Ravenna	8
Reggio-Emilia	11
Rimini	7
Totale	100



1) Identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera*

Prima indagine sulla diffusione dei mitotipi di *Apis mellifera* in Emilia Romagna



1) Conclusione

L'analisi del DNA permette di:

- autenticare l'origine entomologica del miele
- stimare la diffusione delle diverse sottospecie di *Apis mellifera* in un territorio in modo semplice e rapido

Può essere uno strumento per valorizzare le produzioni da *ligustica*



1) Identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera*

Sfida 2: Frodi

2) Determinazione dell'origine botanica (e geografica) del miele

3) Identificazione e caratterizzazione di patogeni e parassiti delle api

4) La firma del DNA ambientale nel miele



2) Determinazione dell'origine botanica (e geografica) del miele

Food Control 86 (2018) 342–349



Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: 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 ^a, Anisa Ribani ^a, Giuseppina Schiavo ^a, Francesca Bertolini ^{a, b},
Samuele Bovo ^{a, c}, Luca Fontanesi ^{a, *}

^a Department of Agricultural and Food Sciences (DISTAL), University of Bologna, Viale Fanin 46, 40127 Bologna, Italy

^b Department of Animal Science, Iowa State University, 2255 Kildee Hall, 50011 Ames, Iowa, USA

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



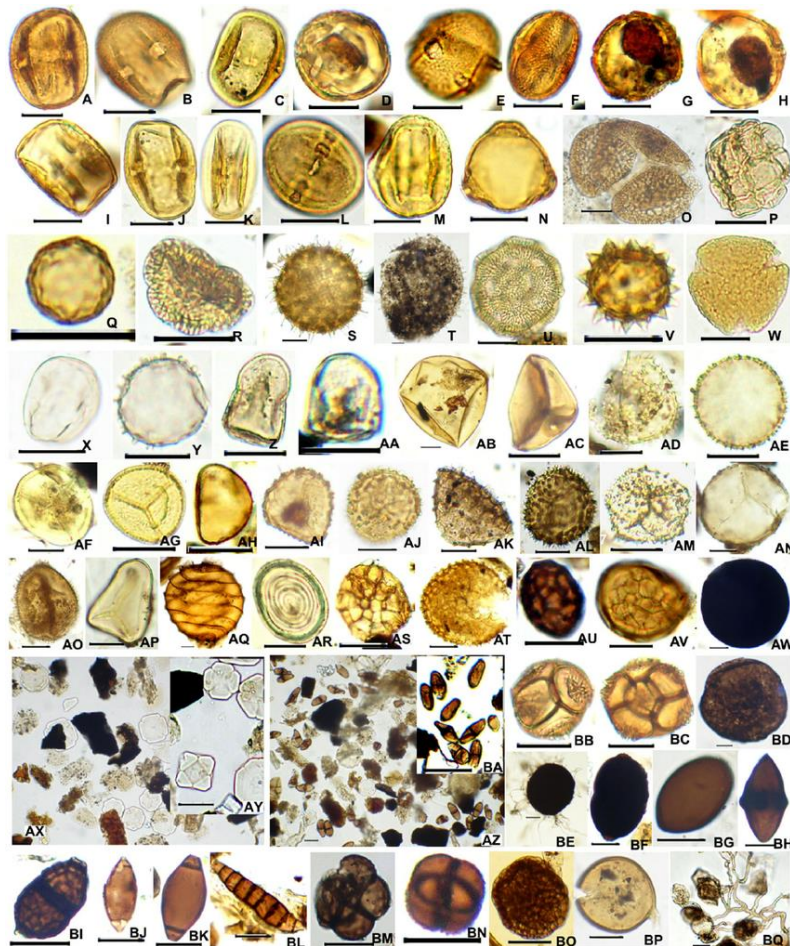
ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

2) Determinazione dell'origine botanica (e geografica) del miele



- Monoflorale
- Poliflorale (millefiori)

2) Determinazione dell'origine botanica (e geografica) del miele

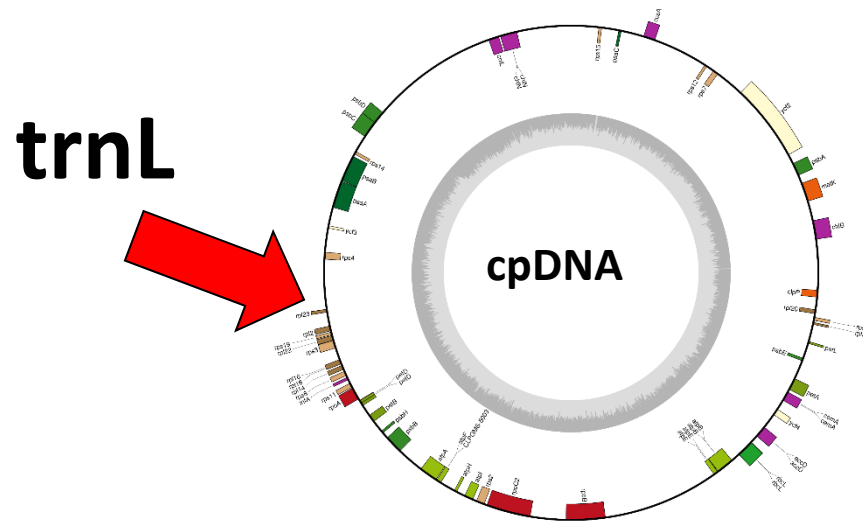


Melissopalynologia



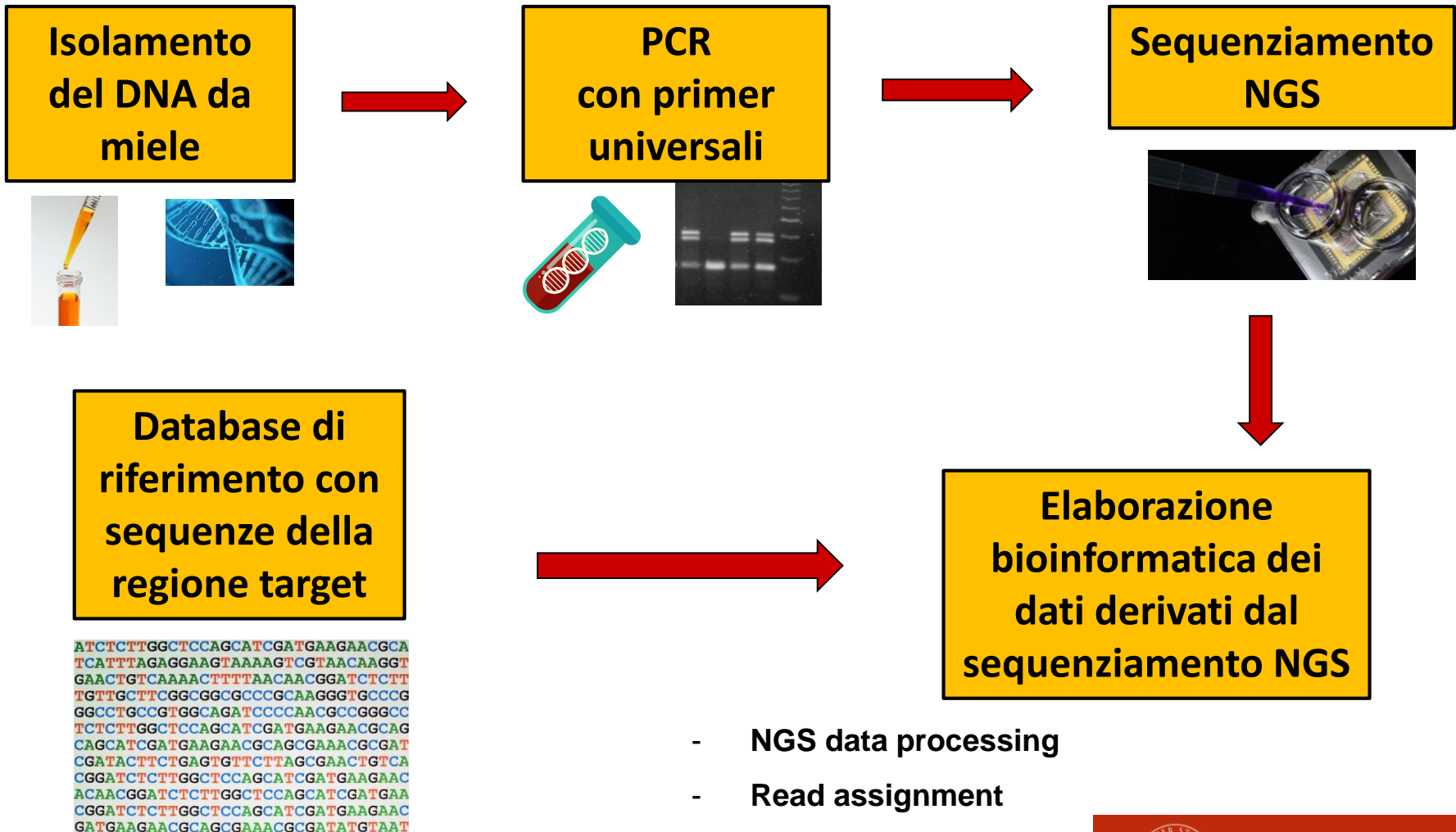
2) Determinazione dell'origine botanica (e geografica) del miele

Barcoding



**DNA delle piante
(DNA cloroplastico)**

2) Determinazione dell'origine botanica (e geografica) del miele



```
ATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAACGCA  
TCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAAACAAGGT  
GAACGTGCAAACTTTAAACAACGGATCTCTT  
TGTGCTTCGGCGGGGCCCAAGGGTGCCCG  
GGCCTGCCGTGGCAGATCCCCAACGCCGGCC  
TCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAACGCAG  
CAGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACCGGAT  
CGATACTTCTGAGTGTCTTCTAGCGAACTGTCA  
CGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAAC  
ACAAACGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAA  
CGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAAC  
GATGAAGAACCGAGCGAAACCGGATATGTAAT
```

2) Determinazione dell'origine botanica (e geografica) del miele

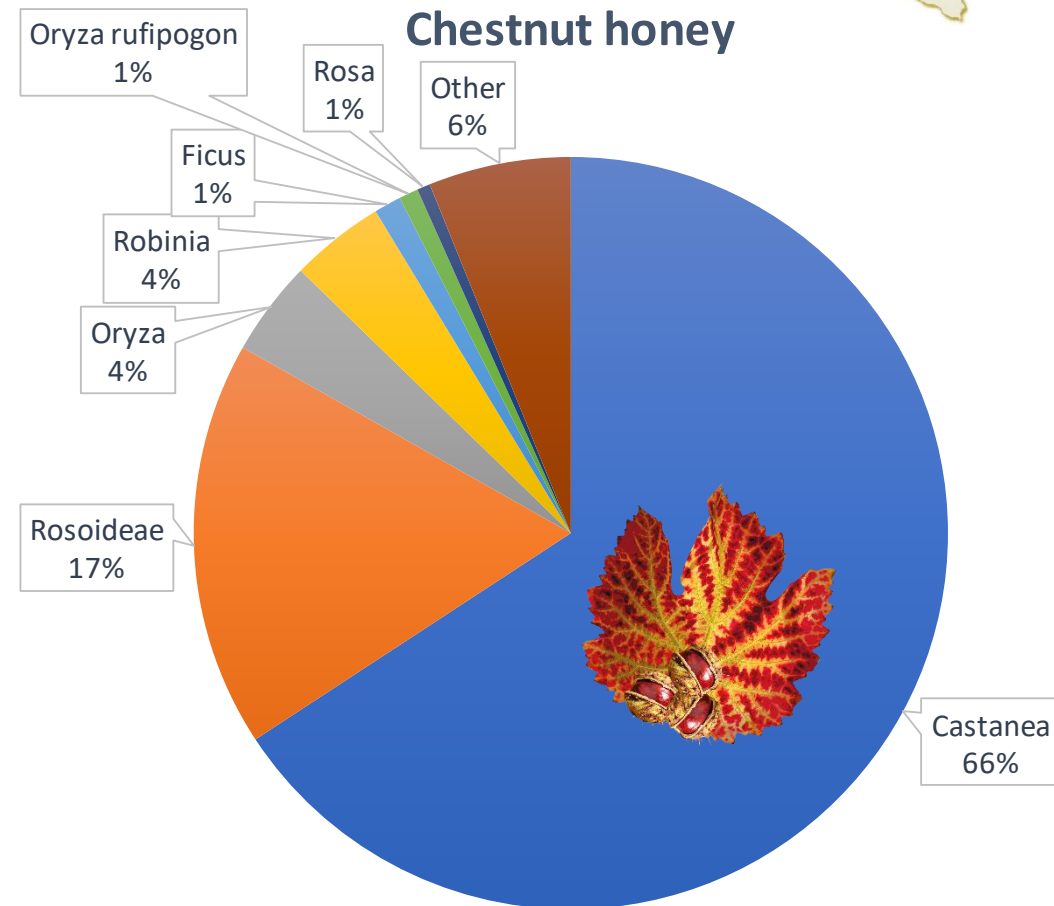
Tipo di miele	Nazione	Regione	Anno di produzione	N. totale di read	N. di gruppi botanici
Castagno	Italia	Piemonte (Novara)	2015	3014	59
Melo	Italia	Trentino-Alto Adige (Valle dell'Adige, Trento)	2015	5403	47
Eucalipto	Italia	Calabria (Catanzaro)	2015	3925	74
Tiglio	Italia	Friuli-Venezia-Giulia (Udine)	2015	16948	72
Acacia	Italia	Toscana (Arezzo)	2015	5790	71
Arancio	Italia	Sicilyia (Caltanissetta)	2014	1467	37
Millefiori	Croatia, Romania, Serbia	-	2015	6300	58
Millefiori	Cile	Valvidia	2015	6958	48
Melata di abete bianco	Italia	Emilia Romagna (Foreste Casentinesi, Forlì)	2014	2714	52

2) Determinazione dell'origine botanica (e geografica) del miele



Miele di Castagno

- 59 gruppi botanici
- **66% *Castanea* genus**

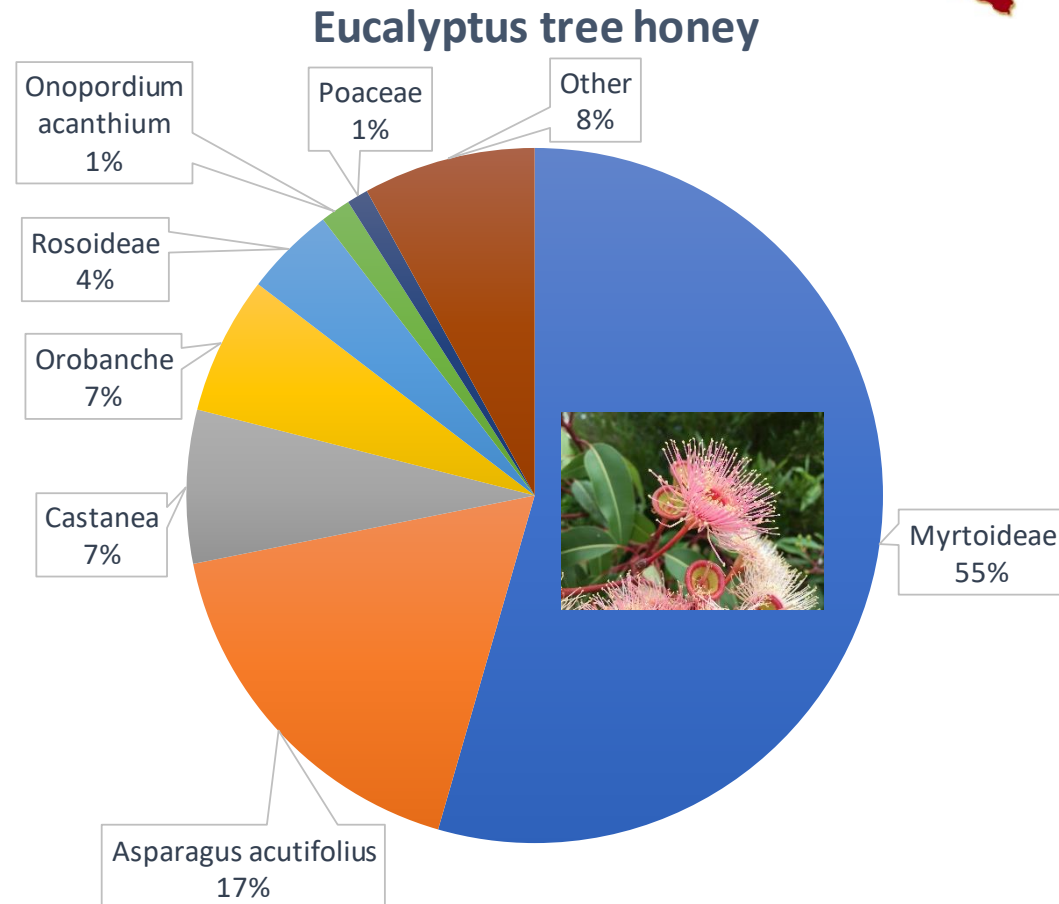


2) Determinazione dell'origine botanica (e geografica) del miele

Miele di Eucalipto



- Il più alto numero di gruppi botanici (74)
- 55% sottofamiglia Myrtoideae (che comprende *Eucalyptus*)
- Diversi taxa tipici della vegetazione mediterranea (*Asparagus* and *Onopordium*)

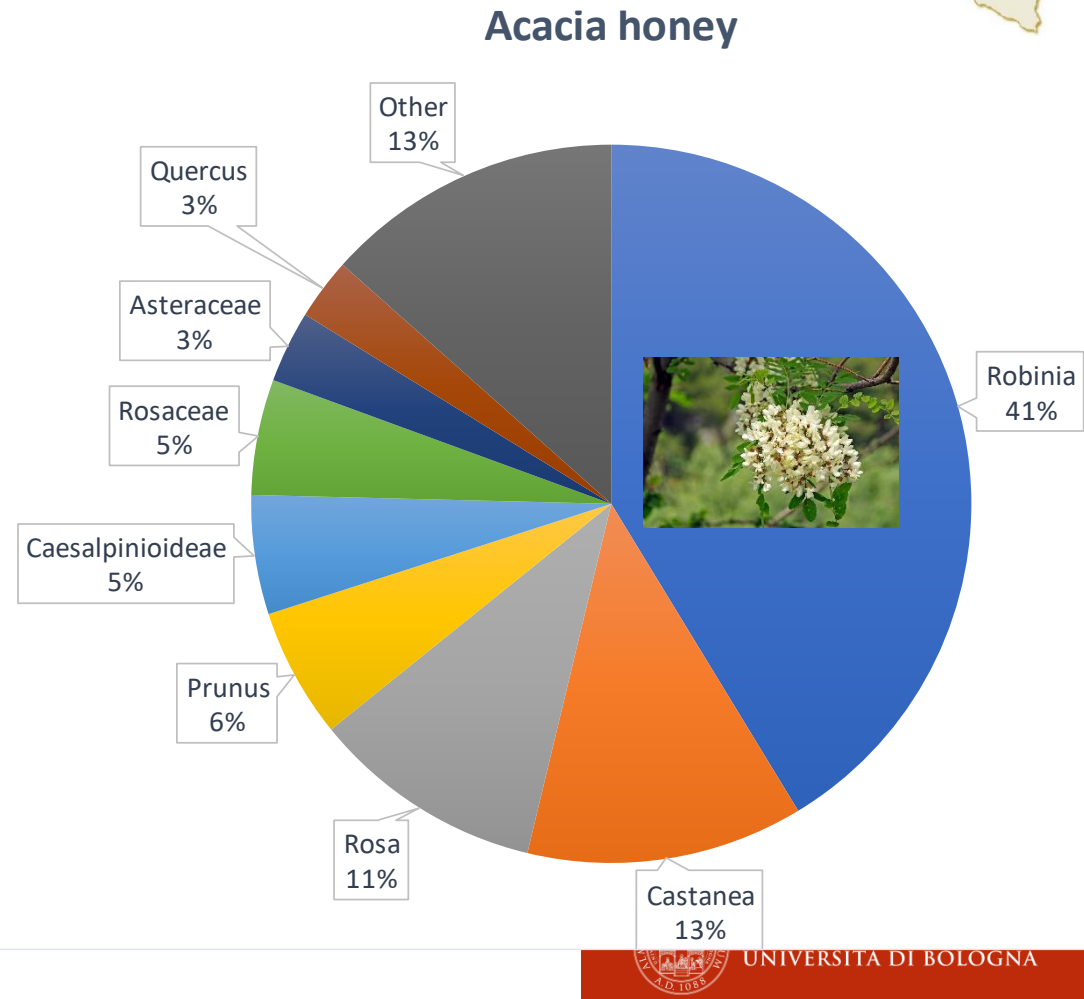


2) Determinazione dell'origine botanica (e geografica) del miele

Miele di Acacia



- 71 gruppi botanici
- 41% *Robinia*
- Altri gruppi botanici tipici della Toscana

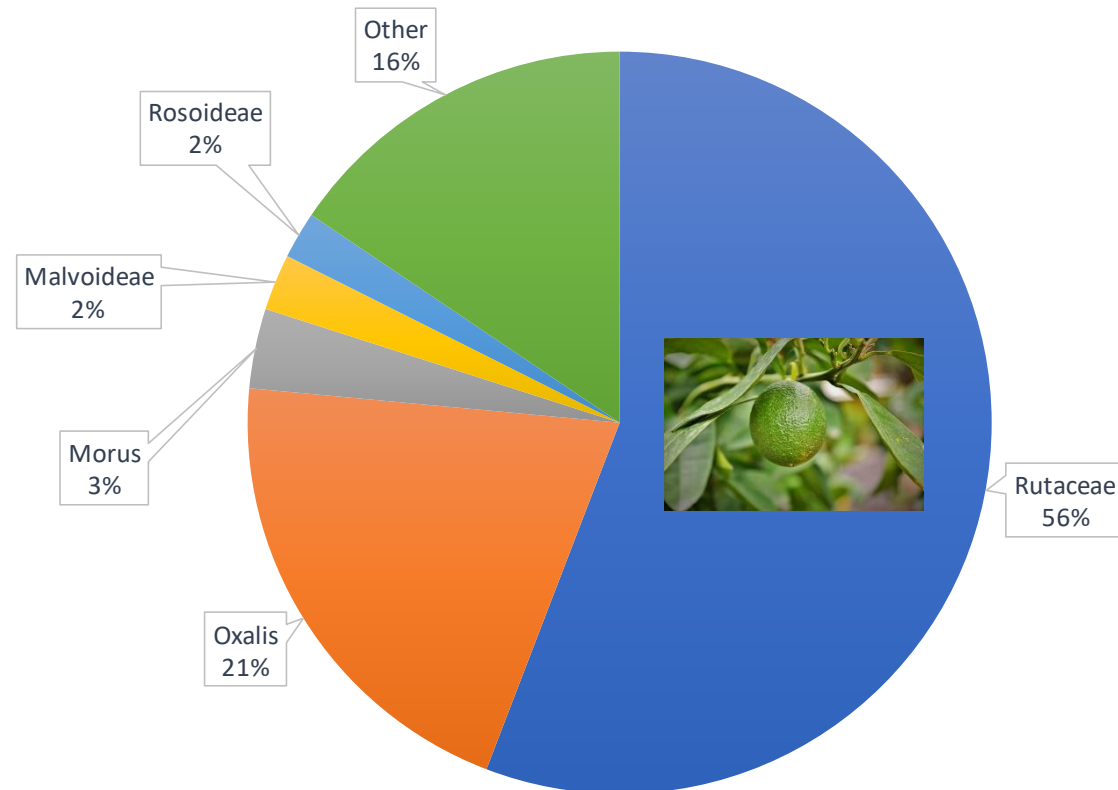


2) Determinazione dell'origine botanica (e geografica) del miele

Miele di Arancio



Orange tree honey



- Il più basso numero di gruppi botanici (37)

- 56% Rutaceae (che include *Citrus*)

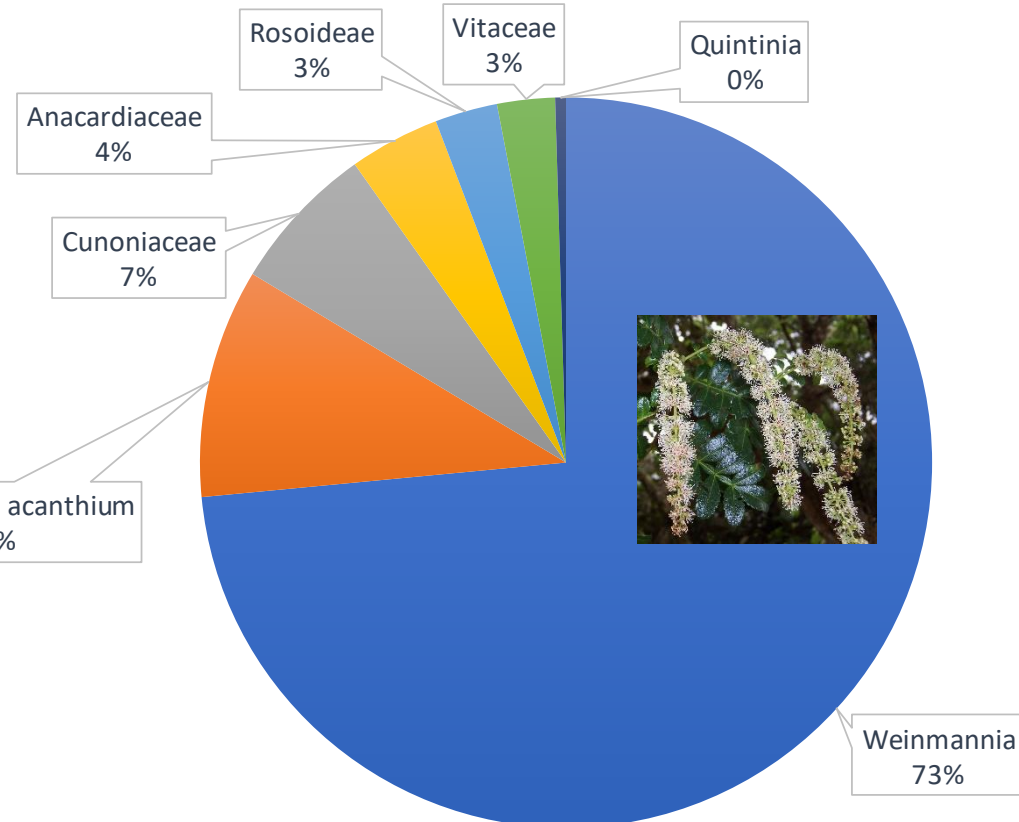
- 21% *Oxalis*, 3% *Morus* e altri gruppi botanici tipici della flora siciliana

2) Determinazione dell'origine botanica (e geografica) del miele

Miele Millefiori – Cile (Valdivia)



Chile honey



- 73% *Weinmannia* genus (famiglia delle **Cunoniaceae**)

- 4% **Anacardiaceae**

- Identificazione di *Gaultheria nubigena* → IUCN Red List

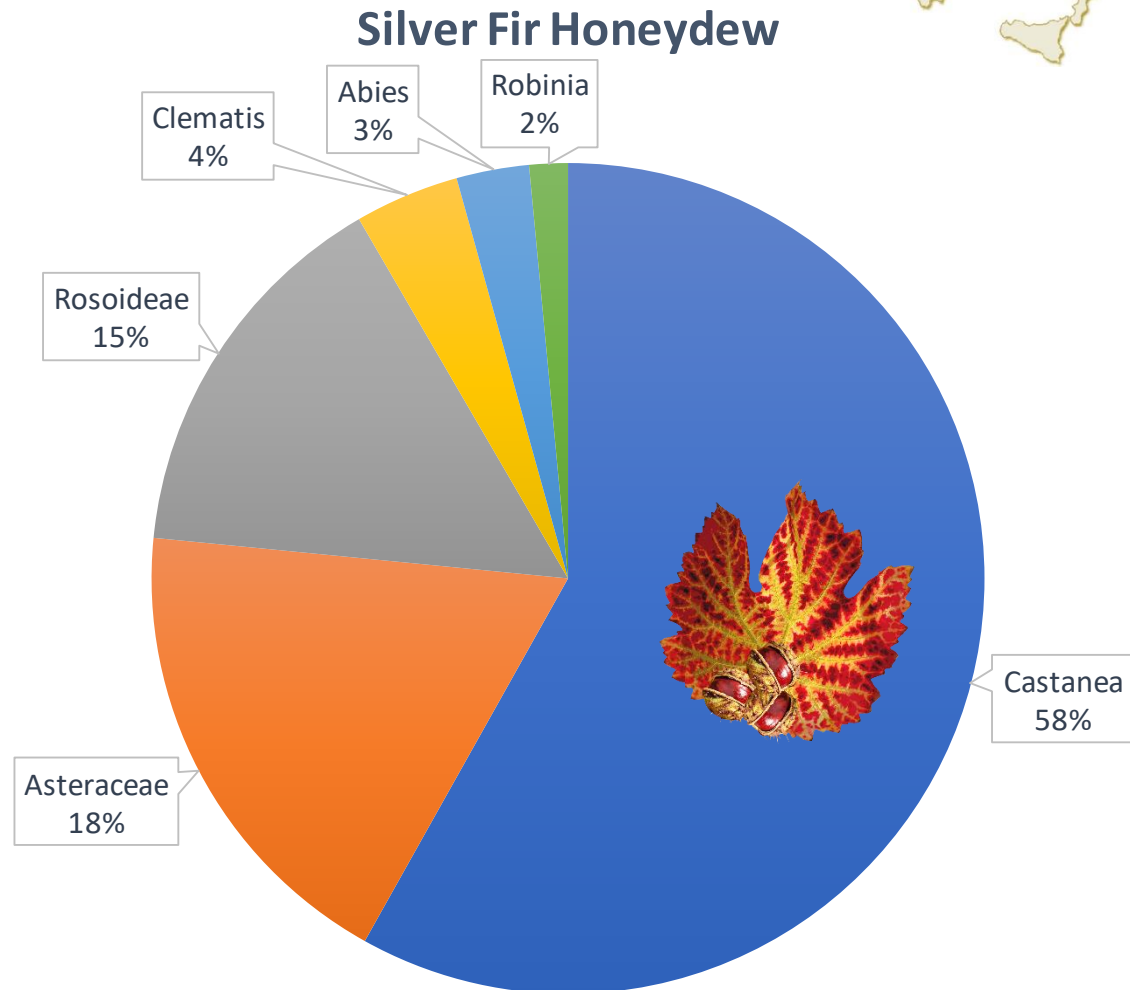


2) Determinazione dell'origine botanica (e geografica) del miele

Miele di Melata di Abete Bianco



- 52 gruppi botanici
- 58% *Castanea*
- 3% *Abies* – conferma l'origine botanica



2) Conclusione

L'analisi del DNA permette di definire l'origine botanica (e quindi indirettamente anche geografica) del miele e di ottenere una fotografia della biodiversità vegetale



1) Identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera*

2) Determinazione dell'origine botanica (e geografica) del miele

Sfida 3: Malattie/Avversità

3) Identificazione e caratterizzazione di patogeni e parassiti delle api

4) La firma del DNA ambientale nel miele



3) Identificazione e caratterizzazione di patogeni e parassiti delle api

Honey as a source of environmental DNA for the monitoring of the hive pathosphere

Anisa Ribani^a, Valerio Joe Utzeri^a, Luca Fontanesi^{a,*}

In preparation

11 diversi patogeni / parassiti

.....



Patogeno /parassita (specie)	Malattia / Avverità	Regione del DNA analizzata	N. di coppie di primer	Bibliografia (per disegno dei primer)
<i>Varroa destructor</i>	Varroasi	Cox1, cox3, cytb (mtDNA)	8	Questo studio
<i>Tropilaelaps spp.</i>	Acariosi	Cox1 (mtDNA)	1	Questo studio
<i>Acarapis woodi</i>	Acariosi respiratoria	Cox1 (mtDNA)	2	Kojima et al. (2011), Garrido-Bailòn et al. (2012)
<i>Galleria mellonella</i>	(Tarma della cera)	Cox1 (mtDNA)	2	Questo studio
<i>Nosema ceranae</i>	Nosemiasi	16S (mtDNA)	3	Chen et al. (2009), Guzman-Novoa et al. (2011), Fries et al. (2013)
<i>Nosema apis</i>	Nosemiasi	16S (mtDNA)	3	Chen et al. (2009), Guzman-Novoa et al. (2011), Fries et al. (2013)
<i>Ascospaera apis</i>	Covata calcificata	18S rRNA (nuclear)	1	Garrido-Bailòn et al. (2013)
<i>Lotmaria passim</i>	(tripanosomiasi)	Cytb (mtDNA)	1	Stevanovic et al. (2016)
<i>Crithidia mellificae</i>	(tripanosomiasi)	Cytb (mtDNA)	1	Stevanovic et al. (2016)
<i>Paenibacillus larvae</i>	Peste americana	16S	2	Bakonyi et al. (2003), Han et al. (2008)
<i>Melissococcus plutonius</i>	Peste europea	sodA, NapA, 16S rRNA	3	Roetschi et al. (2008), Arai et al. (2014), Garrido-Bailòn et al. (2013)



Varroa destructor



Aschospaera apis



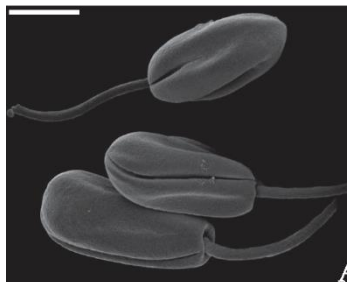
Tropilaelaps spp.
(*T. clarae*, *T. mercedesae*)



Lotmaria passim



Acarapis woodi



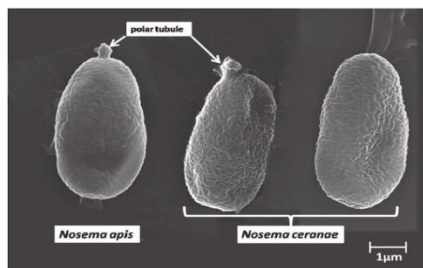
Crithidia mellificae



Galleria mellonella



Paenibacillus larvae

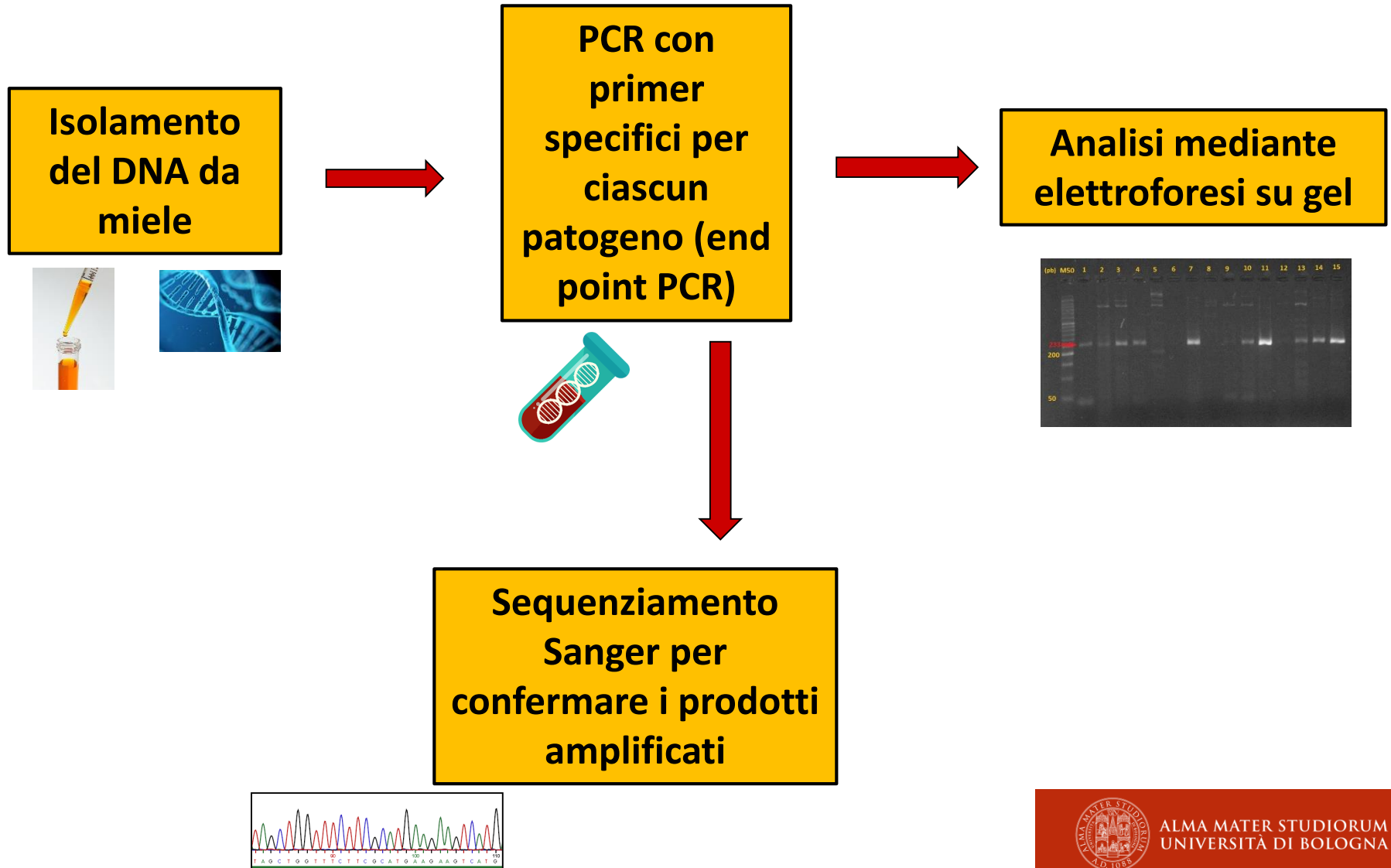


Nosema

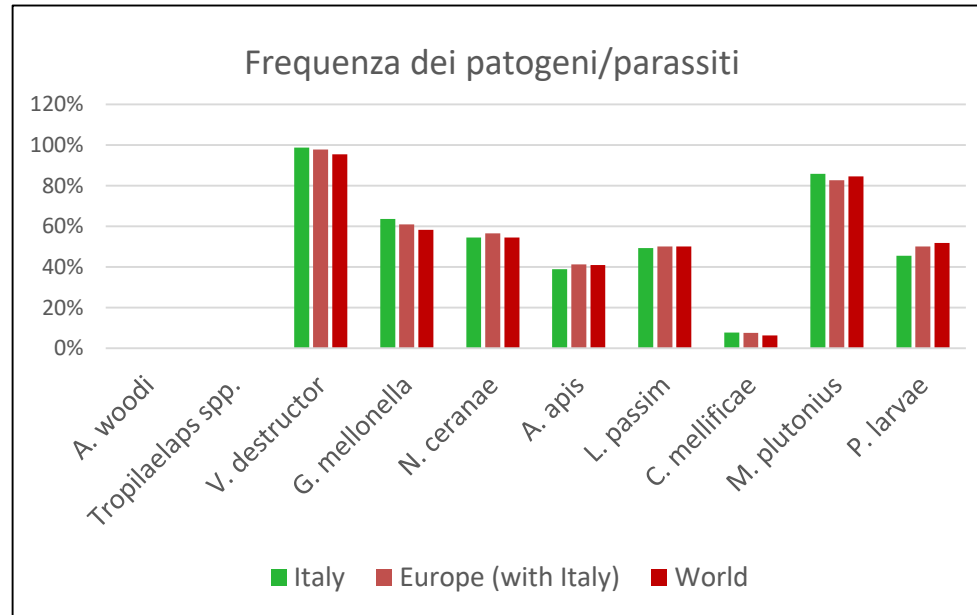


Melissococcus plutonius

3) Identificazione e caratterizzazione di patogeni e parassiti delle api



3) Identificazione e caratterizzazione di patogeni e parassiti delle api



3) Identificazione e caratterizzazione di patogeni e parassiti delle api (*Varroa* spp.)

A next generation sequencing approach for targeted *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) mitochondrial DNA analysis based on honey derived environmental DNA

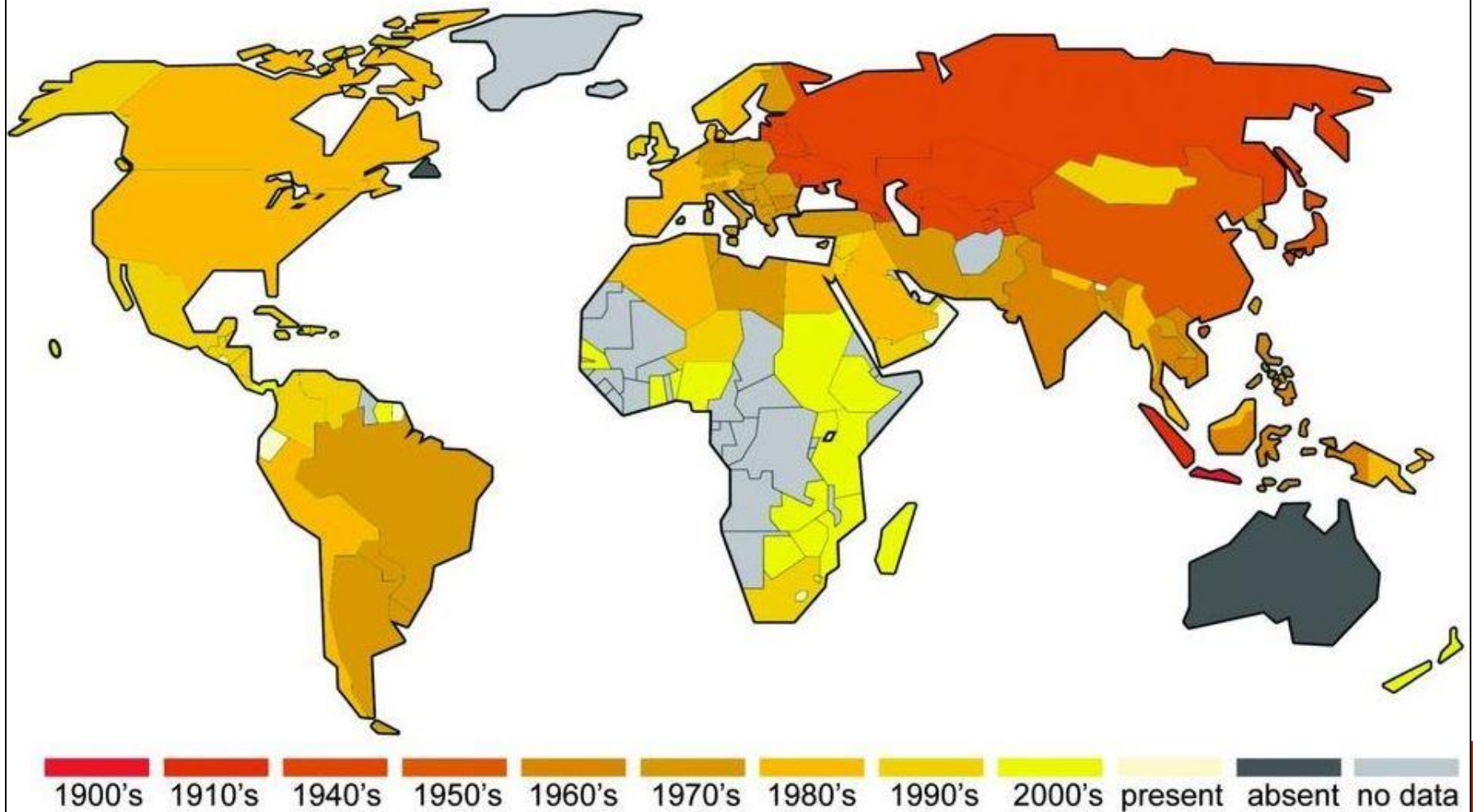
Valerio Joe Utzeri^{1§}, Giuseppina Schiavo^{1§}, Anisa Ribani^{1§}, Francesca Bertolini^{1,2},
Samuele Bovo¹, Luca Fontanesi^{1*}

Submitted to Journal of Invertebrate Pathology



3) Identificazione e caratterizzazione di patogeni e parassiti delle api (*Varroa* spp.)

Distribuzione mondiale di *Varroa destructor* su *Apis mellifera*



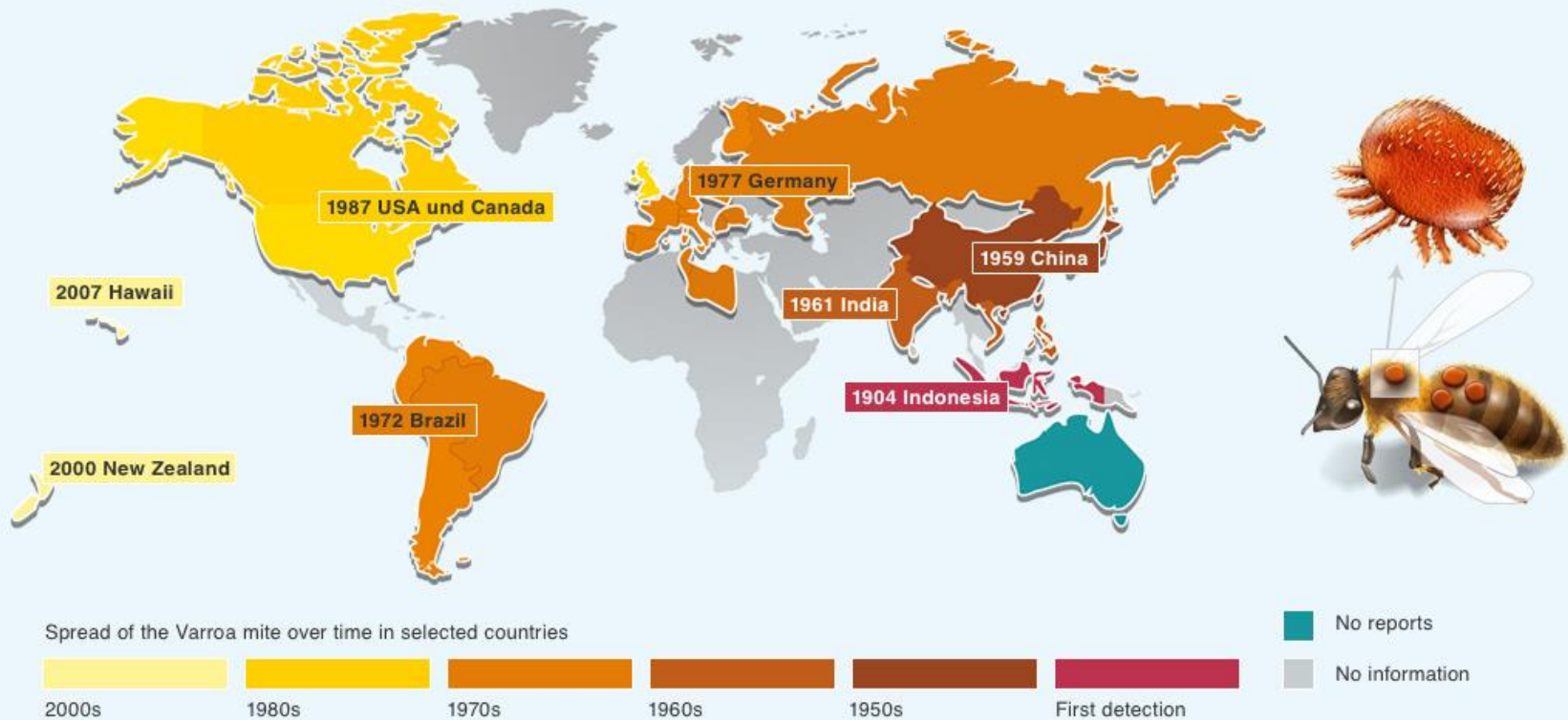
3) Identificazione e caratterizzazione di patogeni e parassiti delle api (*Varroa* spp.)

Mieli analizzati

N.	Mieli	Paese di origine	Regione	Anno di prod.
1	Melata di Abete Bianco	Italia	Piemonte	2015
2	Melata di foresta	Italia	Trentino Alto-Adige	2015
3	Melata di Quercia	Italia	Veneto	2015
4	Melata di Foresta	Italia	Veneto	2015
5	Eucalipto	Italia	Calabria	2016
6	Tiglio	Italia	Sardegna	2015
7	Lavanda	Francia	Provenza	2017
8	Millefiori	Paesi Bassi	-	2017
9	Timo	Grecia	Lefkada island	2017
10	Millefiori	Etiopia	-	2016
11	Millefiori	India	-	2016
12	Millefiori	Cina	Dongbei	2017
13	Millefiori	Giappone	Kyoto area	2016
14	Millefiori	USA	Colorado	2016
15	Millefiori	Guatemala	-	2016
16	Millefiori	Cile	Valvidia	2015
17	Millefiori	Brasile	-	2017

3) Identificazione e caratterizzazione di patogeni e parassiti delle api (*Varroa* spp.)

Mite migration

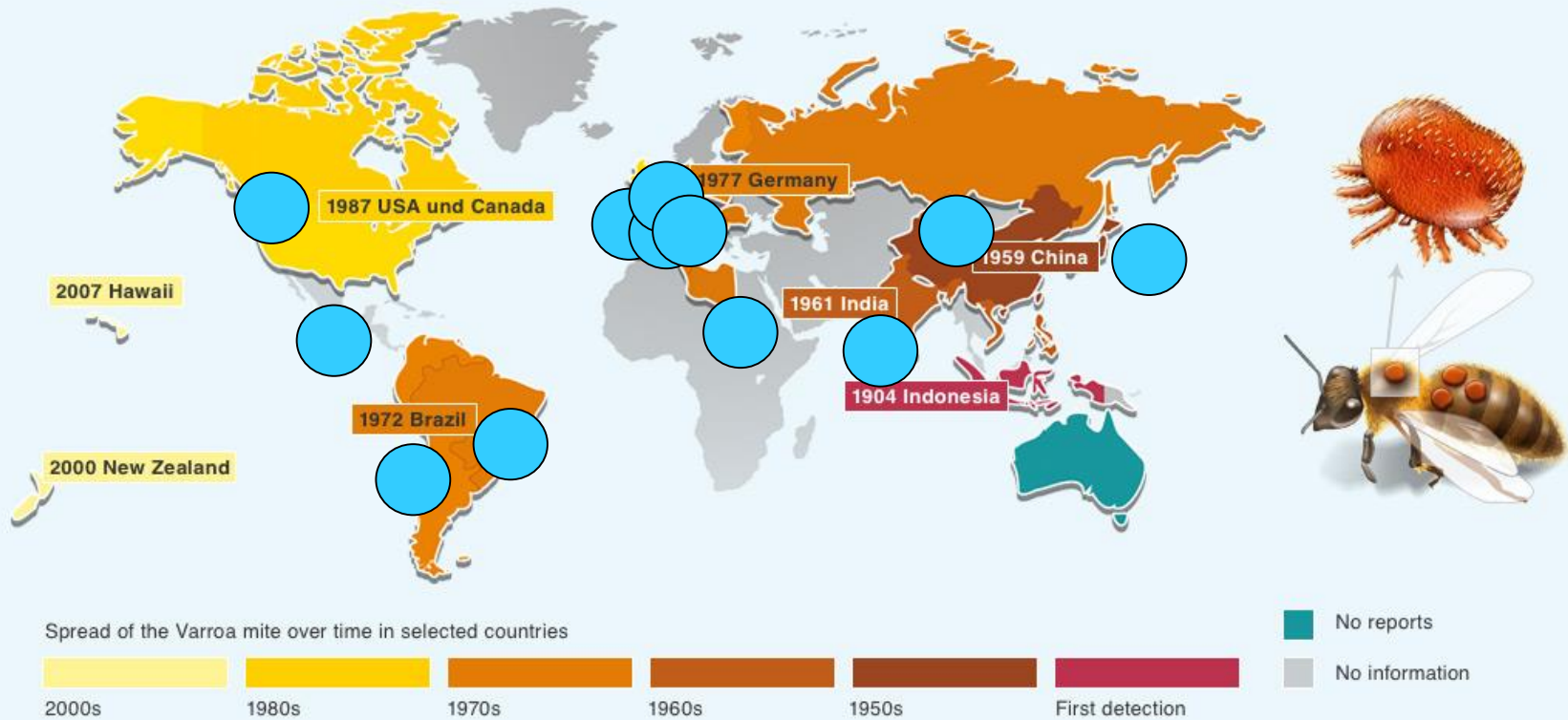


Source: After Webster TC, Delaplane KS 2001, *Mites of the Honey Bee*



3) Identificazione e caratterizzazione di patogeni e parassiti delle api (*Varroa* spp.)

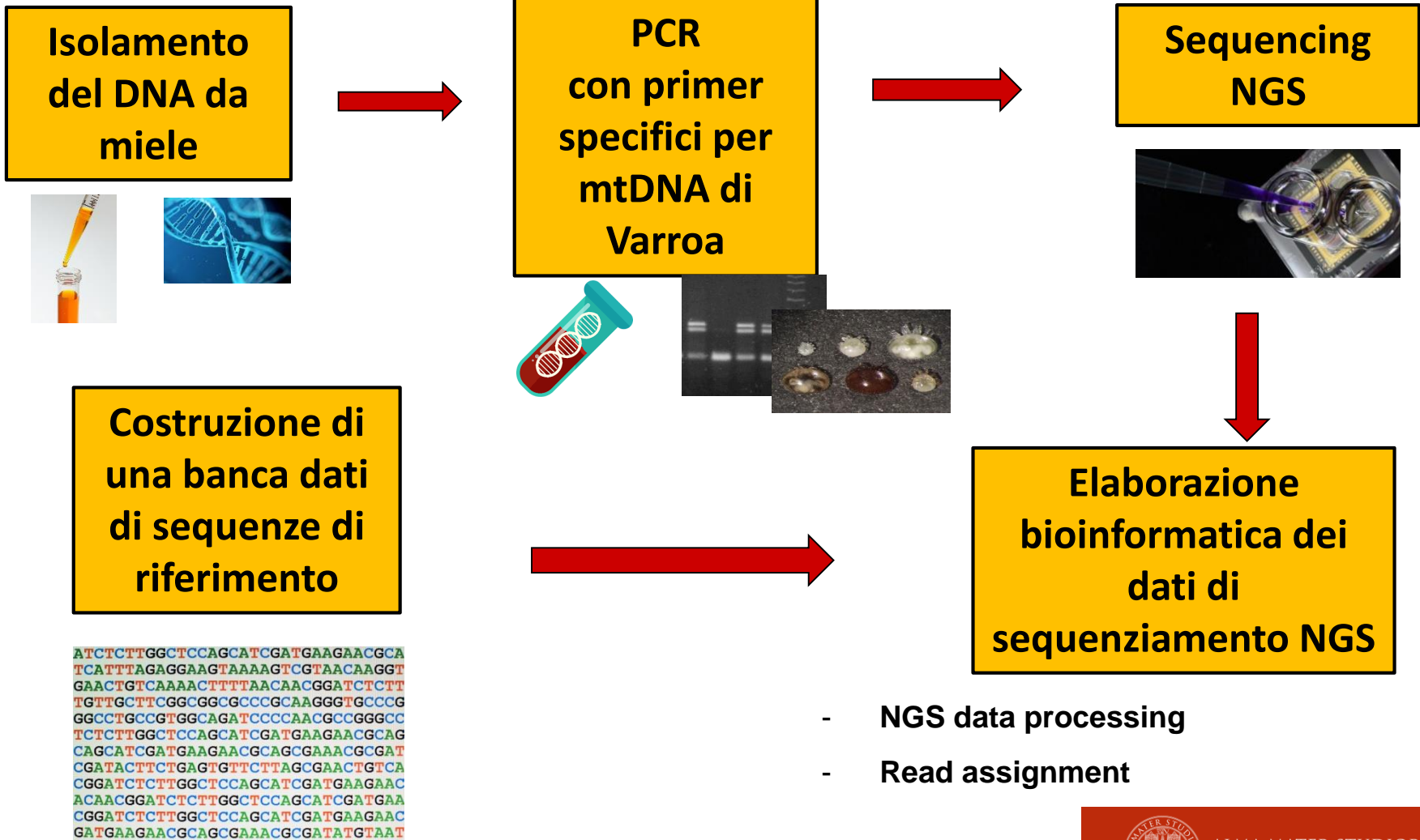
Mite migration



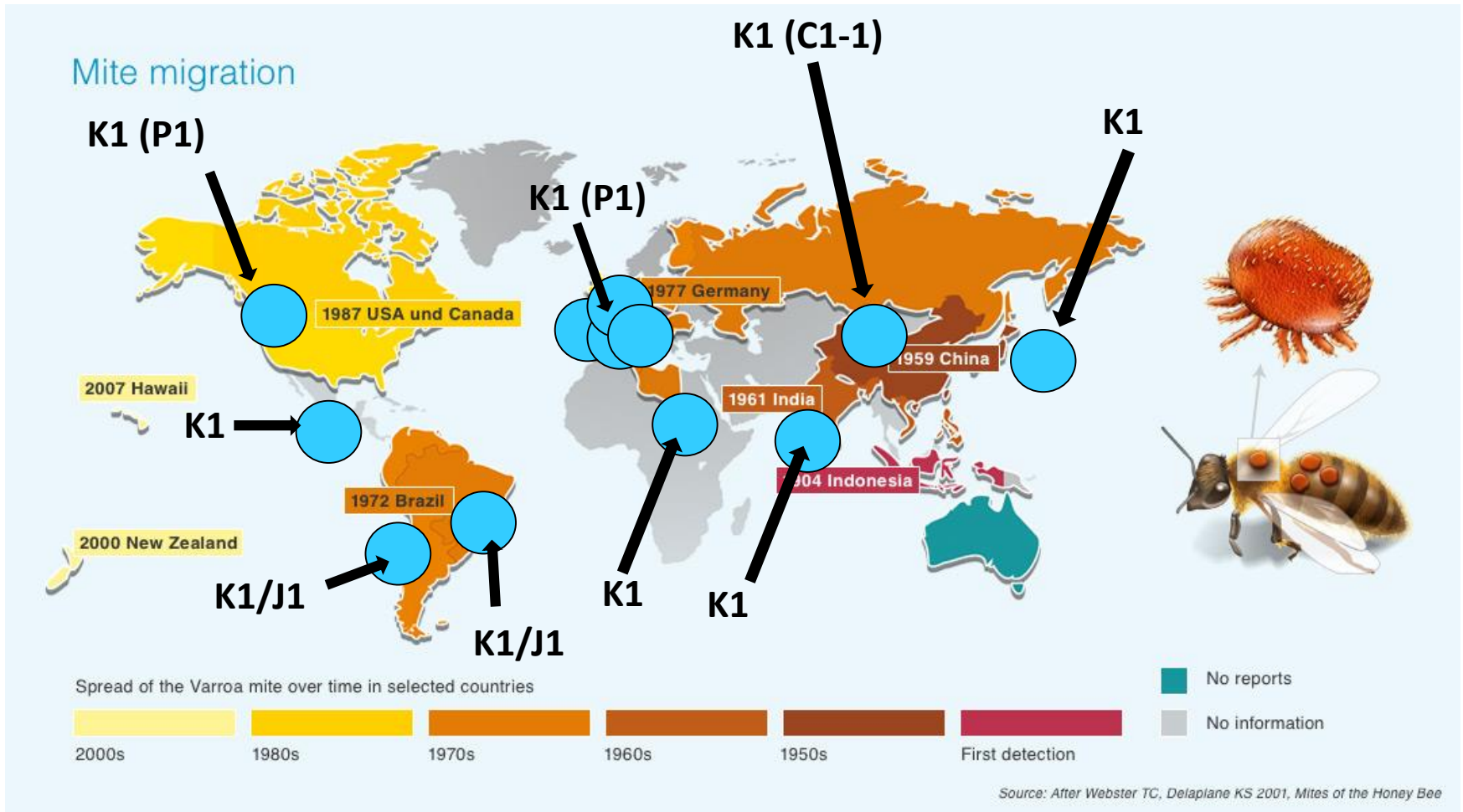
Source: After Webster TC, Delaplane KS 2001, Mites of the Honey Bee



3) Identificazione e caratterizzazione di patogeni e parassiti delle api (*Varroa* spp.)



3) Identificazione e caratterizzazione di patogeni e parassiti delle api (*Varroa* spp.)



3) Conclusione

L'analisi del DNA permette di:

- identificare i patogeni e i parassiti dell'alveare;
- mettere a punto sistemi di monitoraggio e di prevenzione «GLOBALI».



1) Identificazione delle sottospecie di *Apis mellifera*

2) Determinazione dell'origine botanica (e geografica) del miele

3) Identificazione e caratterizzazione di patogeni e parassiti delle api

Sfida 4: tutto!

4) La firma del DNA ambientale nel miele



4) La firma del DNA ambientale nel miele (afidi e melata)

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 Utzeri¹, Giuseppina Schiavo¹, Anisa Ribani¹, Silvia Tinarelli¹, Francesca Bertolini², Samuele Bovo¹ & Luca Fontanesi¹ 

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 customized bioinformatic pipeline. The forest honeydew honeys reported the presence of high abundance of *Cinara pectinatae* DNA, confirming their silver fir forest origin. In all other honeys, most of the sequenced reads were from the planthopper *Metcalfa pruinosa* 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.

4) La firma del DNA ambientale nel miele (afidi e melata)

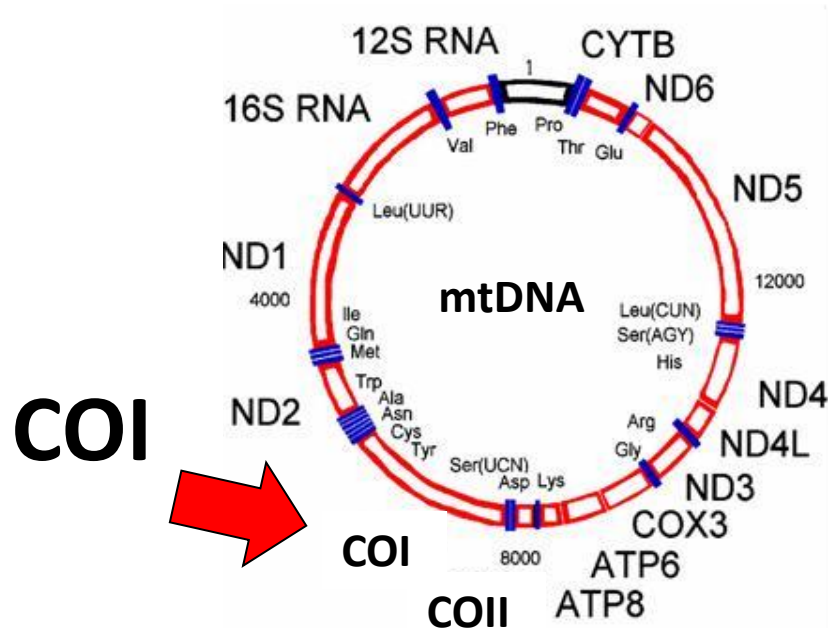
Miele di nettare



Miele di melata



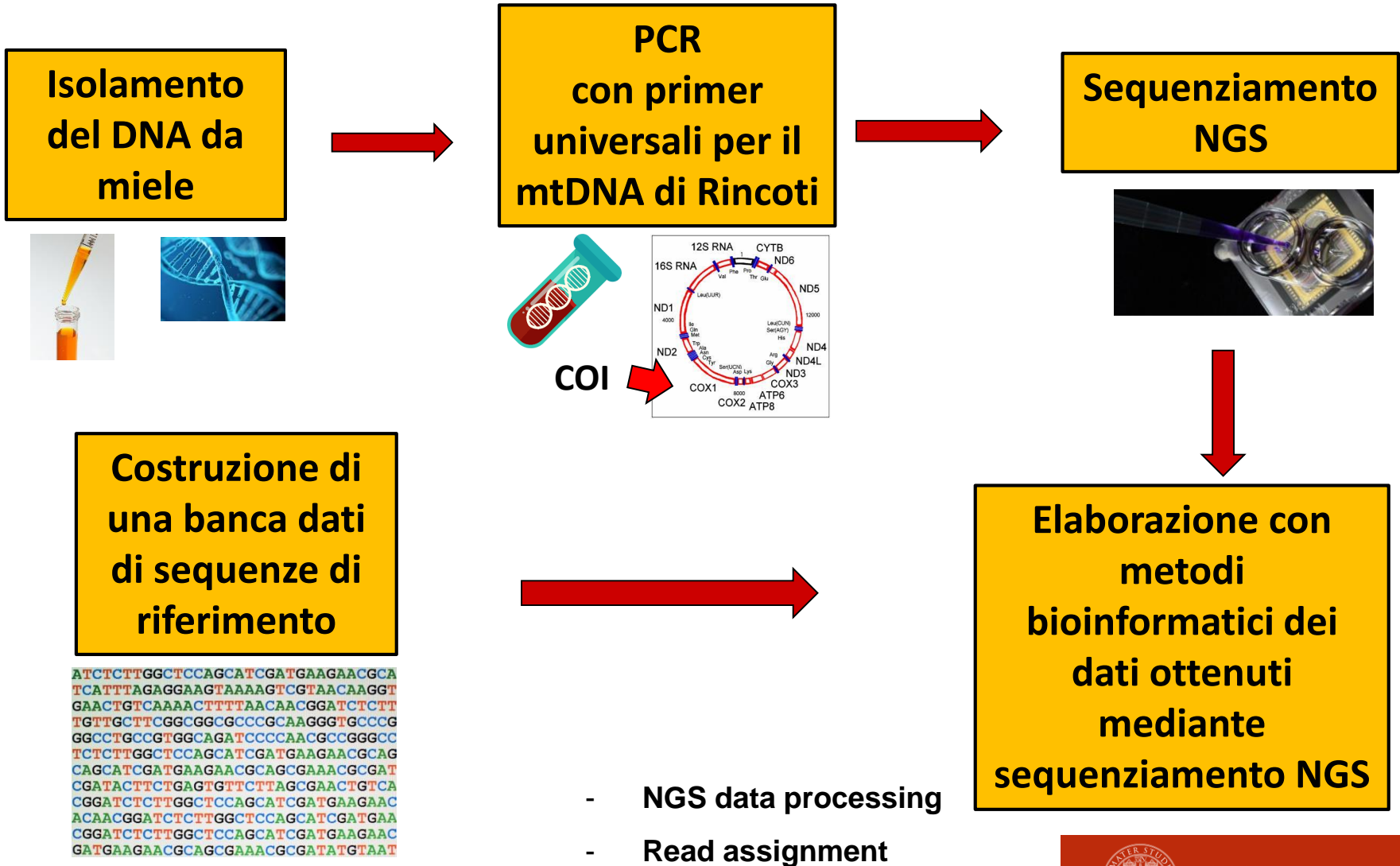
4) La firma del DNA ambientale nel miele (afidi e melata)



**DNA degli
insetti
produttori di
melata**



4) La firma del DNA ambientale nel miele (afidi e melata)



4) La firma del DNA ambientale nel miele (afidi e melata)

Mieli da melata e da nettare analizzati con il numero di read ottenute da NGS

N.	Miele	Nazione	Regione di origine	Anno di prod.	Numero di read totali	Numero di read di Emitteri
1	Melata di quercia	Italia	Lombardia (Mantova)	2016	21605	6982
2	Melata	Italia	Trentino-Alto Adige (Bolzano)	2016	26587	6300
3	Melata	Italia	Veneto (Verona)	2016	22360	4392
4	Melata di abete bianco	Italia	Emilia Romagna (Forlì, Foreste Casentinesi)	2014	6046	2686
5	Melata di abete bianco	Italia	Piemonte (Cuneo)	2017	47472	4008
6	Castagno	Italia	Piemonte (Novara)	2015	133183	16572
7	Melo	Italia	Trentino-Alto Adige (Trento, Valle dell'Adige)	2015	10054	1011
8	Tiglio	Italia	Friuli-Venezia-Giulia (Udine)	2015	6850	2098
9	Acacia	Italia	Toscana (Arezzo)	2015	4802	2530
10	Eucalipto	Italia	Calabria (Catanzaro)	2015	28649	4900
11	Eucalipto	Italia	Sicilia (Messina)	2015	12073	2907
12	Millefiori	Francia	Corsica	2016	38058	8933
13	Millefiori	Serbia-Romania-Croatia	-	2015	129628	16572

4) La firma del DNA ambientale nel miele (afidi e melata)

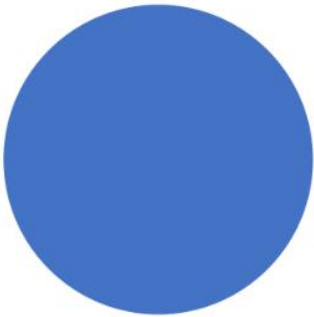
Mieli da melata: Proporzioe delle reads assegnate a diverse specie di emitters



4) La firma del DNA ambientale nel miele (afidi e melata)

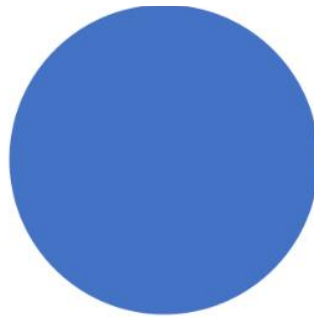
Mieli da melata: Proporzioe delle reads assegnate a diverse specie di emitters

Melata di quercia



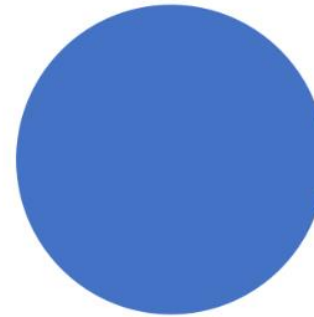
■ *Metcalfa pruinosa*

Melata (Trentino Alto-Adige)



■ *Metcalfa pruinosa*

Melata (Veneto)



■ *Metcalfa pruinosa*



Metcalfa pruinosa

Melata di abete bianco (Emilia Romagna)



■ *Cinara pectinatae* ■ *Metcalfa pruinosa*

Melata di abete bianco (Piemonte)

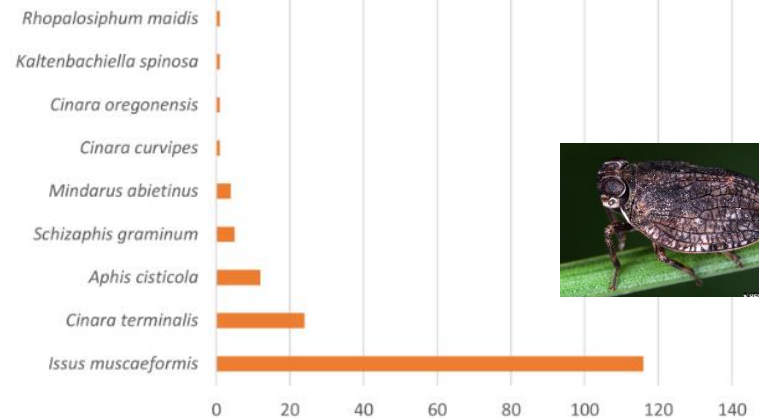


■ *Metcalfa pruinosa* ■ *Cinara pectinatae* ■ Other



Cinara pectinatae

t)



Numero di read di altre specie di emitters



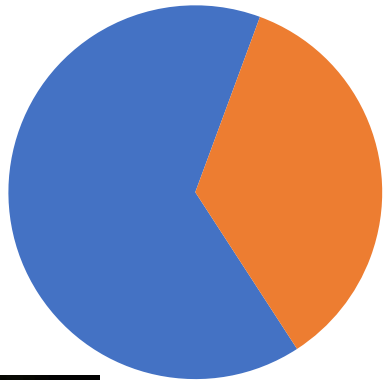
ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

4) La firma del DNA ambientale nel miele (afidi e melata)

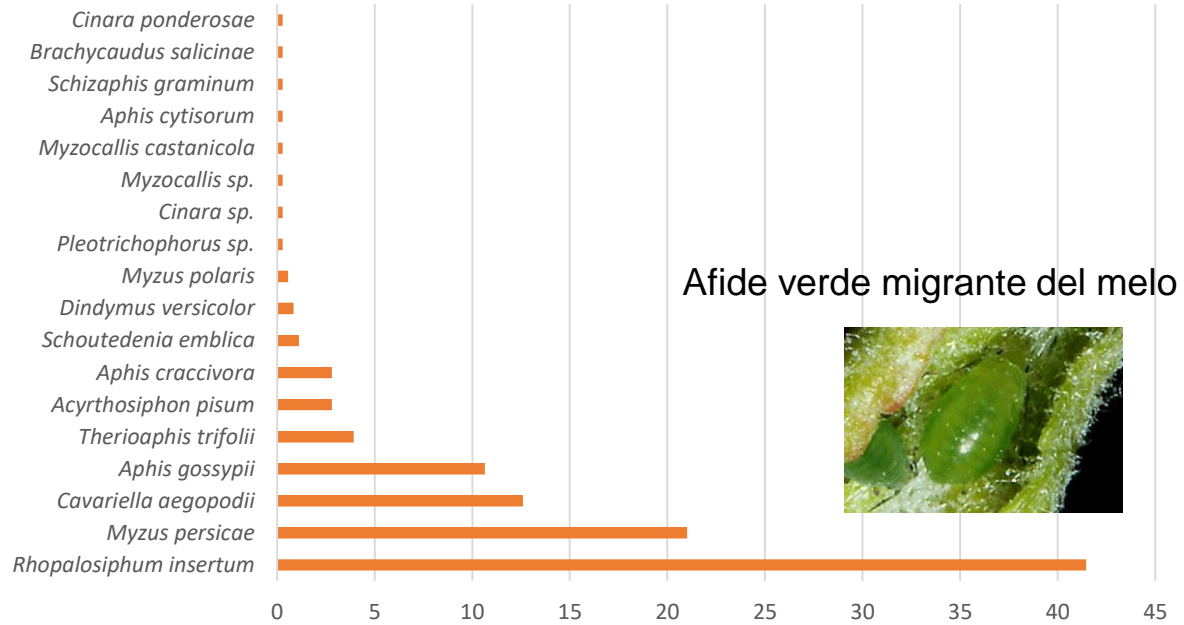
Mieli da nettare: Proporzioe delle reads assegnate a diverse specie di emitters



Miele di Melo



■ Metcalfa



Afide verde migrante del melo



Numero di read di altre specie di emitteri

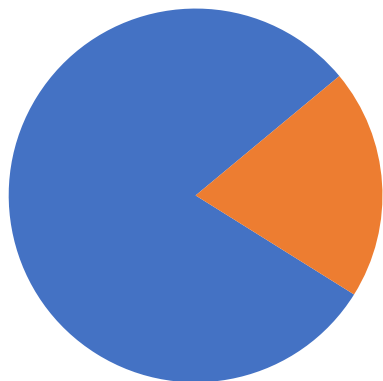
Miele di Castagno



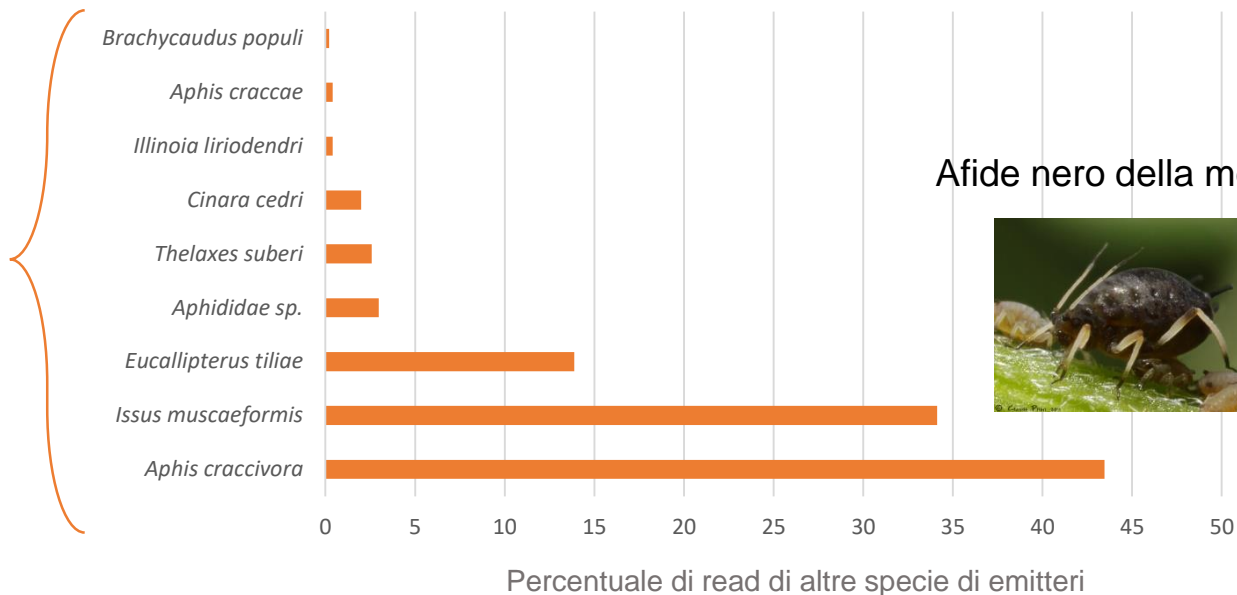
■ Metcalfa pruinosa



Miele di Tiglio



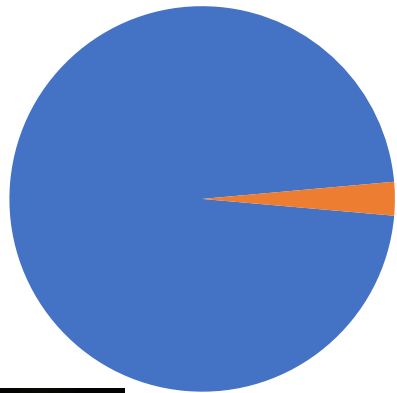
■ Metcalfa



Afide nero della medica

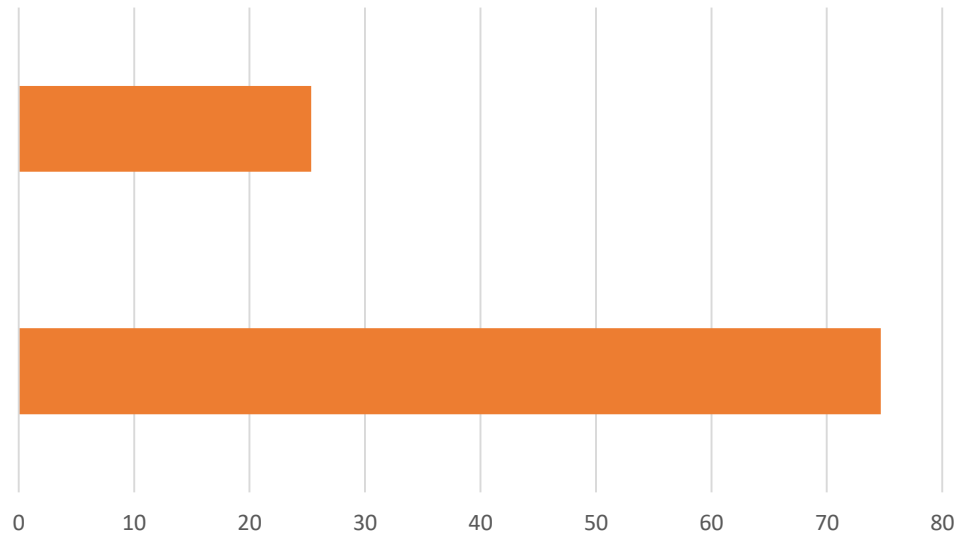


Miele di Acacia



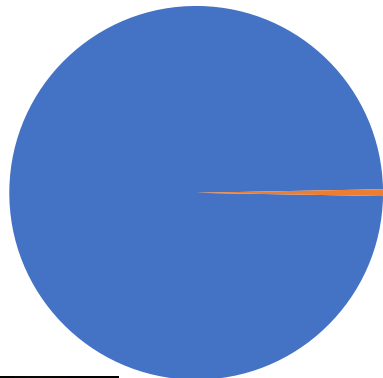
■ *Metcalfa*

Aphis gossypii



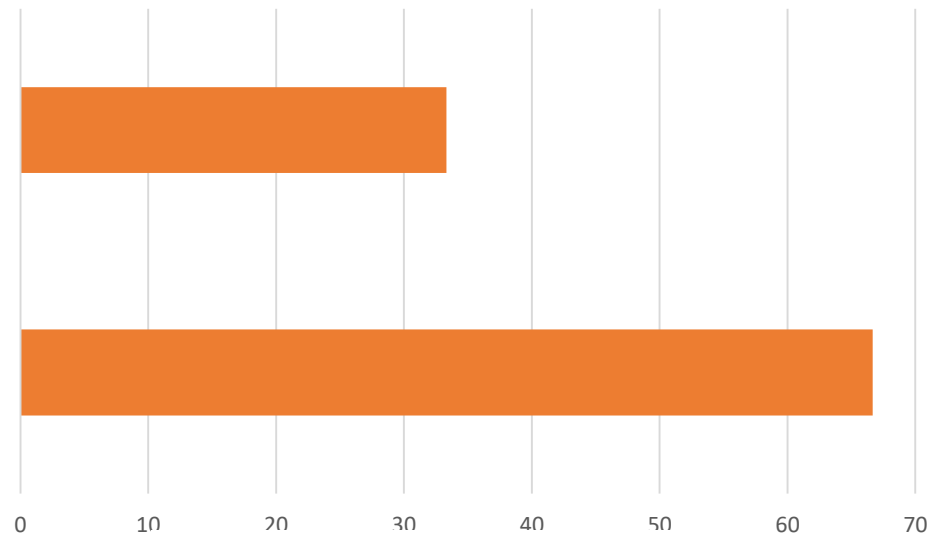
Numero di read di altre specie di emitteri

Miele Millefiori Est Europa



■ *Metcalfa*

Pemphigus bursarius



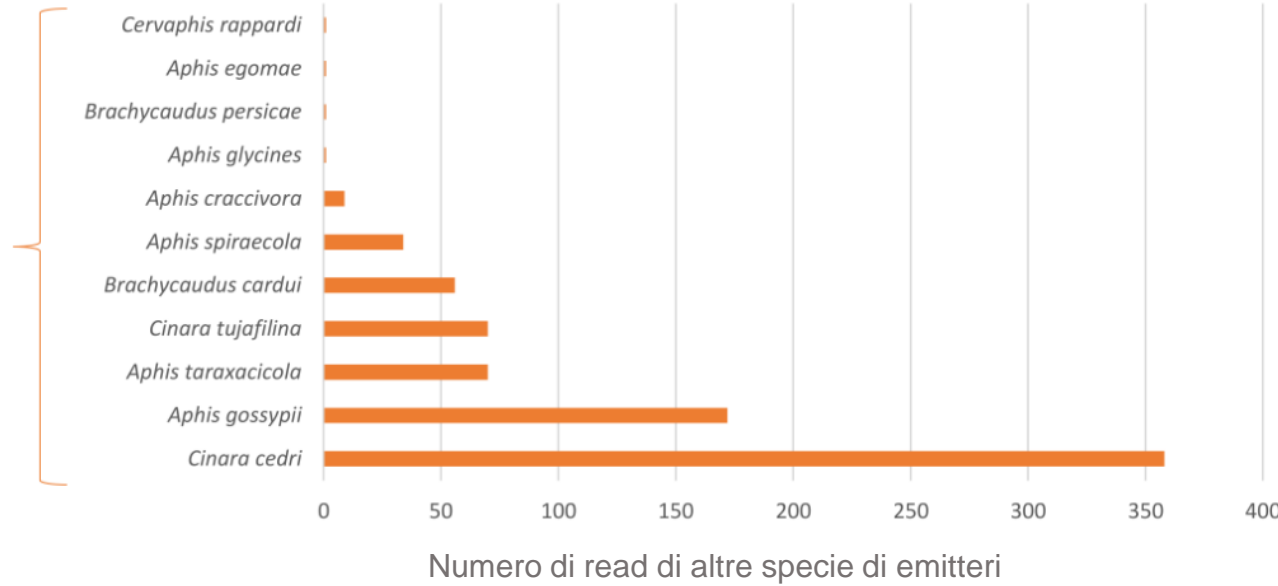
Numero di read di altre specie di emitteri



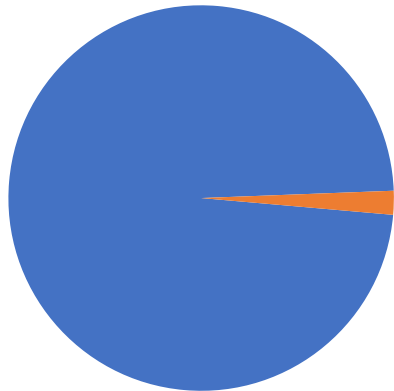
Miele di Eucalipto (Calabria)



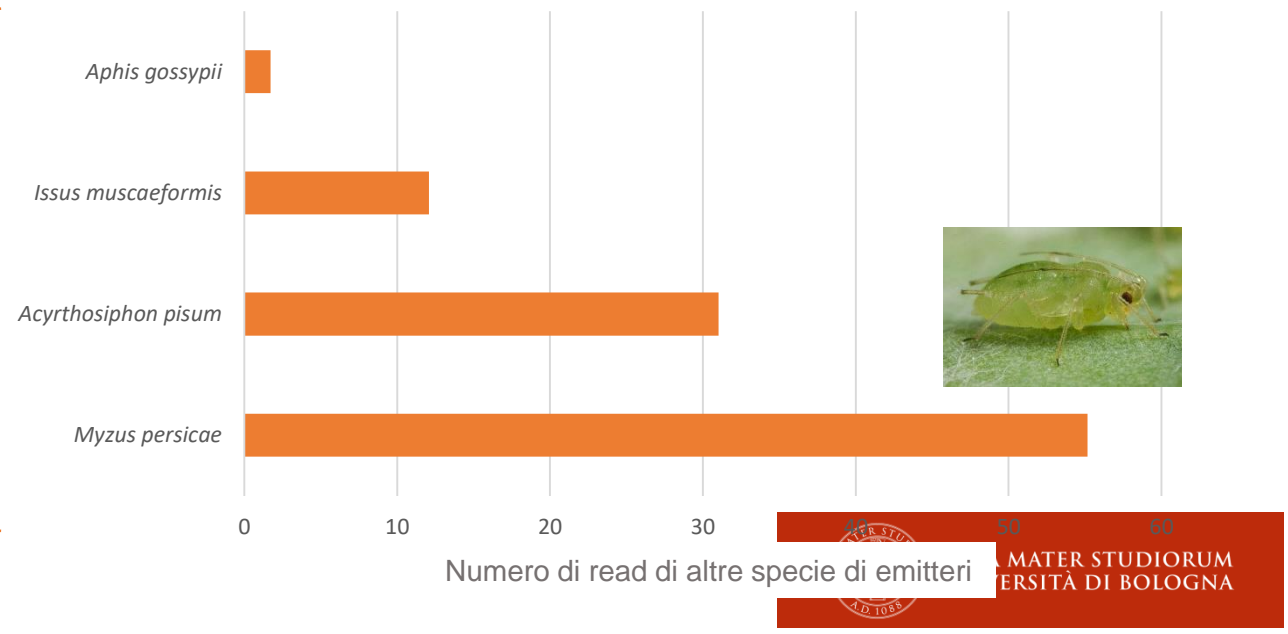
■ *Metcalfa pruinosa* ■ Other



Miele di Eucalipto (Sicilia)



■ *Metcalfa*



4) La firma del DNA ambientale nel miele (afidi e melata)

Conclusione

Il miele contiene informazioni utili per monitorare le infestazioni da afidi delle colture intorno agli alveari che hanno prodotto il miele.

Si possono aprire interessanti prospettive nel monitoraggio fitosanitario.



4) La firma del DNA ambientale nel miele (metagenomica)

RESEARCH ARTICLE

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

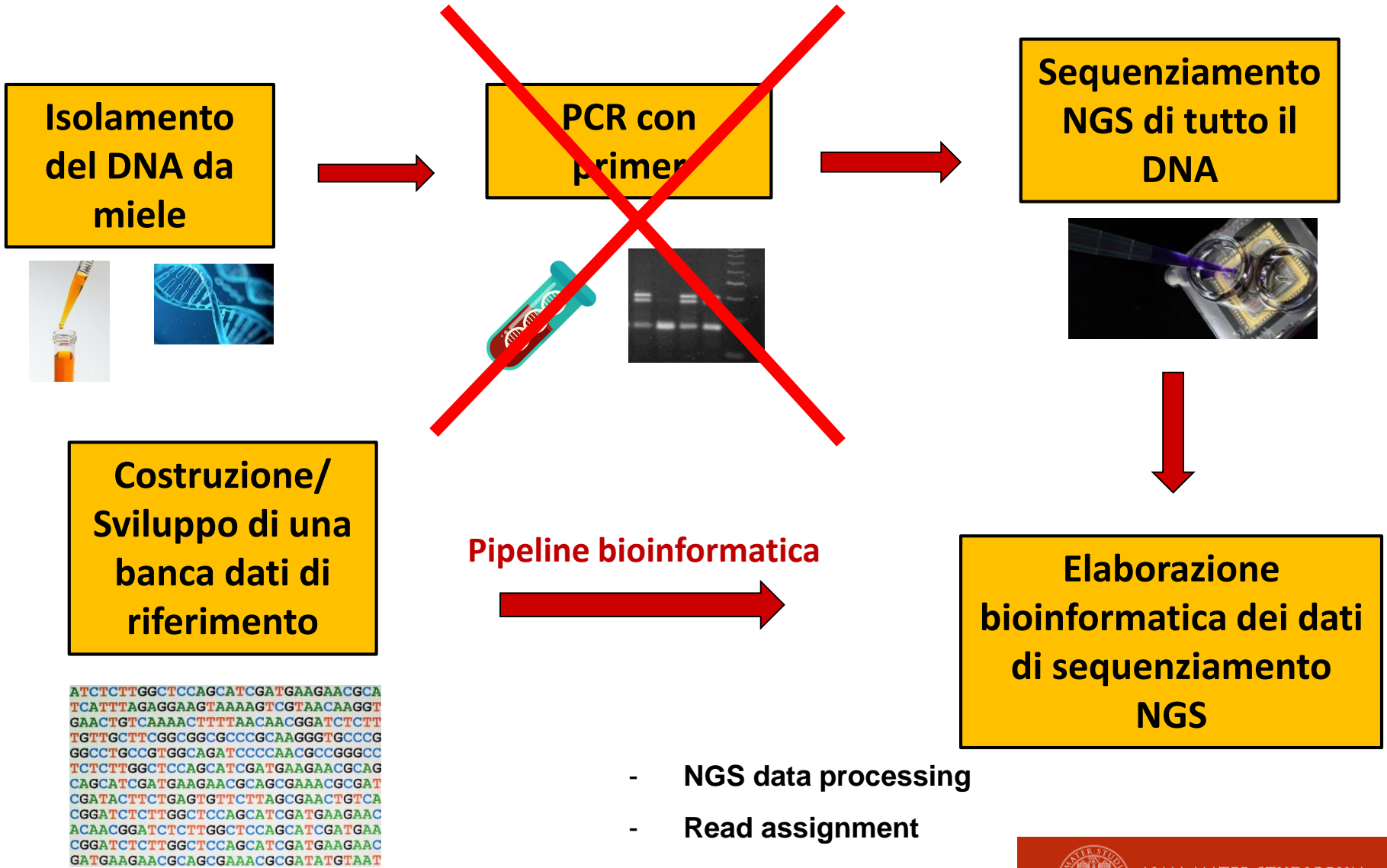
Samuele Bovo ¹, Anisa Ribani¹, Valerio Joe Utzeri¹, Giuseppina Schiavo¹,
Francesca Bertolini ², Luca Fontanesi ^{1*}

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

* luca.fontanesi@unibo.it



4) La firma del DNA ambientale nel miele (metagenomica)



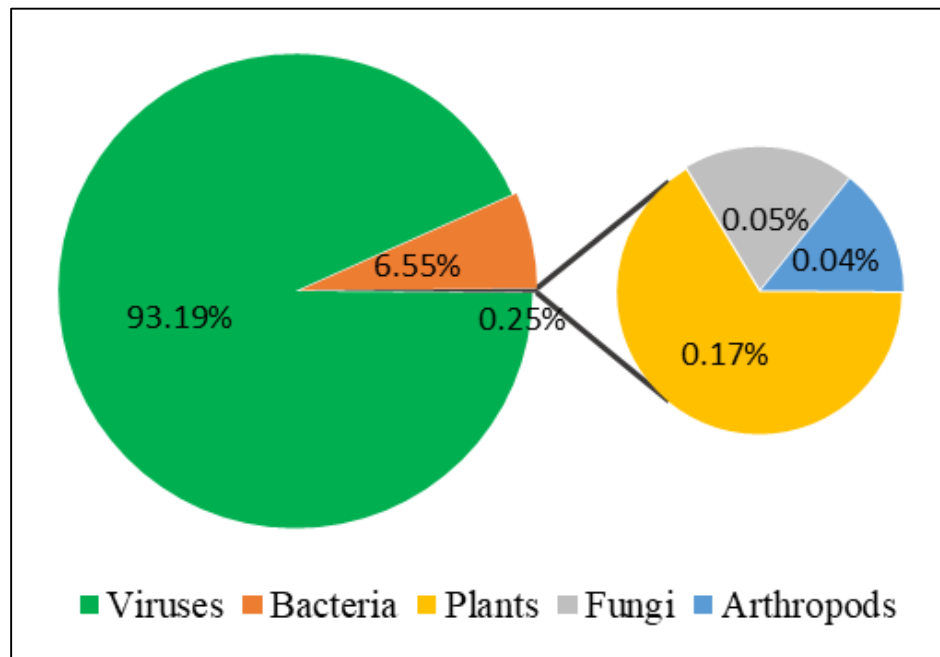
4) La firma del DNA ambientale nel miele (metagenomica)

Table 1. Sequenced and aligned reads of the analyzed honeys are presented.

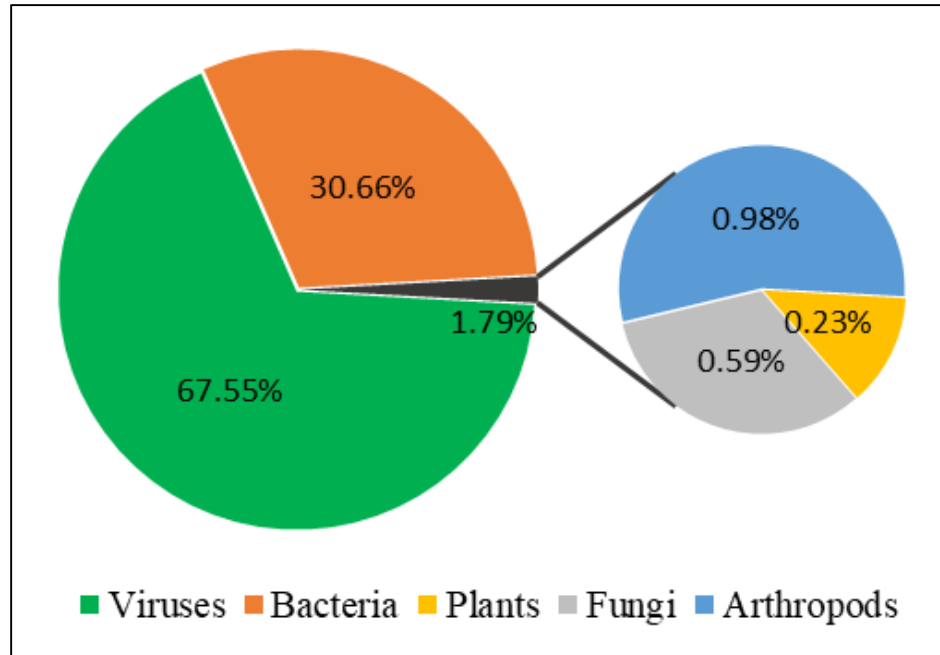
Honey	Raw reads	Mapped reads	Retained reads [†]
Orange tree blossom honey	339,581	279,709	270,439
Eucalyptus tree blossom honey	467,951	286,484	264,903



Miele di Arancio



Miele di Eucalipto

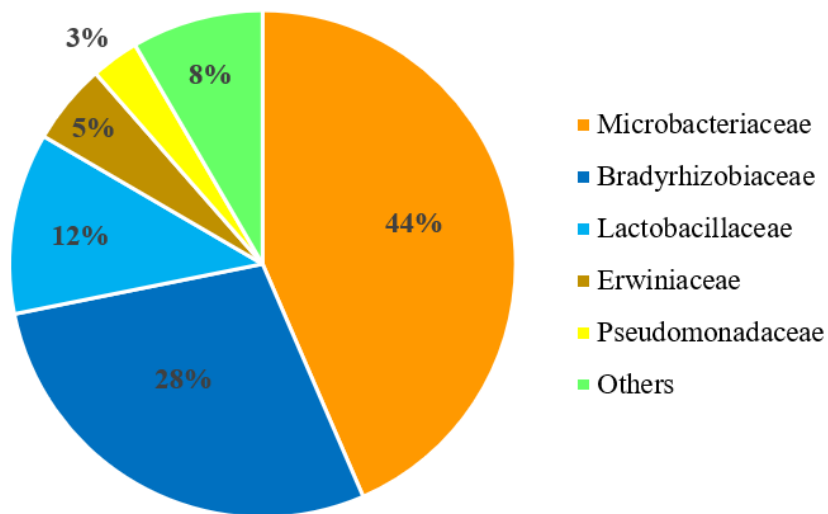


4) La firma del DNA ambientale nel miele (metagenomica)

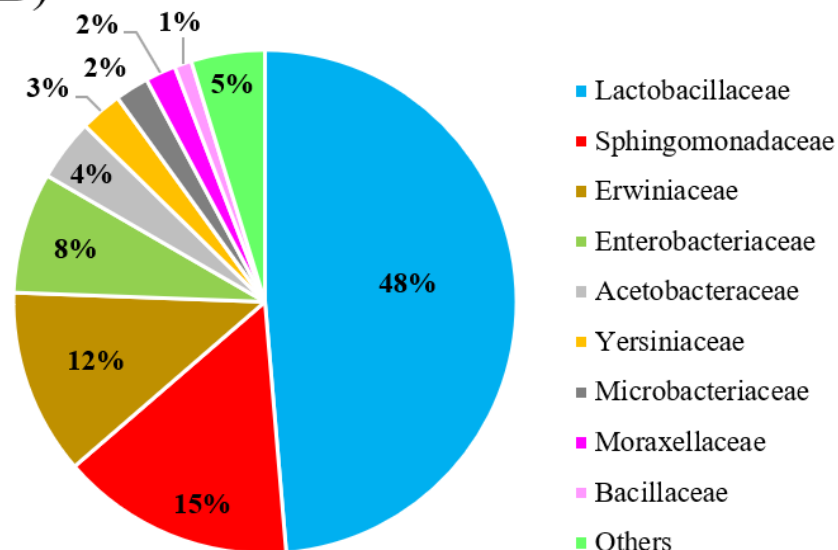
Dataset	Livello	Arancio		Eucalipto	
		N. di reads	N. di MOTU	N. di reads	N. di MOTU
Artropodi	Specie	53	7	1620	20
	Genere	58	7	1793	11
Piante	Specie	141	38	165	36
	Genere	209	38	191	32
Funghi	Specie	49	13	467	40
	Genere	59	12	958	23
Batteri	Specie	2514	121	36648	229
	Genere	2834	65	37939	92
Virus	Specie	188360	3	99540	4
	Genere	-	-	-	-



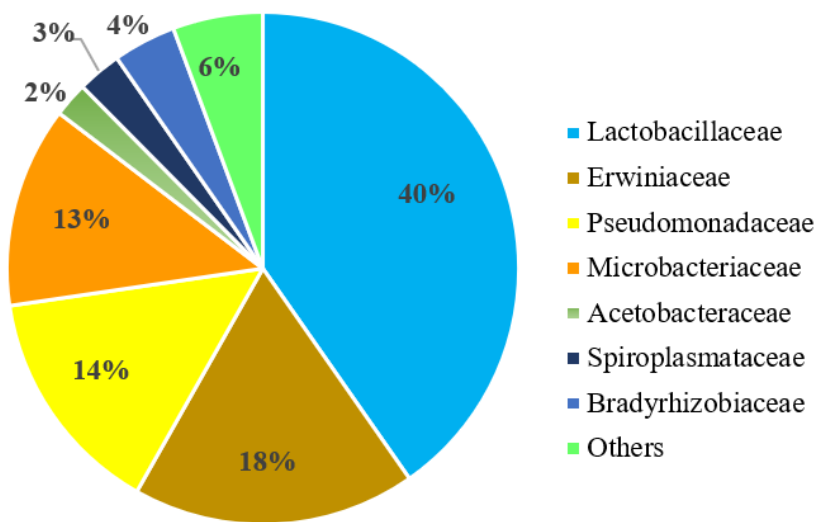
A)



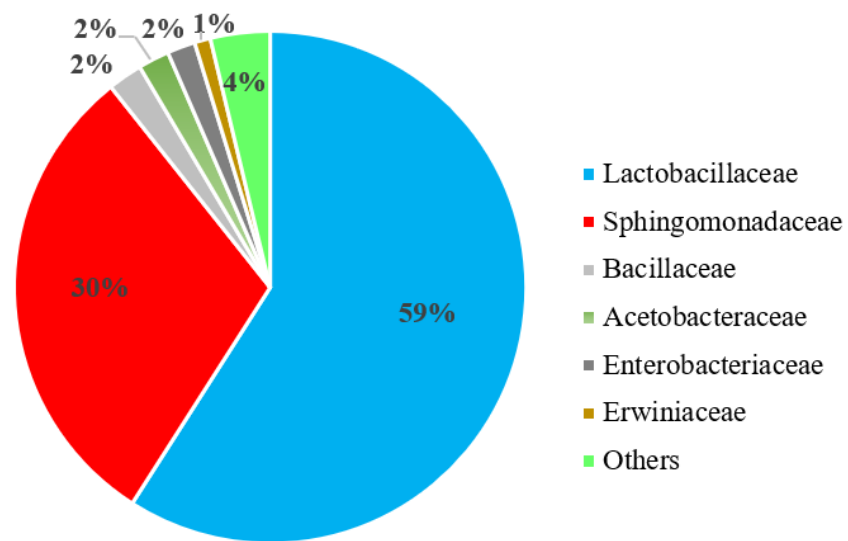
B)



C)



D)



4) La firma del DNA ambientale nel miele (metagenomica)

S3 Table. Predominant genera in the two analysed honeys considering the $\geq 75\%$ sequence identity level based on reads accounting $>5\%$ overall reads of the identified organism groups.

Honey	Groups [†]	Taxid	Scientific name	Reads	% of reads [‡]	% of reads _{TOT} [§]
Orange tree blossom honey	Arthropods	7459	<i>Apis</i>	55	52.38	0.20
		7174	<i>Culex</i>	8	7.62	0.03
		28609	<i>Rhagoletis</i>	8	7.62	0.03
		7028	<i>Acyrtosiphon</i>	7	6.67	0.03
	Plants	2706	<i>Citrus</i>	191	31.62	0.71
		3603	<i>Vitis</i>	53	8.77	0.20
		3877	<i>Medicago</i>	39	6.46	0.14
	Fungi	4953	<i>Zygosaccharomyces</i>	78	41.94	0.29
		5073	<i>Penicillium</i>	28	15.05	0.10
		5529	<i>Metarhizium</i>	17	9.14	0.06
	Bacteria	33882	<i>Microbacterium</i>	7478	37.31	27.65
		374	<i>Bradyrhizobium</i>	6164	30.75	22.79
		1578	<i>Lactobacillus</i>	2027	10.11	7.50
Eucalyptus tree blossom honey	Arthropods	7459	<i>Apis</i>	2270	82.94	8.57
		7215	<i>Drosophila</i>	178	6.50	0.67
		117248	<i>Habropoda</i>	162	5.92	0.61
	Plants	3932	<i>Eucalyptus</i>	211	32.16	0.80
		36747	<i>Orobanche</i>	142	21.65	0.54
		4685	<i>Asparagus</i>	56	8.54	0.21
	Fungi	4953	<i>Zygosaccharomyces</i>	1661	59.22	6.27
		4895	<i>Schizosaccharomyces</i>	556	19.82	2.10
	Bacteria	1578	<i>Lactobacillus</i>	38167	44.60	144.08
		541	<i>Zymomonas</i>	11882	13.88	44.85
		551	<i>Erwinia</i>	6154	7.19	23.23

[†] Viruses are not reported since the ones presenting the genus level have a percentage of reads $< 5\%$.

[‡] Data are based on the specific number of reads representing the five subsets and the honeys, as reported in S1Table (columns “sequence identity $< 75\%$ ”).

[§] Data are based on the total number of annotated reads of that honey, as reported in S1 Table (columns “sequence identity $< 75\%$ ”).

4) La firma del DNA ambientale nel miele (metagenomica)

Funghi:

- 1) **Caratteristici del miele:** *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Lachancea*, *Saccharomyces* e *Torulasporea*;
- 2) **Patogeni delle api o di insetti:** *Metarhizium*, *Nosema ceranae*, *Bettsia alvei*, *Aspergillus*;
- 3) **Patogeni delle piante:** *Alternaria alternate*, *Ustilago bromivora*, *Botrytis cinerea*;
- 4) **Altri:** *Penicillium*.

Batteri:

- 1) **Caratteristici del microambiente dell'alveare:** *Lactobacillus kunkeei*, *Parasaccharibacter apium*, *Gilliamella apicola*, *Frischella perrara*;
- 2) **Patogeni delle api:** *Melissococcus plutonius*, *Paenibacillus larvae*, *Spiroplasma apis*
- 3) **Patogeni delle piante:** *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amilovora*, *Spiroplasma citri*
- 4) **Ubiquitari:** *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica*
- 5) **Altri/antagonisti:** *P. agglomerans*



4) Conclusione

L'analisi del DNA apre una finestra a 360° sulle interazioni api e ambiente

Ci offre gli strumenti per rispondere in modo nuove alle sfide che l'apicoltura deve affrontare





ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Nuove frontiere della genomica applicata all'apicoltura

Luca Fontanesi

Dipartimento di Scienze e
Tecnologie Agroalimentari
Università di Bologna

luca.fontanesi@unibo.it