



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI AGRARIA

Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali
Sezione di Entomologia

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

TESI DI LAUREA

TOSSICITÀ IN *APIS MELLIFERA* DELL'IMIDACLOPRID DELLE GUTTAZIONI DI PLANTULE DI MAIS

RELATORE: PROF. VINCENZO GIROLAMI

CORRELATORE: DOTT. MATTEO MARZARO

LAUREANDO: MATTIA GIOVANNINI

MATRICOLA n. 560858 – TG

ANNO ACCADEMICO 2009-2010



*Un sincero ringraziamento a tutti coloro
che mi hanno permesso la realizzazione di questo lavoro...*

Indice

Riassunto	6
Abstract	7
INTRODUZIONE	8
Importanza economica dell'ape	9
Importanza dell'apicoltura in campo agrario.....	10
Importanza dell'ape in campo ecologico	12
PRINCIPALI AVVERSITÀ DELLE API	13
Acariosi	13
Peste Americana	14
Peste Europea	15
Varroasi.....	16
Nosemiasi	18
Avvelenamenti delle api.....	20
MORIA DELLE API	22
Colony Collaps Disorder (CCD)	22
Infestazioni da Varroa	24
Infestazioni da Nosema.....	24
Presenza di Virus	25
Effetti da insetticidi	26
Altre cause.....	27
STORIA DEI NEONICOTINOIDI	28
Meccanismo di azione	29
Selettività dei neonicotinoidi	29
Principi attivi dei neonicotinoidi	30
Imidacloprid.....	31
Traslocazione nelle piante	31
Scheda tecnica.....	32
ORGANIZZAZIONE DELLE API	34
Ape regina.....	34

Fuchi.....	35
Api operaie.....	35
Morfologia.....	36
Apparato boccale.....	37
GUTTAZIONE.....	39
MATERIALI E METODI.....	40
Origine delle api.....	40
Preparazione delle piantine.....	40
Raccolta delle gocce di guttazione.....	41
Preparazione dei campioni di riferimento.....	42
Prova di tossicità delle gocce di guttazione sulle api.....	43
Valutazione della dose di effetto.....	45
Analisi statistiche.....	45
Risultati e discussioni.....	45
Contenuto di insetticida nell'acqua di guttazione.....	46
Tossicità delle gocce di guttazione sulle api.....	47
Valutazione della dose di effetto.....	49

RIASSUNTO

Negli ultimi anni si sta verificando una consistente perdita delle api mellifere, con conseguente spopolamento di interi alveari. Questa situazione sta provocando notevoli danni, in particolare agli apicoltori, che si vedono sempre più ridotte le famiglie di api, ma anche all'intero settore agricolo, che difficilmente riuscirebbe a sostituire la fondamentale funzione di impollinazione che svolgono questi insetti.

Tale fenomeno ha raggiunto entità tali che gli stessi governi si sono adoperati, affinché si riuscissero a comprendere le cause di queste morie, ma fino ad ora non sono state ancora trovate risposte soddisfacenti.

Attualmente uno dei motivi più probabili sembra essere la semina di semi mais conciatati con insetticidi neonicotinoidi. Questi insetticidi sistemici, essendo assorbiti dalla pianticella di mais in crescita, si diffondono in tutti i tessuti vegetali, avvelenando, pertanto, l'intera pianta.

Dalla germinazione a tre settimane di vita le pianticelle di mais rilasciano l'eccesso di acqua assorbito dalle radici. Questo fenomeno è fisiologico e si chiama guttazione e si verifica in molte piante durante le prime ore del mattino.

È stato osservato, infatti, che nel mais le gocce di guttazione provenienti da semi conciatati con i principi attivi (p.a.), imidacloprid, thiamethoxam e clothianidin, contengono quantità di insetticida superiori ai 10mg/litro. In particolare sono stati osservati valori massimi fino a 100mg/litro per semi conciatati con thiamethoxam e clothianidin e fino a 200 mg/litro per quelli conciatati con imidacloprid.

Le concentrazioni di p.a. sono talmente elevate, da poter essere paragonate a quelle utilizzate per applicazioni spray. Le api che dovessero abbeverarsi a queste gocce, incontrerebbero la morte in pochi minuti.

PAROLE CHIAVE: guttazione, neonicotinoidi, api, concia del seme.

ABSTRACT

In recent years, is experiencing a significant loss of honey bees, resulting in depopulation of entire beehives. This situation is causing considerable damage especially to beekeepers that see the dwindling of bee families, but also to the entire agricultural sector unlikely to replace the basic function of pollination performing these insects.

This phenomenon is growing so much that also a government like Italy want understand the causes of these die-offs, but until now have not been found satisfactory answers.

Currently one of the most likely reason seems to be sowing maize's seeds coating with neonicotinoids insecticides. These systemic insecticides being absorbed by the seedling growth of corn spread in all plant tissues .

From germination to three weeks old seedlings of maize release the excess water absorbed by the roots. This phenomenon is physiological and is called guttation, and occurs in many plants during the early hours of the morning.

In maize has been observed that the drops of guttation from maize's seeds coated with three a.s. belonging to the family of neonicotinoids, contain quantities of insecticide continuously over 10mg/liter. In particular, maximum values were observed about 100mg/liter for seed coating with thiamethoxam and clothianidin and 200 mg / liter for imidacloprid.

Concentrations of a.s. are so high that they can be compared to those used for spray applications. Therefore, any bees that were drinking from these drops will die in few minutes.

KEY WORDS: Guttation, neonicotinoids, honeybees, seed coating.

INTRODUZIONE

L'ape, definita da Plinio nel suo *Historia naturalis* **neque mansueti, neque feri**, non è un animale domestico e neppure selvatico, ma qualcosa di intermedio, una creatura capace di contrarre rapporti con noi senza perdere la propria libertà (G. Celli.)

L'*Apis mellifera* è un insetto sociale, appartenente all'ordine degli Imenotteri, famiglia degli Apidi e al genere *Apis*. al quale appartengono, inoltre, altre tre specie:

- *Apis dorsata* o ape gigante diffusa in India, Indocina e Indonesia vive nelle foreste e costruisce favi molto grandi sui rami degli alberi;
- *Apis florea* o ape nana di dimensioni inferiori alla mellifera è diffusa nelle stesse regioni della precedente e come lei costruisce i favi sugli alberi, ma di dimensioni più piccole;
- *Apis indica* o *apis cerana*, simile alla mellifera, è diffusa in India e Cina, costruisce i favi dentro le anfrattuosità degli alberi.

Attualmente l'*Apis mellifera*, detta anche *ape domestica*, è diffusa in tutto il mondo, occupa territori con caratteristiche geoclimatiche molto differenti, così che, sotto la diversa pressione selettiva, si sono formate varie razze suddivisibili secondo il biologo austriaco F. Ruttner, in tre gruppi: europea, orientale, africana.

Alla razza europea appartengono l'*Apis mellifera ligustica* o *ape italiana*, l'*Apis mellifera mellifera*, l'*Apis mellifera carnica*, e l'*Apis mellifera caucasica*.

L'ape italiana è considerata l'ape industriale per eccellenza per le sue positive caratteristiche di elevata operosità, prolificità delle regine e bassa tendenza alla sciamatura; si distingue dalle altre razze europee per il colore giallo dei primi segmenti dell'addome.

IMPORTANZA ECONOMICA DELL' APE



Fig. 1 – Disegno rupestre: scena di raccolta del miele. Grotta Cueva de la Araña (Spagna, ca. 7000 a.C.)

Le api, fin dalla comparsa dell'uomo sulla terra, hanno rivestito un ruolo di primaria importanza. Antiche pitture rupestri, rinvenute nei pressi di Valencia in Spagna, e risalenti a più di 7000 anni fa, raffigurano un uomo attaccato alle liane intento nella raccolta dei favi.

L'allevamento delle api vero e proprio ha origini molto antiche, se si pensa che già 3600 anni fa gli antichi egizi praticavano il nomadismo trasportando con le barche le arnie lungo il Nilo per seguire le fioriture scalari.

Per tutta l'antichità e fino allo sfruttamento industriale della barbabietola, il miele è stato il principale dolcificante impiegato e quindi l'apicoltura è sempre stata un'attività di massima importanza per l'umanità.

Nel corso del tempo, l'uomo ha imparato a conoscere i numerosi prodotti offerti dall'alveare quali la cera, il polline, la propoli, la pappa reale, il veleno ed altri.

Il procedere degli studi sulle caratteristiche chimico-fisiche e sulle proprietà di questi prodotti ne ha esteso enormemente i settori d'impiego, spaziando da quello alimentare a quello cosmetico e farmaceutico. Basti pensare all'interesse suscitato recentemente delle sostanze polifenoliche, contenute in molti prodotti tra cui il miele e la propoli come "antipromotori" e "anti-induttori" della carcinogenesi (Viola 1997).

IMPORTANZA DELL'APICOLTURA IN CAMPO AGRARIO

La moderna agricoltura industrializzata, caratterizzata dall'affermarsi della monocoltura su vaste aree, dall'utilizzo a volte indiscriminato di fitofarmaci, in particolar modo insetticidi, e dalla eliminazione di siepi ed essenze spontanee, ha reso i campi luoghi inhospitali a tutti gli insetti pronubi. I trattamenti fitoiatrici, effettuati sovente in piena fioritura, nonostante l'esplicito divieto della legge¹, hanno completamente decimato le migliaia di specie selvatiche che fungevano da vettori di polline da un fiore all'altro. La scomparsa dei pronubi selvatici ha fatto così passare in secondo piano la produzione dei prodotti tipici dell'alveare (miele, cera etc.) rispetto al ruolo svolto dall'ape come impollinatrice.

L'ape europea è l'insetto più importante per l'impollinazione in agricoltura, ricoprendo un ruolo di vitale importanza nella produzione della maggior parte dei prodotti. Negli Stati Uniti l'impollinazione da ape contribuisce per un terzo alla produzione di alimenti di origine vegetale, poiché la maggior parte delle colture, (circa il 90%) tra le quali quelle fruttifere, orticole ed erbacee, necessitano della presenza di insetti impollinatori per fruttificare (Johnson 2008).

Per alcune piante l'adattamento ambientale si è spinto ad un punto tale che oggi, senza l'intervento degli insetti pronubi, non è più possibile la fecondazione; per altre essa può avvenire ugualmente, sebbene l'intervento degli insetti, che favorisce la fecondazione incrociata, aumenti la quantità e la qualità della produzione. L'impollinazione entomofila, seppur di difficile valutazione, ha un'incidenza economica rilevante, rappresentando il 9,5% del valore totale degli alimenti prodotti in agricoltura. A livello mondiale la resa delle api per l'impollinazione supera notevolmente quella dei tipici prodotti apistici, quali miele, cera ed altri.

¹ Decreto 4 marzo 1991, n. 130 «Divieto di trattamenti insetticidi e acaricidi alle colture frutticole, foraggere, orticole e floricole da seme, durante la fioritura».

È stato stimato che i danni causati dalla mancata fecondazione ammontino, solo negli Stati Uniti, a quindici miliardi di dollari. Il valore è stato calcolato misurando il beneficio che gli insetti pronubi apportano in termini di qualità e quantità alla produzione agricola dei fruttiferi e dei seminativi (Johnson 2008).

In Italia il valore di ciascun alveare concorre, esclusi i benefici alla biodiversità, per circa 1200 euro/anno all'incremento produttivo delle colture agricole.

Stimando la presenza sul suolo italiano di più di 1.100.000 alveari, si calcola che il valore del comparto apistico nazionale sia di 1,3 miliardi di euro annui.

Crop Category (ranked by share of honey bee pollinator value)	Dependence on Insect Pollination	Proportion of Pollinators That Are Honey Bees	Value Attributed to Honey Bees ^a (\$ millions)	Major Producing States ^b
Alfalfa, hay & seed	100%	60%	4,654.2	CA, SD, ID, WI
Apples	100%	90%	1,352.3	WA, NY, MI, PA
Almonds	100%	100%	959.2	CA
Citrus	20% - 80%	10% - 90%	834.1	CA, FL, AZ, TX
Cotton (lint & seed)	20%	80%	857.7	TX, AR, GA, MS
Soybeans	10%	50%	824.5	IA, IL, MN, IN
Onions	100%	90%	661.7	TX, GA, CA, AZ
Broccoli	100%	90%	435.4	CA
Carrots	100%	90%	420.7	CA, TX
Sunflower	100%	90%	409.9	ND, SD
Cantaloupe/honeydew	80%	90%	350.9	CA, WI, MN, WA
Other fruits & nuts ^c	10% - 90%	10% - 90%	1,633.4	—
Other vegetables/melons ^d	70% - 100%	10% - 90%	1,099.2	—
Other field crops ^e	10% - 100%	20% - 90%	70.4	—
Total	—	—	14,564	—

Tabella 1. Stima dell'importanza dell'ape sulle produzioni agricole degli Stati Uniti.

IMPORTANZA DELL' APE IN CAMPO ECOLOGICO

Le api svolgono un importante ruolo nella formazione e conservazione dell'ambiente, perché oltre a fecondare le piante di interesse agrario, contribuiscono all'impollinazione della maggior parte delle piante spontanee e selvatiche per circa l'80%.

L'azione risulta ancora più importante se si pensa che con la scomparsa degli insetti pronubi, unici vettori animali di impollinazione delle piante selvatiche, molte di queste specie avrebbero conseguenze tragiche, non ultima, la possibilità della loro completa estinzione.

E' difficile prevedere a priori gli effetti di una simile variazione. È noto, però, che essa può avere ripercussioni a diversi livelli: da quello geologico per le alluvioni e frane, a quello alimentare con la diminuzione delle zone produttive. Senza considerare che molte delle suddette essenze rientrano nella catena alimentare di numerosi animali selvatici (Contessi 2007).

Non ultimo è il ruolo che l'ape svolge come indicatore dello stato di inquinamento di aree circoscritte. L'ape, infatti, esplora il territorio, raccoglie nettare e polline, si posa su foglie e fiori e si abbevera all'acqua dei fossi; si espone, in altri termini, a tutti i possibili rischi di intossicazione e la sua morte è sempre un segnale d'allarme.

Grazie alla possibilità di utilizzare le api come *bio monitori* di un'area, è possibile determinare, tramite analisi chimiche dei prodotti degli alveari (miele, cera), la presenza o meno di sostanze inquinanti.

PRINCIPALI AVVERSITÀ DELLE API

Malattie e avvelenamenti rappresentano, attualmente, le principali avversità delle api.

Tra le malattie più pericolose e che, pertanto, richiedono la denuncia obbligatoria² alle unità sanitarie locali, ricordiamo l'Acariosi causata dall'acaro *Acarapis woodi*, la Batteriosi causata dalla Peste Americana (*Paenibacillus larvae*) e dalla Peste Europea (*Streptococcus pluto*), la Varroasi provocata dalla *Varroa destructor* e la Nosemiasi (*Nosema api*, *Nosema ceranae*).

ACARIOSI

L'acariosi è una delle malattie delle api adulte più grave. L'agente della malattia è l'acaro *Acarapis woodi*, che vive come endoparassita nell'apparato respiratorio (trachee) delle api adulte di tutte e tre le caste.³

La malattia viene trasmessa dalla femmina feconda dell'acaro, che penetra nelle trachee toraciche delle giovani api e qui vi depone le uova.

Dalle uova si sviluppano altri acari, che irradiandosi per tutto il sistema respiratorio, ostruiscono le trachee provocando una carenza di ossigeno nell'insetto. Il parassita si nutre succhiando l'emolinfa dell'ape, perfora la parete della trachea col proprio apparato boccale causando alterazioni fisiologiche e fenomeni d'intossicazione.

I sintomi dell'acariosi non sono caratteristici come quelli causati da altre malattie e si manifestano con tremori e movimenti convulsi del corpo, incapacità

² Per queste malattie la denuncia va fatta all'autorità sanitaria locale o al Sindaco o per lui o al Veterinario comunale secondo quanto disposto dall'art 154 del vigente *Regolamento di Polizia veterinaria* approvato con D.P.R. 8-2-54 n. 320 e relative integrazioni.

³ La società delle api è suddivisa in tre caste: la regina, le operaie e i fuchi.

di volare, ritenzione delle feci, difficoltà a camminare fino a quando sopraggiunge la morte per lenta agonia. La trasmissione della malattia avviene per contatto diretto tra api, essendo l'insetto ospite l'unico mezzo di diffusione dell'acaro.

PESTE AMERICANA

La peste americana è la più grave malattia della covata. L'agente della malattia è il batterio *Paenibacillus larvae subspecie larvae*, fino a pochi anni fa classificato come *Bacillus larvae*.

Il batterio si conserva e si diffonde come spora nel miele, polline e cera. La forma vegetativa del batterio si trova solo nelle larve, poiché solo in queste esiste l'ambiente adatto per il suo sviluppo.

Il contagio delle larve di ape avviene per via orale mediante l'alimento infetto che gli viene somministrato dalle operaie. Il batterio, una volta passato nell'intestino della larva, inizia a moltiplicarsi e a penetrare nei tessuti diffondendosi in tutto l'insetto, causando una vera e propria setticemia.

I sintomi d'infezione da peste americana si osservano solo nella covata. Il primo osservabile è il cambiamento di colore dell'opercolo, che da bianco-perla assume una colorazione più scura fino ad apparire quasi nero. Le larve e pupe infette da peste si liquefano e manifestano in genere un'elevata viscosità e filamentosità che può essere facilmente osservata, inserendo uno stecchino nella cella e, ritraendolo, si formerà un filamento di due o tre centimetri. Le celle infette risultano più umide, presentano una depressione al centro ed emanano uno sgradevole odore, simile a quello del pesce morto o colla da falegname.

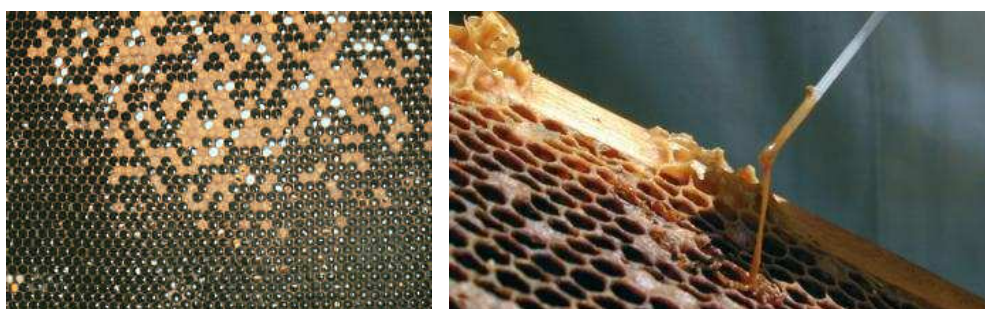


Fig. 2 - Sintomi tipici di 'Peste Americana'.

PESTE EUROPEA

La peste europea è causata dal batterio non sporigeno *Melissococcus pluton* spesso associato ad altri agenti batterici, tra questi: il *Bacillus alvei*, lo *Streptococcus faecalis*, l'*Achromobacter eurydice*, il *Paenibacillus alvei* e il *Bacillus laterosporus*.

Il batterio si riproduce nell'intestino delle larve delle api, che ingeriscono cibo infetto. Generalmente le larve infettate dal batterio muoiono prima della opercolatura, ma spesso riescono a sopravvivere e scaricano i batteri alla base delle celle, dove rimangono vitali per anni.

Una caratteristica importante e utile per riconoscere questa malattia consiste nel fatto che le larve colpite spesso cambiano posizione e invece di restare tipicamente coricate su un fianco a forma di "C", aderenti al fondo della cella, si possono contorcere a spirale, allungare sul fianco e ripiegarsi a ponte.

Le larve morte, nel giro poco tempo, assumono una colorazione bruna, ma a differenza di quelle colpite da peste americana non sono né viscoso né filanti. All'olfatto una covata infetta da peste europea può emanare, a seconda del tipo di batterio associato, un odore acido o putrescente.

Peste Europea	Peste Americana
Larva morta in cella non opercolata	Larva morta in cella opercolata
Odore acido	Odore di colla da falegname
Mancanza di annerimento dei favi	Favi scuri, opercoli infossati, forati
Larva non filamentosa	Larva filamentosa
Scaglia asportabile	Scaglia non asportabile

Tabella 2. Principali differenze tra peste europea e peste americana.

VARROASI

La Varroasi è causata dall'acaro *Varroa destructor*, ectoparassita confuso fino a pochi anni fa con un altro acaro a lui molto simile la *Varroa jacobsoni*.

La classificazione corretta è stata proposta nel 2000 da Anderson e Trueman, quando, grazie a studi più approfonditi, si sono accorti che la *Varroa jacobsoni* non era in grado di riprodursi sull'*Apis mellifera*, riuscendo a parassitizzare solamente *Apis cerana*.

La *Varroa destructor* in origine era parassita dell'*Apis cerana*, alla quale però non arrecava particolari danni. Con l'introduzione dell'*Apis mellifera* nel sud est asiatico, per incrementare le produzioni di miele, si è avuto il passaggio dell'acaro da una specie all'altra e la conseguente diffusione in tutto il mondo.

Attualmente sono stati individuati due aplotipi di *Varroa*: quello indicato come "coreano", "tedesco" o "russo" particolarmente aggressivo nei confronti dell'ape europea e diffuso in Asia continentale, Europa, Africa settentrionale e America e quello "giapponese", meno aggressivo e diffuso in Giappone, Indonesia e America meridionale.

La *Varroa* possiede un apparato boccale pungente - succhiante e per tutto il suo ciclo vitale rimane ectoparassita dell'ape.

L'acaro introduce i suoi stiletti boccali attraverso la cuticola degli sterniti addominali, surgendo emolinfa sia dalla covata, con predilezione di quella maschile, sia dalle api adulte, quali fuchi e operaie.

La *Varroa* può vivere attaccata alle api, talvolta anche alla regina, ma predilige quelle giovani, in particolar modo le nutrici, perché si servono di queste per introdursi nelle cellette prima dell'opercolatura.

La parassitizzazione della fase adulta chiamata anche fase foretica ha una durata, in caso di assenza di covata, variabile da alcuni giorni fino a sei mesi.

In presenza di covata, invece, la *Varroa* entra nelle celle un giorno o due prima dell'opercolatura, qui avviene la deposizione delle uova, la schiusa e la riproduzione dei nuovi acari, contestualmente al completamento dell'opercolatura.

Le Varroe figlie e le vecchie fondatrici abbandonano le celle attaccate al corpo delle api, quando queste sfarfallano. Una volta all'esterno restano

aggrappate con le loro zampe al tegumento delle api, localizzandosi preferibilmente tra i segmenti dell'addome dell'insetto, dove la cuticola è abbastanza sottile da permettere la perforazione dell'apparato boccale. Grazie alla possibilità di sopravvivere per diverso tempo sul corpo dell'ape, la Varroa è in grado di superare l'inverno e di ripresentarsi attiva con l'inizio della bella stagione.

I sintomi da varroasi, osservabili durante tutto l'anno, ma con maggiore frequenza in tarda estate, sono i seguenti:

A) nelle api adulte:

- riduzione della popolazione dell'alveare
- api con evidenti difficoltà di volo che lasciano l'alveare strisciando,
- sostituzione della regina,
- api che lasciano in massa l'alveare anche in autunno inoltrato o inizio inverno,

B) nella covata:

- covata irregolare con presenza di api di piccole dimensioni o dalle ali deformate,
- larve fuori posto nelle cellette e altre liquefatte sul fondo delle stesse,
- larve di colore bruno, come nei primi stadi della peste americana, ma senza viscosità



Fig. 3 - Varroa su larve di ape.

Di conseguenza le famiglie tendono a indebolirsi, esponendosi maggiormente al contagio di altre malattie e parassiti, al punto tale che nel giro di breve tempo si verifica lo spopolamento dell'intero alveare.

NOSEMIASI

Un'altra temibile malattia delle api adulte, per la quale è obbligatoria la denuncia all'autorità sanitaria locale è la Nosemiasi, causata da funghi unicellulari appartenenti alla classe dei *Microsporidi*, famiglia *Nosimatidi*, genere *Nosema*. Esistono due diverse specie di *Nosema* che colpiscono l'*Apis mellifera*: il *Nosema apis* ed il *Nosema ceranae*, responsabili di due forme completamente distinte di patologie.

Il *Nosema apis* è responsabile della forma classica della malattia, è diffuso nelle regioni fredde e umide dell'Europa centrale e settentrionale e i suoi sintomi compaiono principalmente in primavera.

L'agente eziologico vive e si moltiplica a spese delle cellule epiteliali del mesointestino delle api adulte, mentre non attacca mai gli stadi preimmaginali.

Il protozoo si propaga all'interno dell'alveare attraverso le proprie spore contenute negli escrementi delle api ammalate. Alimentandosi con miele infetto, causa il contatto con le feci, le api ingeriscono le spore che, giunte nel lume intestinale, germinano e danno origine ad una forma ameboide. Queste penetrano nelle cellule della parete del mesointestino dell'insetto dove si sviluppano, evolvono e si moltiplicano nutrendosi del citoplasma cellulare. Le cellule invase scoppiano, la mucosa intestinale si logora e le funzioni digestive vengono, quindi, definitivamente compromesse.

I sintomi della nosemiasi osservabili nell'alveare sono:

- comparsa di disturbi intestinali e in particolar modo di diarrea che imbratta l'alveare,

- incapacità delle giovani nutrici di secernere pappa reale,
- diminuzione dei voli e degli spostamenti delle bottinatrici,
- diminuzione della capacità di deporre uova, nel caso di infezione dell'ape regina.

Dapprima si verifica un lento spopolamento dalla colonia delle api adulte, che diventa sempre più evidente con il passare del tempo, inoltre il vigore della famiglia diminuisce, le api danno segno di irrequietezza, volano anzitempo e si alimentano eccessivamente. Con il procedere dell'infezione le api perdono la capacità di volare, iniziando a trascinarsi per l'arnia, tremano e si riuniscono in gruppetti, proseguono la loro esistenza ormai paralizzate ed infine muoiono con le zampe rinchiusse sotto il torace.

Nosema ceranae è una nuova specie di microsporidio, isolato per la prima volta nel 1996 sull'ape asiatica *Apis ceranae*. Negli ultimi anni è riuscito a passare sull'ape europea e quindi a diffondersi in tutto il mondo, Italia compresa. Questo parassita provoca sintomi diversi dalla nosemiosi classica causando gradualmente, ma veloci spopolamenti delle colonie, abbondanti morie in autunno e inverno e basse produzioni di miele. (Higes et al. 2007 Paxton et al 2007)

AVVELENAMENTI DELLE API

Gli avvelenamenti delle api sono causati principalmente da prodotti fitoiatrici e in particolar modo dagli insetticidi, mentre le intossicazioni causate da prodotti vegetali naturali sono rare e limitate nel tempo (Contessi 2007).

L'avvelenamento chimico dell'ape può avvenire in tre modi: per ingestione, contatto o asfissia, anche se la moria è causata principalmente dai primi due.

L'avvelenamento per ingestione si verifica quando il principio attivo di un fitofarmaco giunge sulle fonti di alimento, quali nettare, polline e acqua, che, essendo ingerite, intossicano l'ape.

Si distinguono una tossicità diretta ed una indiretta.

La prima si verifica quando la molecola tossica avvelena direttamente il cibo, uccidendo le api bottinatrici⁴, mentre la seconda è causata dall'aumento di concentrazione di sostanze sub-letali, che accumulandosi all'interno delle arnie, raggiungono livelli tali da causare il lento, ma costante declino dell'intero alveare.

Da un'indagine svolta da Stanger e Winterlin, ad esempio, su un campo di medica trattata con Carbaryl⁵ durante la fioritura è risultato che il giorno del trattamento il polline raccolto all'ingresso dell'arnia conteneva 0,24 ppm di principio attivo e quello immagazzinato ne conteneva 0,33 ppm. A distanza di tre giorni dal trattamento la concentrazione del principio attivo, presente nel polline immagazzinato, era salita a 0,44 ppm e sette mesi dopo il trattamento, erano state trovate ancora tracce di 0,002 ppm nel miele.

Per determinare la tossicità orale dei singoli prodotti, generalmente nelle prove di laboratorio le api sono isolate in piccoli gruppi e nutrite con sciroppo di zucchero candito o miele diluito e avvelenate con dosi note di principio attivo.

Il testimone è formato da un gruppo di api, posto nelle stesse condizioni e nutrito con alimento non trattato.

⁴ Le bottinatrici sono le api addette alla raccolta del cibo e dell'acqua. Per maggiori approfondimenti si rimanda al capitolo «Organizzazione delle api».

⁵ Insetticida appartenente alla famiglia dei carbammati.

Le intossicazioni sub-letali sono causate da principi attivi che, per caratteristiche proprie o perché assunti a basse concentrazioni, provocano alterazioni nel comportamento delle api senza, tuttavia, ucciderle.

E' stato osservato (Johansen 1978), ad esempio, che gli insetticidi organo fosforici, se applicati a bassissime concentrazioni, possono causare strani comportamenti aggressivi all'interno della colonia. Altri Autori hanno costatato che dosi sub-letali alterano le trasmissioni delle informazioni durante la danza delle esploratrici (Porrini 2007) e impediscono alle api di volare, perché ne causano lo scoordinamento dei movimenti.

L'avvelenamento per contatto si può verificare per via topica, quando l'ape viene direttamente investita dal prodotto chimico o quando viene a contatto con substrati avvelenati.

L'intossicazione per contatto dipende sia dalle caratteristiche chimiche e fisiche del prodotto sia dalla sua capacità di superare le barriere fisiologiche o morfologiche dell'insetto.

MORIA DELLE API

Nel nostro Paese si evidenziano tre momenti particolarmente a rischio, segnalati dagli apicoltori in base ai periodi, alle zone e alla consistenza dei danni subiti dalle api.

I periodi critici sono:

- 1) alla ripresa dell'attività apistica (gennaio - febbraio);
- 2) in primavera (marzo - aprile) durante la semina delle colture primaverili - estive e durante i trattamenti ai fruttiferi;
- 3) a metà giugno per i trattamenti alla vite contro *Scaphoideus titanus*.

Le mortalità nel secondo e nel terzo periodo sono da attribuire, quasi esclusivamente, ai trattamenti fitosanitari, mentre gli spopolamenti di inizio anno si configurano come un classico fenomeno da spopolamento che negli Stati Uniti viene denominato CCD e precisamente *Colony Collapse Disorder* (Porrini 2007).

COLONY COLLAPS DISORDER (CCD)

Il CCD o *sindrome del collasso* delle colonie è un problema di rilevante interesse ecologico ed economico, che sta causando lo spopolamento di interi alveari.

La sindrome della scomparsa degli alveari era nota già nel XIX secolo, ma negli ultimi tempi sembra essersi particolarmente accentuata e diffusa in America settentrionale, Europa e Australia.

Nel corso dell'inverno 2006-2007 gli apicoltori degli Stati Uniti hanno segnalato una rilevante mortalità delle colonie di api con perdite di alveari comprese tra il 30 e il 90% (D. vanEngelsdorp 2007).

Spopolamenti di alveari, con sintomatologie simili a quelle descritte negli USA, si sono verificate anche in alcuni stati europei come Francia e Italia con perdite di api nell'ordine del 20 e 30%.

I sintomi riconducibili al CCD sono:

- improvvisa scomparsa delle api adulte dalla colonia;
- presenza di numerosi favi con covata opercolata non alterata da possibili infestazioni da parassiti, a significare che le colonie erano relativamente sane prima dello spopolamento;
- presenza di scorte alimentari, come polline e miele, non saccheggiate da altre api;
- assenza di api morte nelle vicinanze degli alveari;
- presenza minima di tarma della cera e del coleottero *Athina tumida*, insetto parassita degli alveari, non ancora presente ad oggi in Europa;
- presenza della regina circondata da un piccolo gruppo di giovani nutrici.

Le cause che provocano il collasso delle colonie di alveari sono ancora da dimostrare, e benché siano già stati svolti molti studi e ricerche, attualmente sembra che più fattori concorrano a determinare il CCD.

Tra le possibili cause si prendono in considerazione:

- l'infestazione da *Varroa*, che tende a indebolire e diminuire la funzionalità e vitalità delle api;
- la presenza di nuove malattie o di malattie emergenti, come ad esempio la nuova specie di *Nosema* (*Nosema ceranae*);
- l'avvelenamento da fitofarmaci e in particolare da insetticidi neonicotinoidi;
- la gestione apistica e trattamenti contro la *Varroa* condotti con scarsa attenzione;
- la possibile presenza di virus (es. IAPV);
- la malnutrizione causata da pollini e nettari a basso contenuto proteico;
- i disturbi causati dalle radiazioni elettromagnetiche e dai cambiamenti climatici.

INFESTAZIONI DA VARROA

Alcuni studiosi ritengono che la causa principale del CCD sia la *Varroa destructor*. Questo acaro, infatti, attacca le giovani larve succhiando l'emolinfa senza, però, ucciderle. Le api che nascono sono malformate e deboli e non riescono a produrre la pappa reale, alimento essenziale per la nutrizione delle giovani api operaie e della regina.

La Varroa, inoltre, è vettore di diversi virus ed in particolare del Virus DWV o Virus delle Ali Deformi, che provoca malformazioni nelle ali delle api e del Virus APV o Virus della Paralisi Acuta, particolarmente dannoso perché uccide l'ape in pochi giorni.

La saliva dell'acaro, inoltre, crea un'immunodeficienza nell'ape, che quindi non è più in grado di mettere in atto barriere difensive esponendosi maggiormente alle altre malattie.

E' stato accertato che nelle pupe infestate da Varroa l'enzima FAD-glucosodeidrogenasi (GLD), responsabile della risposta immunitaria dell'insetto, ha un'attività molto più bassa rispetto alle pupe non infestate (Contessi 2007).

INFESTAZIONI DA NOSEMA

Un'altra possibile causa dello spopolamento degli alveari potrebbe essere ricondotta alle infestazioni del microsporidio *Nosema ceranae*.

Il fenomeno del CCD sembra essere concomitante con l'arrivo nell'ape mellifera del microsporidio *Nosema ceranae* (Martín-Hernández et al., 2007).

È stato osservato che elevate infezioni di Nosema sono in grado di annientare un'intera colonia in appena otto giorni.

I sintomi del CCD, tuttavia, non sono uguali a quelli causati dal Nosema e pertanto questo parassita potrebbe essere solo uno dei fattori dello spopolamento

degli alveari e non la causa principale. A prova di ciò si è riscontrato che in colonie senza sintomi simili al CCD c'erano comunque infezioni da Nosema.

PRESENZA DI VIRUS

Altri Autori (Cox-Foster et al. 2007) suggeriscono che una causa del CCD possa essere il virus Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV) che causa una precoce morte delle api.

Questo virus, infatti, è stato trovato in molte colonie analizzate affette da CCD, facendo ipotizzare che tra IAPV e CCD ci sia una stretta correlazione.

A discapito di questa tesi, alcuni scienziati (Anderson et East 2008) hanno osservato che in diverse colonie affette da CCD non è stato trovato il virus IAPV, e al contrario, colonie infette da IAPV non presentavano sintomi riconducibili al CCD.

Secondo questi ultimi, inoltre, il virus IAPV inizia a uccidere le api, quando il loro sistema immunitario è già fortemente debilitato da altre cause, come, ad esempio, la Varroa o lo stesso CCD.

Si deve presupporre, pertanto, che il virus non possa essere l'agente principale del CCD, bensì un fattore concomitante.

EFFETTI DA INSETTICIDI

Un'altra possibile causa dello spopolamento degli alveari può essere attribuito agli agrofarmaci.

Oltre alle mortalità provocate da grossolani errori d'impiego per interventi fitoiatrici eseguiti in fioritura, in presenza di vento o per contaminazione della flora spontanea, gli agrofarmaci, in particolare i neonicotinoidi, sono sospettati di indurre, a dosi sub-letali, alterazioni sul comportamento, sull'orientamento e sull'attività sociale delle api (Porrini 2007).

In seguito a numerosi esperimenti effettuati somministrando dosi sub-letali dell'insetticida imidacloprid (Bayer Crop Science), sono state notate nelle api alterazioni sia delle capacità comunicative, che modificano le danze, sia dell'orientamento, per cui il ritorno delle bottinatrici nell'alveare risulta difficoltoso, se non impossibile (Medrzycki et al., 2003; Bortolotti et al., 2003).

È stato riscontrato, inoltre, che, a fronte di concentrazioni di 100 ppb ovvero di 100 mg/l di imidacloprid, si interrompono le comunicazioni tra le api riguardo alla posizione della fonte di cibo e ciò provoca una riduzione temporanea o la fine dell'attività di foraggiamento (Bortolotti 2003).

L'incidenza che possono avere gli insetticidi sulla moria delle api è di difficile valutazione, perché le bottinatrici durante i voli riescono a coprire distanze molto lunghe, esplorando vaste aree e quindi risulta impossibile determinare con esattezza le cause della loro morte.

Ciò nonostante le ingenti perdite di alveari avvenute durante la primavera in diversi Stati Europei, stagione normalmente favorevole a questo insetto, fanno ipotizzare che l'utilizzo degli insetticidi sia la causa principale della moria.

Da un'indagine svolta dall'UNAAPI (Unione Nazionale Associazione Apicoltori d'Italia) è risultato che a inizio aprile 2007 sono scomparse più di 40.000 colonie in Pianura Padana. Questo periodo, favorevole allo sviluppo degli alveari, coincide con quello delle semine di mais, solitamente conciato con insetticidi sistemici.

ALTRE CAUSE

Altre probabili cause di moria, oggetto di studio di alcuni Autori, riguardano gli effetti negativi delle radiazioni elettromagnetiche, prodotte dagli apparecchi radio e dai cellulari sull'orientamento in volo delle api.

Un altro fattore che può contribuire all'indebolimento delle colonie e quindi alla loro maggiore suscettibilità ai patogeni, può essere imputato alle grandi estensioni di monocultura. Queste, infatti, limitano necessariamente la disponibilità di fonti alimentari integrative per le api, causandone la malnutrizione e quindi un generale indebolimento delle colonie.

Dagli studi effettuati e dalle ricerche in corso la maggior parte degli scienziati è concorde nel ritenere che alla base della mortalità delle api e dello spopolamento degli alveari contribuiscano più fattori concomitanti.

Si può ritenere, pertanto, che il fenomeno sia complesso e nonostante alcune cause siano state identificate, molte altre necessitano di ulteriori verifiche e sperimentazioni (Porrini 2008).

STORIA DEI NEONICOTINOIDI

La nicotina, sotto forma di estratti di tabacco, è stato il primo insetticida di origine vegetale.

Essa era utilizzata già alla fine del '600 per il controllo dei fitofagi seguita poi, agli inizi dell'800, dalle piretrine, estratte dai fiori di piretro e dal rotenone, ottenuto dalle radici di piante tropicali e subtropicali appartenenti alla famiglia delle leguminose.

Oltre alla nicotina, dal tabacco si estraggono altri due alcaloidi la nornicotina e la neonicotina. Quest'ultimo alcaloide è stato trovato anche in una Chenopodiacea, la *Anabasis aphylla*; In seguito agli studi effettuati sui legami chimici di questa molecola è iniziata la sintesi di sostanze simili ad essa: i neonicotinoidi.

I neonicotinoidi sono tra i più recenti insetticidi di sintesi che stanno progressivamente rimpiazzato le altre molecole sia di origine artificiale sia naturale.

La commercializzazione di questi insetticidi è iniziata negli anni '90 e la prima registrazione è stata effettuata in Francia nel 1991. Da allora hanno conosciuto un incremento notevole d'uso, andandosi a sostituire ai carbammati, fosfororganici e piretroidi, diventando il gruppo di insetticidi più diffuso negli Stati Uniti.

I loro utilizzi comprendono la concia delle sementi di mais, del cotone, del colza, della bietola e del girasole, trattamenti fogliari di molti fruttiferi e di piante ornamentali e trattamenti granulari al terreno.

I neonicotinoidi possiedono una buona attività insetticida nei confronti di insetti predatori, fitofagi e zoofagi e risultano efficaci anche sugli insetti resistenti ad altri gruppi chimici. Per questo motivo hanno un vasto impiego nella protezione delle colture, ma anche nel controllo delle infestazioni parassitarie degli animali domestici da compagnia. Inoltre sono dotati di buona attività sistemica all'interno delle piante, perché possono essere assorbiti dalle radici, dal fusto e dalle foglie ed essere traslocati attraverso la corrente xilematica in tutti gli

organi vegetali di nuova formazione. Possiedono, infine, un'azione citotropica e translaminare, quando i trattamenti sono applicati sulla vegetazione in atto.

MECCANISMO DI AZIONE

I neonicotinoidi agiscono a livello del sistema nervoso degli insetti con un meccanismo di tipo acetilcolinomimetico, possedendo, infatti, una struttura simile all'acetilcolina, si sostituiscono ad essa legandosi in modo irreversibile ai recettori nicotinici (nAChRs) localizzati a livello delle sinapsi tra due neuroni. Questo processo provoca l'alterazione della trasmissione degli impulsi nervosi, che determina, conseguentemente, la paralisi e la morte dell'insetto.

SELETTIVITÀ DEI NEONICOTINOIDI

Questi insetticidi sono dotati di bassa tossicità, acuta e cronica per mammiferi, uccelli e specie acquatiche, perché i loro recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChRs), hanno una bassa affinità ai neonicotinoidi, mentre la nicotina risulta essere molto più tossica.

Si può osservare, infatti, che la tossicità acuta dei neonicotinoidi, espressa in termini di LD50, risulta essere più bassa rispetto alla nicotina da 3,5 a 500 volte per i mammiferi, e da 10 a 250 volte per pesci.

L'indice NOAEL (*No Observed Adverse Effect*), che determina la dose di non effetto avverso, varia da 0,6 a 127 mg/kg peso/giorno nel ratto. Ciò significa che un uomo del peso di 70 Kg può essere esposto a una dose giornaliera massima tollerabile oscillante fra 0,4 e 90 mg di p.a. .

PRINCIPI ATTIVI DEI NEONICOTINOIDI

I principi attivi dei nicotinici di sintesi possono essere suddivisi, a seconda della formula chimica, in Cloronicotinili e Tianicotinili.

Ai primi appartengono: Acetamiprid (Epik), Imidacloprid (Confidor, Gaucho, Warrant, Kohinor) e Thiacloprid (Calipso); ai secondi Clothianidin (Poncho e Dantop), Thiamethoxam (Actara e Cruiser).

Chemical	Brand name	Acute Contact	Acute Oral
thiamethoxam	Actara, Platinum, Helix, Cruiser, Adage, Meridian, Centric, Flagship	Highly toxic	Highly toxic
clothianidin	Poncho, Titan, Clutch, Belay, Arena	Highly toxic	Highly toxic
imidacloprid	Confidor, Merit, Admire, Ledgend, Pravado, Encore, Goucho, Premise	Highly Toxic	Highly toxic
acetamiprid	Assail, Intruder, Adjust	Toxic	Toxic
thiacloprid	Calypso	Toxic	Toxic

Tabella 3 Principi attivi e nomi commerciali dei cinque neonicotinoidi.

IMIDACLOPRID

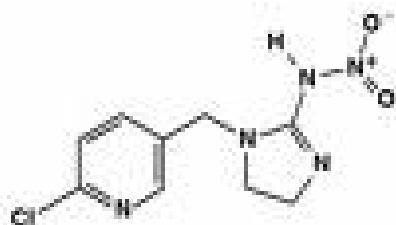


Fig. 4 - Struttura della molecola di imidacloprid.

L'imidacloprid è stato il primo neonicotinoide a essere sintetizzato. Questa molecola fu scoperta da Nihon Bayer nel 1985 dopo diversi tentativi, tesi ad ottenere molecole dotate di buona persistenza d'azione e attività insetticida.

L'imidacloprid è un sistemico che entra nell'insetto mediante ingestione o per contatto diretto. È utilizzato per controllare diversi tipi di insetti da quelli ad apparato boccale succhiatore a quelli terricoli.

TRASLOCAZIONE NELLE PIANTE

L'imidacloprid è rapidamente trasferito attraverso i sistemi linfatici della pianta in tutti gli organi vegetali. Il principio attivo è stato trovato in piante di mais e girasole a livelli sufficientemente elevati da costituire una minaccia per le api mellifere (Bonmatin et al. 2005).

L'imidacloprid mostra una buona traslocazione in direzione acropeta, attraverso lo xilema dalle radici verso i germogli e le foglie e una più bassa mobilità basipeta, attraverso il floema in direzione delle radici e degli organi di riserva.

L'insetticida è dotato di elevata capacità di penetrazione attraverso le membrane e quindi, è facilmente trasportato all'interno delle piante, poiché la molecola possiede un'elevata solubilità in acqua di 0,51 g/l, un alto coefficiente di

dissociazione $pK_a = 14$ e un basso coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua $Kow = 0,51$ (Sur e Stork 2003).

Il principio attivo è una molecola apolare e quindi non si lega ai canali ionici del floema. Grazie a questa proprietà la molecola è libera di diffondersi dai vasi xilematici a quelli floematici, a seconda della permeabilità delle membrane (Sur e Stork 2003). Nonostante ciò i vasi preferenziali di diffusione dell'imidacloprid rimangono quelli xilematici, mentre i floematici contribuiscono in minima parte alla sua diffusione. (Bromilow e Chamberlain 1989).

Una volta trasportato nelle foglie, il p.a. si accumula in esse, poiché non è più in grado di ritornare nel sistema vascolare della pianta e per questo motivo nelle foglie più vecchie si trovano concentrazioni più alte.

SCHEMA TECNICA

L'imidacloprid possiede una bassa pressione di vapore di 1.0×10^{-7} mmHg, ciò significa che è un insetticida poco volatile.

È improbabile, pertanto, che possa essere disperso in aria su vaste aree. La tossicità acuta espressa in DL50 è di 2500 mg/kg peso vivo per ratti. La DL50 dermale in 24 ore in ratto è superiore ai 5000 mg/kg. L'imidacloprid è un insetticida non irritante per gli occhi e la pelle.

Questo insetticida possiede una tossicità per i pesci moderatamente bassa calcolata come concentrazione letale media in 96 ore LC50 di 211 mg/l per le trote e di 280 mg/l per le carpe mentre possiede una elevata tossicità misurata in DL50 per le api (*Apis mellifera*) stabilita in 8 ng/ ape.

L'emivita, cioè il periodo di dimezzamento dell'attività dell'imidacloprid per idrolisi può variare da 33-44 giorni a pH 7 e 25°C; in media arriva a trentanove, quando si trova sulla superficie del suolo e fino a 229 giorni quando penetra nel terreno. Essa varia, infatti, in funzione della tecnica di distribuzione stessa: con i trattamenti effettuati al suolo o ai semi come concianti, avviene velocemente, una

volta assorbita dalle radici, mentre con i trattamenti fogliari in soluzioni spray e con trattamenti al suolo è più lenta (Sur e Stork 2003).

La degradazione dell'imidacloprid avviene principalmente attraverso tre processi che portano alla formazione di altrettanti composti.

Nel primo processo si legano due gruppi ossidrilici a quello imidazolico della molecola dell'imidacloprid e per successiva condensazione si forma una olefina.

Nel secondo processo la molecola di imidacloprid subisce una riduzione che porta alla formazione della nitrosamina, questa, a sua volta, può essere trasformata in guanidina o in triazinone. La guanidina, infine, si trasforma in urea per perdita di un gruppo NO.

Nel terzo processo l'imidacloprid viene ossidato e si forma l'alcol 6-cloropicolyl, che coniugandosi con una molecola di glucosio, forma il gentiobioside.

Grazie a questa lunga persistenza nel suolo le radici delle piante possono assorbirlo per diverso tempo. Dimostrando una elevata solubilità in acqua di 514 ppm l'insetticida possiede un alto potenziale di lisciviazione che porta alla sua diffusione nelle falde acquifere.

ORGANIZZAZIONE DELLE API

La popolazione di una colonia di api è formata da tre tipi di individui. Una sola femmina feconda o ape regina, molte migliaia di femmine sterili o api operaie, poche centinaia di maschi o fuchi, presenti, tuttavia, solo dalla primavera all'autunno.

Le api operaie si distinguono facilmente perché hanno il corpo ricoperto da una fitta peluria, le ali lunghe quasi quanto il corpo e gli occhi ben separati sulla fronte.

I fuchi invece sono di dimensioni maggiori, ma tozzi, hanno ali più lunghe del corpo e due occhi molto grandi tanto da arrivare quasi a congiungersi.

Le regine sono più grandi e più snelle, possiedono un grande addome turgido e lucente che sporge abbondantemente delle ali.

APE REGINA

L'ape regina nasce da un uovo fecondato alimentato per tutta la durata della fase larvale con sola pappa reale e deposto in una particolare cella a forma di cupolino detta *cella reale*. La funzione dell'ape regina è quella di accoppiarsi e di deporre alcune migliaia di uova al giorno. La durata di deposizione delle uova è mediamente di tre - quattro anni, dopo di che, la provvista di spermatozoi termina e la regina diventa *fucaiola*, riuscendo a deporre solo covata maschile.

Normalmente questa situazione non si verifica, perché prima che l'ape regina si esaurisca, altre api operaie nutrono uova fecondate per allevare nuove regine.

FUCHI

I fuchi sono i maschi di ape, sviluppati da uova non fecondate. Di solito nascono quando la regina è al secondo anno di vita o da api operaie che iniziano a deporre uova. Questa seconda possibilità avviene quando le operaie, in assenza dell'ape regina, incominciano a sviluppare gli ovari, fino allora rimasti atrofizzati a causa dal rilascio di ferormoni prodotti dalla regina.

Le funzioni dei fuchi non sono solo quelle di accoppiarsi con le regine, ma anche di contribuire alla vita della colonia. Le più recenti osservazioni hanno dimostrato che i fuchi sono utili nella produzione di calore, necessario allo sviluppo della covata e alla distribuzione del cibo all'interno dell'arnia.

API OPERAIE

Le operaie nascono da uova fecondate, ma alimentate con pappa reale nei primi tre giorni di vita e con miele e polline nei successivi.

Dalla deposizione delle uova alla comparsa delle giovani api trascorrono tre settimane.

I loro compiti sono molteplici e differenziati in base all'età. Per circa tre giorni dopo la nascita si dedicano alla pulizia e alla preparazione delle celle che debbono accogliere le uova della regina. Dal quarto giorno iniziano a sorvegliare e nutrire la covata e per questo motivo prendono il nome di *nutrici*, prima occupandosi delle larve più anziane, fornendo loro miele, polline e acqua, poi, con lo sviluppo delle ghiandole che producono pappa reale, si occupano delle larve deposte da meno di tre giorni e di quelle reali.

Dal decimo al sedicesimo giorno entrano in funzione le ghiandole ceripare e iniziano, quindi, ad occuparsi dei lavori di costruzione e riparazione dei favi. A circa venti giorni dalla nascita si dedicano alla difesa della comunità e fino alla

fine della loro vita alla raccolta del cibo nei campi, assumendo la funzione di api *bottinatrici*.

La divisione del lavoro, tuttavia, non è così rigida, come ora descritta, può accadere, infatti, che alcune bottinatrici tornino ad essere nutrici per necessità, sebbene le ghiandole produttrici di pappa reale si stiano atrofizzando e, al contrario, alcune api giovani si trasformino direttamente in bottinatrici. In altri termini per il buon funzionamento dell'alveare, in caso di necessità, ogni ape può cambiare funzione e svolgere qualsiasi lavoro.

Nel pieno delle maturità le bottinatrici sono in grado, spostandosi alla velocità media di 20 km/h, di recarsi a bottinare fino a una distanza di tre chilometri.

MORFOLOGIA

Come tutti gli insetti, le api hanno il corpo suddiviso in tre parti ben distinte: capo, torace e addome. Esternamente il loro corpo è protetto da un esoscheletro chitinoso, *la cuticola*, che gli conferisce rigidità. Le varie parti sono articolate fra loro mediante membrane elastiche, in cui la cuticola resta sottile e flessibile.

Il capo reca gli organi della vista, le appendici metameriche, le antenne e l'apparato boccale lambente succhiante.

Il torace, formato da tre segmenti, è provvisto ventralmente di tre paia di appendici metameriche, *le zampe*, e da due paia di estroflessioni tegumentarie, *le ali*.

Il torace è attraversato del tubo digerente e contiene i sacchi aerei e i muscoli alari.

L'addome è formato da segmenti mobili detti *uriti* ed è privo di appendici; contiene la parte terminale del tubo digerente, e altri organi, quali l'apparato linfatico e ovidepositore che nelle api operaie è trasformato in pungiglione.

APPARATO BOCCALE

L'apparato boccale delle api è di tipo lambente succhiante ed è composto delle seguenti parti:

- **labbro superiore**, poco sclerificato, serve a coprire l'apparato stesso;
- **due mandibole** a forma di pinze con bordo arrotondato, privo di dentellature adatte alla lavorazione della cera e alla raccolta della propoli, ma incapaci di lacerare superfici continue, come ad esempio le bucce sane dei frutti;
- **due mascelle**, molto mobili, costituite da varie parti ben distinte tra cui il *cardine*, lo *stipite*, la *galea* e da un piccolo *palpo*: la loro funzione principale consiste nel formare, assieme ad altre appendici, un canale di suzione degli alimenti liquidi;
- **il labbro inferiore**, originato dalla fusione di un secondo paio di mascelle, è formato di vari articoli, in parte impari, quali *postmento*, *premento* e *ligula* e in parte pari, quali *paraglosse* e *palpi boccali*. Questi ultimi, assieme alle mascelle, concorrono alla formazione del canale di suzione, mentre la ligula, formata a sua volta dall'unione delle glosse, appare come la parte più lunga dell'apparato boccale, misurando, a seconda delle razze, da 5,5 a 7,1 mm ed è munita di un canalicolo attraverso il quale viene emessa la saliva e termina con un'espansione distale a cucchiaio, il *labello*.

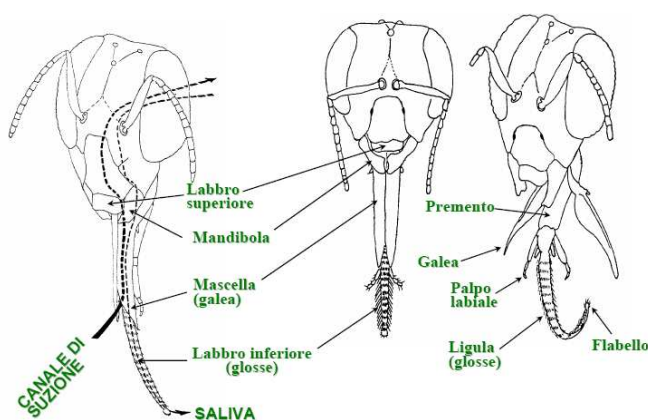


Fig. 5 - Diverse prospettive dell'apparato boccale lambente delle api.

Allo stato di riposo e in volo l'apparato boccale viene mantenuto ripiegato sotto il capo. Quando l'ape desidera raccogliere sostanze liquide come nettare, melata o acqua, stende le varie appendici e forma una specie di proboscide, costituita dalla ligula avvolta nella parte prossimale delle galee e dei palpi labiali. I liquidi sono aspirati per mezzo di una specie di "pompa" operante a livello della faringe.

Per utilizzare sostanze solide, ma solubili, dapprima emette un po' di saliva, attraverso il canale collocato nella ligula, poi aspira le sostanze disciolte attraverso la proboscide.

GUTTAZIONE

La guttazione è un fenomeno fisiologico di fuoriuscita di gocce d'acqua dalle foglie delle piante, che si osserva soprattutto di notte fino alle prime ore del mattino. L'acqua percola attraverso aperture dette *idatodi*, localizzate lungo i margini del lembo fogliare.



Fig. 6 - Gocce di guttazione su foglie di mais.

La guttazione si verifica quando la traspirazione fogliare è scarsa o nulla, ma le radici continuano ad assorbire sali minerali, i quali, a loro volta, per osmosi richiamano acqua. Questa situazione provoca una differenza di pressione tra l'apparato radicale assorbente e la superficie fogliare traspirante, perché la pianta continua ad assorbire acqua, ma non è in grado di perderla altrettanto velocemente con la traspirazione in assenza di fotosintesi.

La funzione della guttazione è, pertanto, quella di regolare il turgore fogliare delle piante (Curtis C.L. 1944).

Nell'acqua di guttazione si trovano sali minerali in eccesso e metaboliti della pianta (es. glucosio). Inoltre da prove svolte presso l'Università di Padova in collaborazione con il Dipartimento di Chimica è stato scoperto che nelle gocce di guttazione, provenienti da piantine di mais conciato, sono contenute discrete quantità di insetticidi utilizzati per la concia dei semi⁶. Gli insetticidi neonicotinoidi, essendo ad azione sistemica, penetrano nel sistema linfatico della pianta diffondendosi ovunque. La concentrazione di p.a. ritrovata nelle gocce di guttazione è da cinque a dieci volte inferiore a quella impiegata per la concia del seme (Girolami V. 2009).

⁶ Le concentrazioni di insetticidi rinvenute nelle guttazioni variano in funzione del p.a. Per i valori esatti si rimanda a pagina 44.

MATERIALI E METODI

ORIGINE DELLE API

Le prove sono state eseguite nella azienda sperimentale della Facoltà di Agraria, situata a Legnaro Padova.

Per gli esperimenti sono state utilizzate api femmine (*Apis mellifera ligustica*) provenienti da alcuni alveari sani allocati in parte nei campi della Facoltà e in parte dislocati sul territorio.

Le api sono state catturate da gennaio a maggio, prelevandole direttamente dall'alveare durante i mesi invernali e durante quelli primaverili con un guadino quando uscivano per volare.

PREPARAZIONE DELLE PIANTINE

Per ottenere le gocce di guttazione delle piante di mais sono stati seminati semi commerciali concitati con i seguenti neonicotinoidi: imidacloprid (Gaucho 350 FS, Bayer Cropscience; 0.5 mg/ seme), clothianidin (Poncho, Bayer Cropscience 1.25 mg/ seme), thiamethoxam (Cruiser 350 FS, Syngenta; 1mg/ seme) e fipronil (Regent 500 FS, Basf 1mg/ seme), tutti concitati, inoltre, con il fungicida Celest XL (Syngenta p.a. Fludioxonil 2,4% e Metalaxyl-M 0,93%).

Il fipronil non è un neonicotinoide, perché appartiene alla classe *fenilpirazoli*.

Questi insetticidi sono regolarmente registrati in Italia per la concia dei semi di mais.

Quelli utilizzati per la sperimentazione sono prodotti dalla Pioneer Italia e sono ibridi Hi-Bred PR34N84, mentre per le prove di controllo sono stati utilizzati semi ibridi PR33A46 non concitati.

Le prove sono state svolte, seminando sia in serra durante i mesi invernali, sia in pieno campo durante quelli primaverili. Durante le prove in serra la semina è stata effettuata in vasi di plastica contenenti terra mescolata a torba e sabbia. Ogni vaso conteneva dieci semi. Per ogni tipo di insetticida sono stati seminati sei vasi per un totale di 60 semi/insetticida e per la prova di controllo sono stati seminati sei vasi contenenti semi non concitati.

I vasi, contrassegnati da un'etichetta di riconoscimento, sono stati collocati su un piano rialzato a temperatura dell'aria media di 25 °C e umidità relativa variabile dal 68 al 90%. Durante tutto il periodo della sperimentazione ai semi è stata somministrata solo acqua.

Per le prove in campo, verso metà aprile, sono stati seminati sia i semi concitati con i quattro insetticidi sia quelli non trattati per i test di confronto.

La densità di semina è stata effettuata con distanze di 75 cm tra le file e 20 cm sulla fila.

RACCOLTA DELLE GOCCE DI GUTTAZIONE

Le gocce di guttazione sono state raccolte per tutta la durata del fenomeno che inizia con la germinazione del seme e dura circa 15-20 giorni. Per la raccolta delle gocce sono state utilizzate delle micro pipette Pasteur.

La raccolta in campo era effettuata al mattino tra le ore 8.00 e le 9.00, mentre quella in serra in tre turni: alle 8.00 alle 10.00 e alle 12.00, poiché il fenomeno di guttazione si prolungava maggiormente.

Il volume d'acqua di guttazione prodotta dalle piantine seminate in serra era maggiore di quella proveniente dalle piantine in pieno campo, riuscendo a raccogliere fino a 1-2 ml/giorno.

Le gocce raccolte erano tenute distinte per ogni tipo di insetticida ed erano versate in boccettine di vetro scuro fino al raggiungimento di 5 ml di soluzione. Successivamente metà di questa era spedita al laboratorio di analisi chimica del

Dipartimento di Chimica di Padova, mentre l'altra metà era utilizzata per saggiare la sua tossicità sulle api. Durante la notte tutti i campioni erano conservati in frigo alla temperatura di 2°C.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI RIFERIMENTO

Nel laboratorio del Dipartimento di Chimica sono state prodotte le soluzioni di acqua e principio attivo utilizzando Thiamethoxam, Clothianidin, Imidacloprid al 99.7% di purezza e Fipronil al 97,6% di purezza.

Questa operazione ha consentito di costruire le curve di tossicità, che sono servite, successivamente, a determinare le concentrazioni di p.a. nelle gocce di guttazione che erano letali per le api.

Per le analisi di laboratorio è stato utilizzato metanolo VWR e aceto nitrile (Riedel de Haen) di elevato grado di purezza, adatto per le analisi con l'High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Per la produzione di acqua pura è stata utilizzata l'attrezzatura Milli-Q (Millipore, Billerica, MA). Le analisi con HPLC sono state eseguite con il sistema a Cromatografia 680 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA) dotato di rivelatore DAD (Diode Array Detector), impostato per registrare lo spettro delle sostanze eluite fra i 200 e i 300 nm valori corrispondenti alla finestra utile per riconoscere i p.a. in questione.

Le condizioni di analisi cromatografica sono state ottimizzate nel seguente modo:

- flusso di eluente 1,3 ml/minuto,
- gradiente di eluizione composto da 30% di aceto nitrile e 70% di acqua nei primi quattro minuti e dal 100% di aceto nitrile fra i nove minuti e i tredici,
- temperatura della colonna di 20°C.

- le acquisizioni con il rilevatore DAD sono state effettuate a lunghezza d'onda di 252 nm per thiamethoxam, di 269 nm per clothianidin e imidacloprid e 215 nm per fipronil.

La calibrazione dello strumento è stata eseguita utilizzando soluzioni in metanolo a concentrazione nota comprese tra gli 0,1 e 100 mg/litro.

Le analisi chimiche delle soluzioni di guttazione sono state eseguite, previa filtrazione con filtro su siringa Millex HV 0.45µl (diametro 4 mm; Millipore), per iniezione diretta dei campioni di 100-300.

PROVA DI TOSSICITÀ DELLE GOCCE DI GUTTAZIONE SULLE API

Le prove con le api sono state eseguite in un laboratorio attiguo alla serra dell'Università. L'ambiente è stato condizionato ad una temperatura di 22 ± 3 °C.

Le api appena catturate sono state rinchiusse tutte assieme in una gabbia di 20x30 cm e non sono state alimentate per circa due ore; successivamente sono state collocate singolarmente in gabbie quadrate di 8x7 cm con telaio in plastica o metallo ricoperte di tulle.

Le gabbie erano disposte su un tavolo e illuminate con luce naturale proveniente dalle finestre e con luce artificiale.

Per la somministrazione dell'acqua di guttazione sono stati utilizzati dei micro capillari in vetro lunghi 100 mm e con diametro 1 mm che riuscivano a contenere circa 30 µl di soluzione.

Alle api è stata somministrata sia la soluzione della sola guttazione, sia la soluzione con l'aggiunta di miele al 15 % volume su volume o al 21% volume su peso. La variazione percentuale tra peso e volume è in funzione del peso specifico del miele che è $1,4 \text{ g/cm}^3$.

Per consentire alle api di bere e per verificare la quantità ingerita, il capillare di vetro contenente la soluzione è stato messo a contatto con la rete della gabbia, in modo che l'insetto potesse raggiungerlo estroflettendo la ligula.

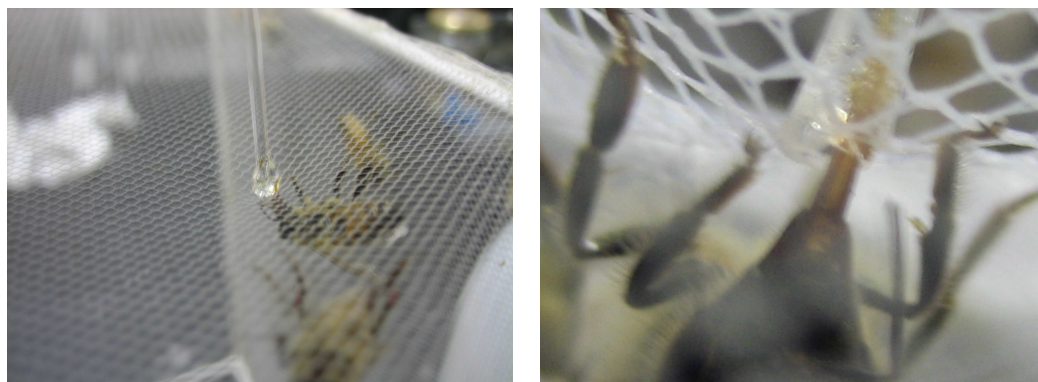


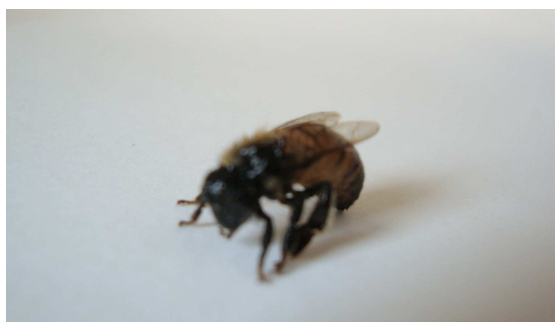
Fig. 7 - Particolare della somministrazione di acqua con capillare in vetro.

Osservando la variazione del livello di soluzione è stato possibile determinare abbastanza precisamente la quantità di liquido ingerita. Il livello minimo di consumo preso in considerazione era di 5 μ l.

Dopo quindici minuti dal consumo delle soluzioni, alle api è stata somministrata una goccia di miele.

Gli insetti sono stati osservati costantemente da quando hanno iniziato a bere fino alla manifestazione dei primi sintomi di intossicazione, registrando su una tabella la tempistica di queste fasi.

Il primo sintomo osservabile è stato l'anormale e irregolare inarcamento



dell'addome, mentre il secondo, seguito poco dopo, ma con tempi diversi in base al tipo di insetticida utilizzato, è stato il blocco delle ali, causato dalla paralisi dei muscoli del torace.

Fig. 8 - Inarcamento dell'addome

VALUTAZIONE DELLA DOSE DI EFFETTO

Per valutare la relazione tra concentrazione di insetticida e la sua tossicità, sono state somministrate alle api soluzioni contenenti concentrazioni via via crescenti di insetticida e miele al 15% utilizzando lo stesso metodo sopra descritto.

La soluzione di partenza dei tre neonicotinoidi: imidacloprid, clothianidin e thiamethoxam, è stata di 100 mg di p.a./litro, progressivamente diluita, dimezzandola ad ogni passaggio.

Per valutare gli effetti tossici alle diverse concentrazioni, i saggi sulle api sono stati ripetuti almeno dodici volte per tutti i livelli di diluizione di ogni insetticida. Le concentrazioni ottenute sono state confermate da analisi chimiche.

ANALISI STATISTICHE

Il tempo tra la somministrazione delle soluzioni di guttazione e la comparsa dei primi sintomi di intossicazione alle diverse concentrazioni sono state comparate con l'analisi della varianza ANOVA; in seguito è stato applicato il test Tukey- Kramer per valutare le differenze significative.

RISULTATI E DISCUSSIONI

Dalle osservazioni effettuate si evidenzia che le piante di mais hanno continuato a guttare abbondantemente per tre settimane dalla loro nascita. Sebbene le gocce di guttazione tendano a evaporare durante le ore più calde e soleggiate della giornata, alcune possono scorrere lungo i lembi fogliari della

piancicella e accumularsi nel calice tra le foglie e quindi essere disponibili per gli insetti per un periodo di tempo più esteso.

È stato constatato che il fenomeno di guttazione non avviene solo in condizioni di elevata umidità del suolo e dell'aria, ma anche in condizioni di bassa umidità.

Questo contribuisce ad aumentare l'evaporazione dell'acqua e il conseguente aumento di concentrazione dei soluti.

Durante i mesi di aprile-maggio le gocce di guttazione sono state trovate regolarmente sulla vegetazione fino alle ore nove o dieci del mattino. Solo nei giorni particolarmente ventosi non è stata rilevata la loro presenza.

La quantità di acqua prodotta dalle piante in serra variava da 30 a 150 μ l/giorno per pianta, mentre l'acqua prodotta da quelle nate in pieno campo era di 1-3 ml/ giorno per 100 piante.

CONTENUTO DI INSETTICIDA NELL'ACQUA DI GUTTAZIONE

Dalle analisi chimiche di laboratorio dell'acqua di guttazione dei campioni provenienti dalle piante originate da semi concitati, sono state trovate presenze di principio attivo.

Le quantità di p.a. riscontrate sono state: 47 ± 9.96 mg/litro per imidacloprid, 23.3 ± 4.2 mg/litro per clothianidin e 11.9 ± 3.32 mg/litro per thiamethoxam con differenze statistiche significative (ANOVA: $F = 7.51$; $df = 2.15$; $p = 0.005$).

La quantità di imidacloprid trovata nelle gocce delle piante nate da semi concitati con 0.5 mg p.a./ seme era sensibilmente maggiore della quantità di thiamethoxam trovata nelle gocce di guttazione proveniente da piante ottenute da semi concitati con 1 mg di p.a./seme. ($P < 0.01$; Tukey-Kramer test).

In virtù delle notevoli capacità di traslocazione dell'imidacloprid all'interno delle piante (vedi pag. 28), è stato riscontrato che la quantità di questo

p.a. nelle gocce di guttazione è molto più elevata rispetto al thiamethoxam e clothianidin.

Da analisi svolte su gocce di guttazione, ottenute da piante conciate con imidacloprid e coltivate in serra in singoli vasi, sono stati riscontrati valori di 82.8 ± 14.07 mg di p.a./litro con massimo fino a 110 mg di p.a./litro.

Da queste prove risulta che la concentrazione di p.a. nelle gocce di guttazione non dipende strettamente dalla densità di impianto dei semi, quanto piuttosto da fattori ambientali, quali l'evaporazione dell'acqua e il tempo necessario per l'emergenza delle pianticelle.

Alte concentrazioni di insetticida maggiori a 100 mg di p.a./litro sono state trovate anche con gli altri neonicotinoidi. Questi livelli si avvicinano e, a volte superano, le normali concentrazioni preparate per i trattamenti spray contro i parassiti.

TOSSICITÀ DELLE GOCCE DI GUTTAZIONE SULLE API

Nelle api che hanno consumato le soluzioni di guttazione avvelenate, il primo fenomeno osservabile è stato un'agitazione generale dell'insetto simile a quella che si osserva nelle api affamate.

Il sintomo caratteristico dell'intossicazione, tuttavia, è stato l'inarcamento dell'addome probabilmente causato dal riflesso dell'apparato pungente. In questa fase l'ape era ancora in grado di volare e talvolta era possibile osservare un abbondante rigurgito.

L'intossicazione, infine, comportava il blocco delle ali e la scoordinazione dei movimenti. Quest'ultima era la fase irreversibile e costituiva l'indicatore certo del sopraggiungere del momento letale per l'insetto.

Convenzionalmente è stato stabilito che la morte sopraggiungesse con l'immobilizzazione delle ali, sebbene alcune api continuassero ad avere piccoli riflessi delle zampe di durata variabile da caso a caso (Suchail et al. 2000).

Grazie all'utilizzo dei capillari in vetro è stato possibile accertare con buona approssimazione le dosi che ogni ape aveva assunto.

Le gocce di guttazione, provenienti da piante seminate in pieno campo e ottenute da semi concitati con i tre neonicotinoidi e somministrate alle api senza l'aggiunta di miele, hanno causato il blocco delle ali in un tempo compreso tra i 2 e 9 minuti dalla loro assunzione. (tab.4)

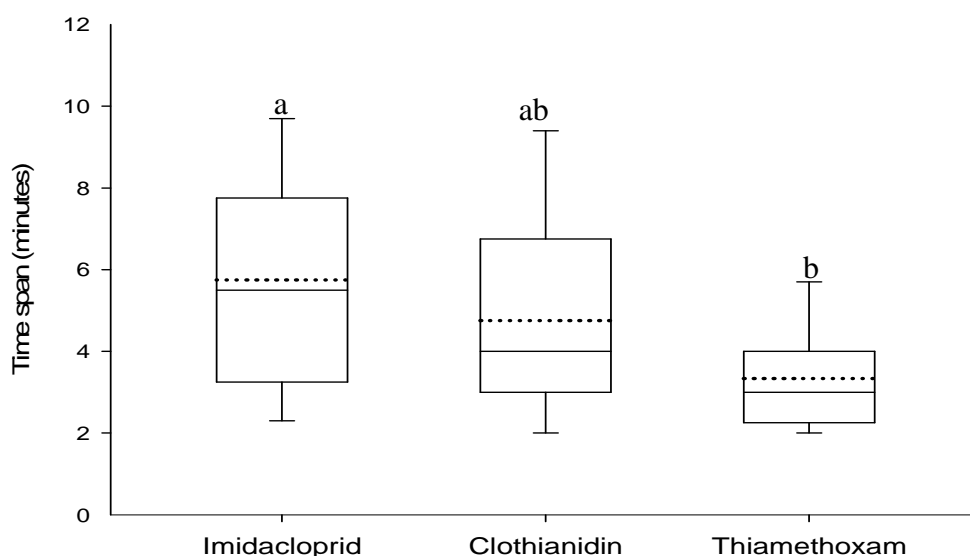


Tabella 4 – Il grafico rappresenta il tempo trascorso tra la comparsa del sintomo irreversibile del blocco delle ali e l'ingestione delle gocce di guttazione provenienti dalle foglie delle piante di mais nate in campo. Le guttazioni delle piante non trattate non hanno mostrato segni di tossicità. I margini rappresentano il massimo e il minimo dei tempi registrati, la linea tratteggiata indica il tempo medio, la linea alta, centrale e bassa del rettangolo indicano il 75, 50 e 25% del tempo. Le barre marcate con le differenti lettere indicano le differenze significative ($P < 0.05$; Tukey-Kramer test)

Dalle prove effettuate, le gocce di guttazione ottenute da semi concitati con thiamethoxam, sono risultate molto più tossiche rispetto a quelle contenenti imidacloprid (ANOVA: $F = 3.71$; $df = 2.33$; $P = 0.0035$). Per i test di controllo sono state utilizzate piante germinate da semi non concitati con insetticidi, ma trattati solo con fungicida; questi non hanno dato segni di tossicità.

Le api assetate consumavano immediatamente la soluzione di guttazione somministrata con il capillare, mentre quelle non assetate la consumavano in un lasso di tempo più prolungato. Per questo motivo non è sempre stato possibile ottenere dati omogenei tra i diversi saggi.

Per ovviare a questo inconveniente è stato aggiunto del miele (15%) alle soluzioni di guttazione ottenute delle piante coltivate in serra, in modo da indurre

le api a bere in tempi rapidi. E' stato possibile, quindi, indurre le api in prova a bere entro cinque minuti, consentendo la raccolta di dati più omogenei.

E' risultata una stretta correlazione tra concentrazione di p.a. e tossicità anche dai test effettuati somministrando acqua di guttazione proveniente da semi concitati, germinati in pieno campo.

In particolare in tutte le api che hanno ingerito la soluzione di guttazione proveniente da semi concitati con imidacloprid, la paralisi delle ali si è verificata in pochi minuti.

Questo sintomo si è verificato in un intervallo di tempo compreso tra i 2 e i 4 minuti per concentrazioni di 100 mg di p.a./litro e in 6-15 minuti per concentrazioni di 50 mg di p.a. /litro sia per le soluzioni contenenti solo acqua di guttazione sia per quelle contenenti una percentuale di miele (15%).

La tossicità del p.a., pertanto, è direttamente proporzionale alla sua concentrazione. Altri test effettuati, utilizzando le soluzioni di guttazione ottenute da semi concitati con thiamethoxam e clothianidin, dimostrano che, a parità di concentrazioni, la paralisi delle ali si manifesta in tempi più brevi rispetto a quelli necessari per l'imidacloprid. Questo dato mette in evidenza che il clothianidin e il thiamethoxam sono più tossici dell'imidacloprid, sebbene se ne trovino in minore quantità nelle gocce di guttazione.

VALUTAZIONE DELLA DOSE DI EFFETTO

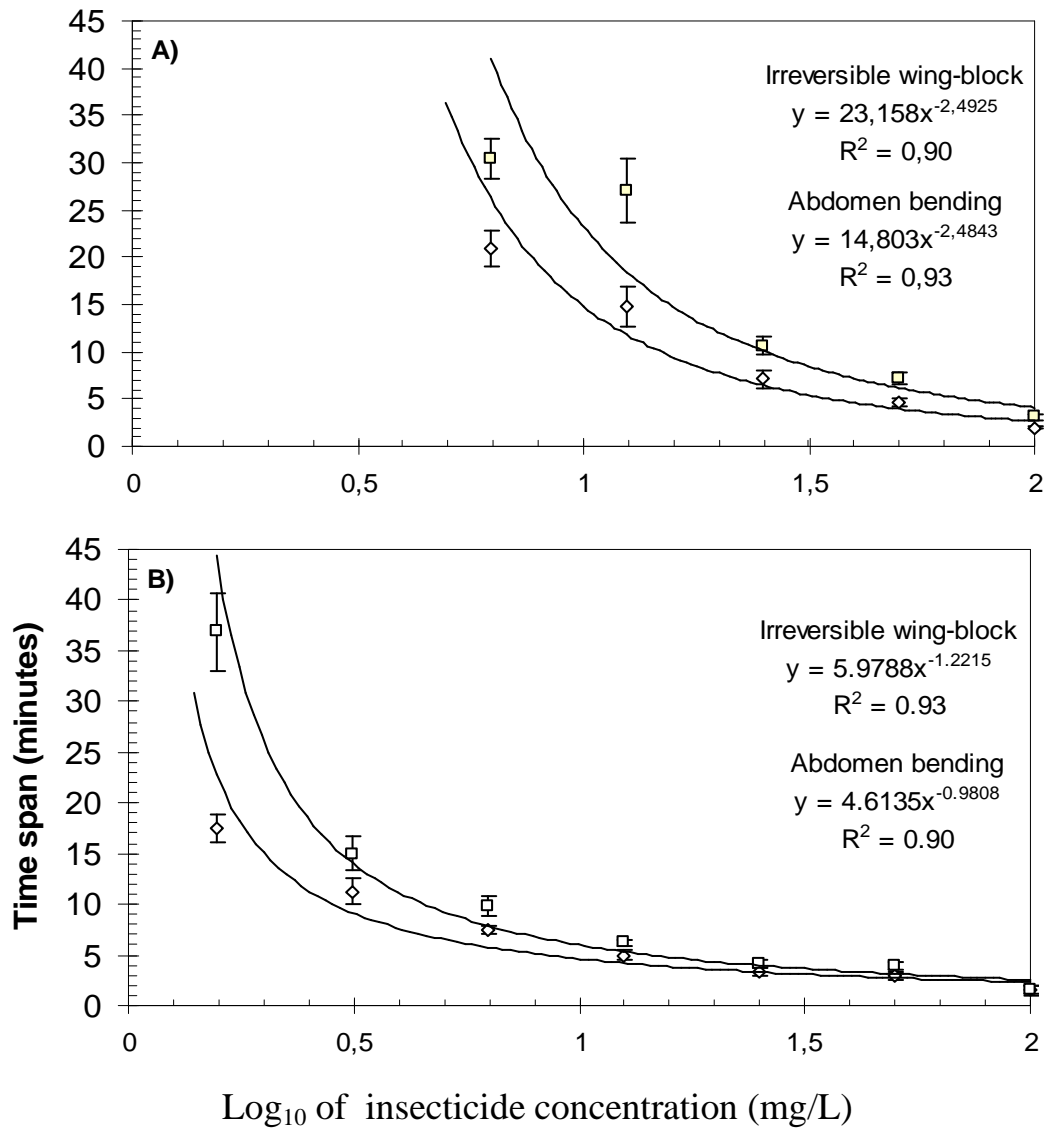
Per valutare la *dose di effetto* degli insetticidi sulle api si è proceduto alla somministrazione di soluzioni contenenti i principi attivi a diverse concentrazioni.

Si è notato che alcuni minuti dopo l'assunzione della soluzione con dosi letali del p.a., le api manifestavano gli stessi sintomi provocati dalla soluzione di guttazione, quali appunto, agitazione, inarcamento dell'addome e paralisi delle ali.

I sintomi sono risultati:

- irreversibili;

- presenti in tutti i tre neonicotinoidi testati;
- efficaci a tutte le concentrazioni di p.a. riportate in Tab.5



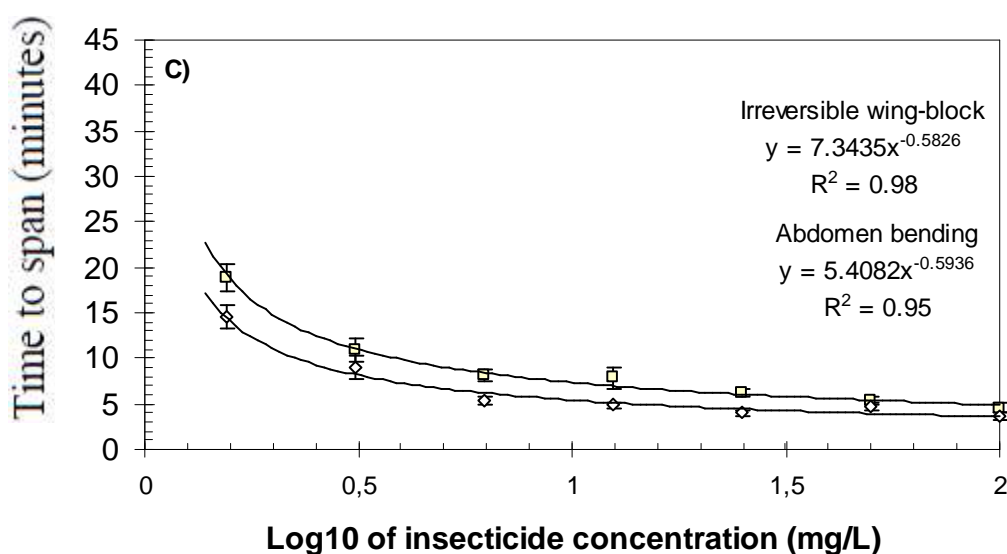


Tabella 5 – Tossicità dei 3 neonicotinoidi (A) imidacloprid, (B) clothianidin (C) thiametoxam sulle api. La tossicità dei neonicotinoidi è stata determinata osservando i due sintomi caratteristici da intossicazione e cioè blocco irreversibile delle ali (simbolo quadrato) e inarcamento dell'addome (simbolo rombo) dopo che le api avevano bevuto le soluzioni contenenti concentrazioni pure e note di insetticida con l'aggiunta del 15 % di miele. Ogni valore riportato è il risultato di 12 replicazioni. Le barre verticali indicano l'errore standard. Le concentrazioni di p.a. (mg/litro) sono state trasformate in log₁₀

Le api hanno dato, tuttavia, risultati differenti a seconda del principio attivo utilizzato.

Con il clothianidin e il thiamethoxam, i sintomi di inarcamento dell'addome e di paralisi delle ali si sono verificati entro un'ora dalla somministrazione a concentrazioni di 1.5 mg/litro ($\log_{10} = 0,18$), mentre con l'imidacloprid sono servite concentrazioni di 6.25 mg/litro ($\log_{10} = 0,8$) per causare, entro il medesimo arco di tempo, gli stessi sintomi Tab. 5.

Aumentando la concentrazione del p.a. dei tre neonicotinoidi, l'intervallo di tempo tra l'inarcamento dell'addome e la paralisi delle ali tendeva a diminuire fino ad annullarsi a concentrazioni di 100mg/litro ($\log_{10} = 2$) Tab.5.

Utilizzando dosi più basse rispetto a quelle riportate in Tab.5 si notava che gli effetti erano nulli o nel caso si fossero manifestati, apparivano dopo un ora dalla somministrazione e risultavano reversibili.

Inoltre se si nutrivano le api con miele queste, riuscivano a vivere. I risultati sono conformi agli esperimenti di Yang et al. 2003, del Dipartimento di Entomologia di Taichung a Taiwan effettuati con concentrazioni maggiori o

uguali a 3 mg/litro di imidacloprid disciolti in soluzione zuccherina. Questo dato è considerato il *valore soglia*, oltre il quale le api non sono più in grado di tornare al proprio alveare.

Con la sperimentazione, oggetto delle tesi, si è riscontrato che la paralisi entro un'ora delle ali di tutte le api testate avviene con una concentrazione del p.a. imidacloprid, prossima ai 6 mg/litro.

Non si è riscontrata, invece, una chiara relazione tra l'effettivo consumo di soluzione e la manifestazione dei sintomi da intossicazione. Presumibilmente ciò è da imputare alla grande variabilità di risposta degli insetti e al loro frequente rigurgitamento, aspetti che possono avere influenzato l'azione del p.a.

Non è stata notata alcuna forma di repellenza al consumo, né un impedimento per le api ad assumere la soluzione che possa aver influenzato gli esperimenti.

A fronte delle soluzioni sia preparate in laboratorio con p.a. puro sia provenienti dalle guttazioni delle piantine e a concentrazioni uguali, gli effetti sono stati i medesimi.

In particolare per l'imidacloprid la tab. 6 mostra come il sintomo di paralisi delle ali si sia manifestato seguendo abbastanza fedelmente la curva, ottenuta da prove nelle quali alle api si somministravano soluzioni a concentrazione nota di successive diluizione seriali del p.a. puro.

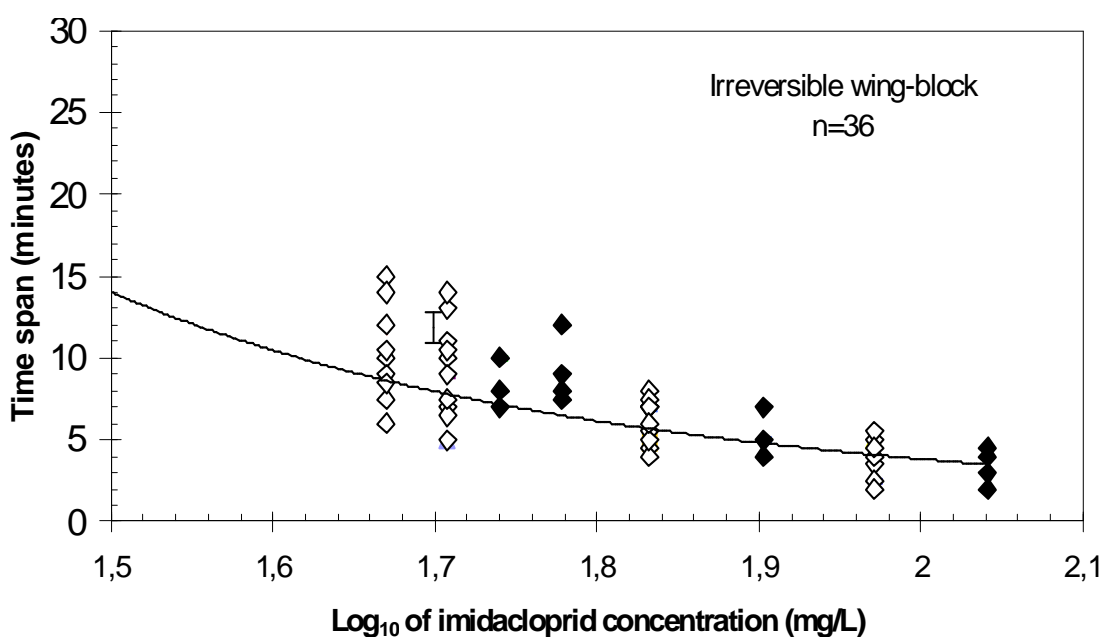


Tabella 6 - Il grafico mostra l'intervallo di tempo tra la manifestazione del blocco irreversibile delle ali di api poste singolarmente in gabbia e l'ingestione delle gocce di guttazione ottenute dalle pianticelle coltivate in vaso. Le gocce sono state raccolte da piante ottenute da semi concitati con l'imidacloprid e raccolte dalla loro germinazione per un periodo di 20 giorni. La concentrazione di p.a. è stata determinata con le analisi HPLC. Il seguente grafico riporta la curva di concentrazione di diluizioni note dell'imidacloprid a dosi più elevate rispetto a quelle presenti nel grafico fig. 5(A). I rombi neri rappresentano le gocce di guttazione, mentre quelli bianchi le gocce di guttazione con aggiunto il 15% di miele.

La tossicità delle gocce di guttazione, pertanto, sembra essere comprovata dal loro contenuto in p.a.

Non sono stati osservati effetti sinergici tra i p.a. dei neonicotinoidi e le altre sostanze disciolte nelle gocce di guttazione.

Nelle colture maidicole la presenza di gocce di guttazione è osservabile per tre settimane dal momento in cui emergono le piantine.

Nell'Italia settentrionale questa fase si verifica, generalmente, tra la seconda settimana di aprile e metà maggio. Durante questo periodo le api si approvvigionano di acqua da diverse fonti, come pozzanghere, fossi e altro; è possibile, quindi, che in loro mancanza l'unica risorsa disponibile siano le gocce di guttazione.

In questa stagione iniziano anche a sbocciare i fiori che forniscono acqua e nettare, ma a causa delle notevoli estensioni di monoculture le api, non riescano

a soddisfare completamente i propri bisogni sono costrette ad utilizzare frequentemente l'acqua delle gocce di guttazione.

Da dieci anni, inoltre, sono state introdotte nuove varietà di mais più resistenti al freddo, che hanno consentito di anticipare la semina a metà marzo, quando è ancora limitata la fioritura delle piante costringendo di fatto le api ad approvvigionarsi prevalentemente sulle pianticelle di mais.

Non è stato ancora possibile quantificare la portata del fenomeno relativo alle api che si abbeverano con le gocce di guttazione delle piantine di mais; di conseguenza non è possibile stabilire una relazione tra il fenomeno di guttazione e il CCD.

In ogni caso laddove esistono ampie estensioni di seminativi a mais e fonti d'acqua avvelenate da neonicotinoidi, si è venuto a creare un ambiente inospitale e dannoso per questi insetti.



BIBLIOGRAFIA

ANDERSON D., EAST I.J., - 2008 - The latest buzz about colony collapse disorder. *Science* 319, 724-725

BONMATIN J. M., MARCHAND P.A., CHARVET R., MOINEAU I., - 2005 - Quantification of Imidacloprid Uptake in maize Crops *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 5336-5341

BROMILOW R. H., CHAMBERLAIN K., - 1989 - Designing molecules for systemicity in mechanisms and regulation of Transport Process (Atkin R.K. Clifford D.R, Eds), Monograph 18, British Plant Growth Regulator Group.

CHEN C. C., CHEN Y. R., - 2007 - Study on laminar hydathodes of *Ficus formosana* (Moraceae) III. Salt injury of guttation on hydathodes. *Bot. Stud.* 48: 215-226.

CHEN Y., EVANS J. D., SMITH I. B., PETTIS S. J. - 2008 - *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology* Vol. 97 186-188

COLACCI A., - 2008 - Neonicotinoidi, un esempio paradigmatico di valutazione del rischio ambientale e sanitario ARPA Rivista N. 4 luglio-agosto Arpa Emilia-Romagna

CONTESSI A., - 2007 - Le Api *Biologia, Allevamento, Prodotti Edagricole* Bologna

COX F., Imidacloprid and environment Squadra scientifica "Norhwest coalition for alternatives to pesticides"/ NCAP Traduzione di F. B. Zotti.

CURTIS C. L., - 1944 - The exudation of glutamine from lawn grass *Plant physiology* Vol. 19

VAN ENGELSDORP D., HAYES J., UNDERWOOD R. M., PETTIS J., - 2008 - A Survey of Honeybees Colony Losses in the U.S, Fall 2007 to Spring 2008. *PLoS ONE* 3(12): e4071. doi:10.1371/journal.pone.0004071

GIROLAMI V., MAZZON L., SQUARTINI A., MORI N., MARZARO M., DI BERNARDO A., GREATTI M., GIORIO C., AND TAPPARO A., - 2009 - Translocation of Neonicotinoid Insecticides From Coated Seeds to Seedling Guttation Drops: A Novel Way of Intoxication for Bees J. Econ. Entomol. 102(5): 1808 - 1815

GOATLEY J. L., LEWIS R. W., - 1966 - Composition of guttation fluid from rye, wheat, and barley seedlings. Plant Physiol. 41: 373 - 375.

HERNÁNDEZ R. M., MEANA A., PRIETO L., SALVADOR A. M., BAILÒN-GARRIDO E., HIGES M., - 2007 – Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. Applied and Environmental Microbiology, p. 6331-6338, Vol. 73, No. 20

HIGES M., MARTIN-HERNANDEZ R., BOTIAS C., BAILÒN E. G., AMELIA V. PORTO G., BARRIOS L., BERNAL J. L., JUAN J., PALENCIA P. G. and MEANA A., - 2008 -
“How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse”
Environmental Microbiology

JOHANSEN C.A., - 1978 – Honeybees poisoning by chemicals: signs contributing factors, current problems and prevention. Pullman

KEVAN G. P., GUZMAN E., SKINNER A., VAN ENGLESDORP D., - 2007 - Colony Collapse Disorder (CCD) in Canada: Do we have a problem? Canadian Honey Council magazine, Hivelights 20(2): 15-18

KÜHNHOLZ S., SEELEY T. D., - 1997 - The control of water collection in honey bee colonies.
Behav. Ecol. Sociobiol. 41: 407 - 422.

MAINI S., - 2008 - Impatto dei neonicotinoidi in agricoltura, quali alternative? Dipartimento di Scienze tecnologie agroambientali Facoltà di Agraria Università di Bologna ARPA Rivista N. 4 luglio-agosto

MARGARET S., - 2009 - “Solution to Colony Collapse Disorder” Cosmos Cluster 7

MAUS C., CURE G., SCHMUCK R., - 2003 - Safety of imidacloprid seed dressings to honey bees: a comprehensive overview and compilation of the current state of knowledge.
Bull. Insectol. 56: 51 - 57.

MEDDRZYCKI P., MONTANARI R., BORTOLOTTI L., SABATINI A.G., MAINI S., PORRINI C., - 2003 - Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bees' behaviour Laboratory tests, in Proceedings of the 8th international Symposium " hazard of pesticides to bees", September 4-6, 2002 Bologna, Italy Bulletin of Insectology, 56 (1): 59-62

MENNELLA G.F.F., - 1998 - Valutazione della durata della fase percolate del ciclo biologico di operaie in *Apis Mellifera logistica* in diverse famiglie e in naturali condizioni di allevamento. Tesi di dottorato. Università di Napoli " Federeico II"

PAXTON R. J., KLEE J., KORPELA S., FRIES I., - 2007 -
Nosema cerane has infested *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. Apidologie 38 (2007) 559-565

PETTIS J., VANENGELSDORP D., COX-FOSTER D., - 2007 -
Colony Collapse Disorder workin Group Pathogen sub-group progress report

RAFFAELE C., - 2008 - Atti del workshop Sindrome dello spopolamento degli alveari
Apat (Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici)

RANCAN M., ROSSI S., SABATINI A. G., - 2006- Determination of thiamethoxam residues in honeybees by high performance liquid chromatography with an electrochemical detector and post-column photochemical reactor. J. Chromatogr. A 1123: 60 - 65.

RENEE JOHNSON., - 2008 - CRS Report for congress "Recent honey bee colony declines"
Analyst in Agricultural Economics Resouces, Science and Industry Division

SCHMUCK R., NAUNEN R., KINTSCHER-EBBINGHAUS U., - 2003 -
Effects of imidacloprid and common plant metabolites of imidacloprid in the honeybee: toxicological and biochemical considerations.

SHAWKI, M.A.,-A., TITERA D., KAZDA J., KOHOUTKOVA J., TABORSKY V., -2005- Toxicity to honeybees of water guttation and dew collected from winter rape treated with Nurelle D® registered. Plant Prot. Sci. 42: 9-14.
SINGH S. B., FOSTER G. D., KHAN S. U., - 2004 - Microwaveassisted extraction for the simultaneous determination of thiamethoxam, imidacloprid, and carbendazim residues in fresh and cooked vegetable samples. J. Agric. Food Chem. 52: 105 - 109.

SUCHAIL S., DEBRAUWER L., BELZUNCES L.P., Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera* Pest Management Science, Volume 60, Number 3, March 2004 , pp. 291-296(6)

SUR R., STORK A., - 2003 - Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants.
Bulletin of Insectology 56 (1): 35-40

VIOLA P., - 1997 - I composti fenolici. Scientific nutrition 6: 5-8.

VISSCHER P. K., CRAILSHEIM K., SHERMAN G., - 1996 - How do honey bees (*Apis mellifera*) fuel their water foraging flights? J. Insect Physiol. 42: 1089 - 1094.

YANG E. C., CHUANG Y. C., CHEN Y. L., CHANG L. H., - 2008 - Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae).
J. Econ. Entomol. 101: 1743 - 1748

YING G. G., KOOKANA R. S., - 2004 - Simultaneous determination of imidacloprid, thiacloprid and thiamethoxam in soil and water by high performance liquid chromatography with diode-array detection. J. Environ. Sci. Health B 39: 737 - 746.

ZHOU Q., DING Y., XIAO J., - 2006 - Sensitive determination of thiamethoxam, imidacloprid and acetamiprid in environmental water samples with solid-phase extraction packed with multiwalled carbon nanotubes prior to highperformance liquid chromatography.
Anal. Bioanal. Chem. 385: 1520 - 1525