



Studio della variabilità del locus SDL e l'attribuzione di tipo genetico nelle api

Risultati del Progetto BEENOMIX 2.0

Prof.ssa Giuletta Minozzi
Università degli Studi di Milano
Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali
Via dell'Università 6, 26900 Lodi, Italia
Email: giuletta.minozzi@unimi.it



PSR
2014-2020
LOMBARDIA
L'INIZIATIVA
RETTE RURALI



Regione
Lombardia

Fondo Europeo Agricolo per lo Sviluppo Rurale: l'Europa investe nelle zone rurali

Programma di Sviluppo Rurale 2014 - 2020

Fondo Europeo Agricolo per lo Sviluppo Rurale: l'Europa investe nelle zone rurali

Iniziativa realizzata con il cofinanziamento del FEASR nell'ambito dell'Operazione 16.2

[Clicca qui per il Sito della Commissione dedicato al FEASR](#)



L'ape è un insetto **sociale**.

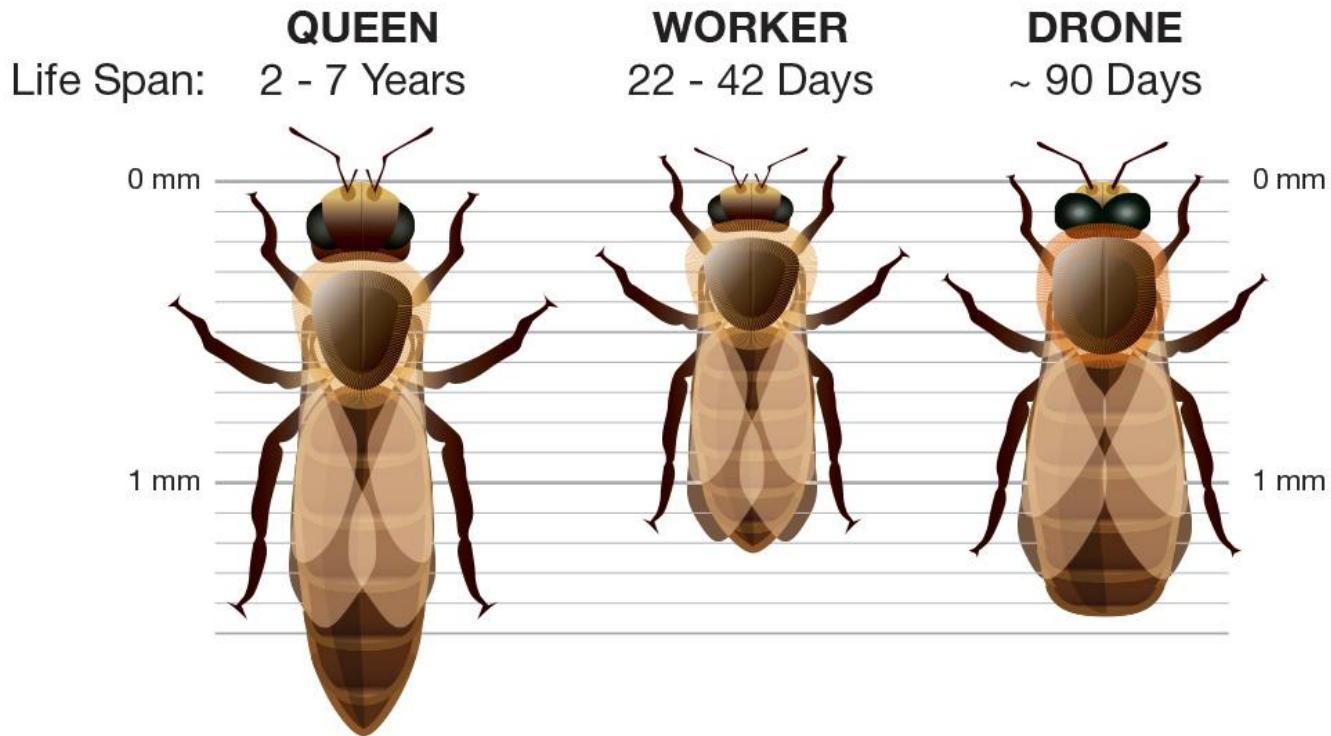
Vivono in colonie in cui risiede una femmina riproduttrice (l'ape regina) e la sua prole.

Ogni alveare ha 50.000 o più api all'inizio dell'estate.

Ogni ape ha un ruolo definito.

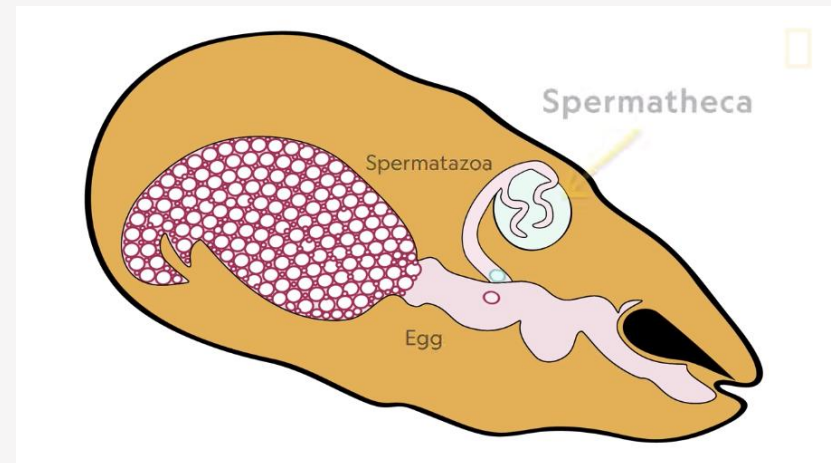
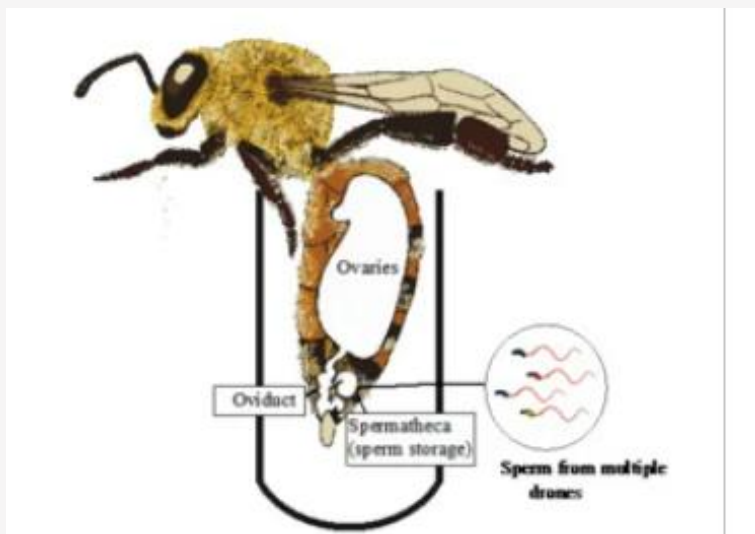


Tre classi – GENETICA



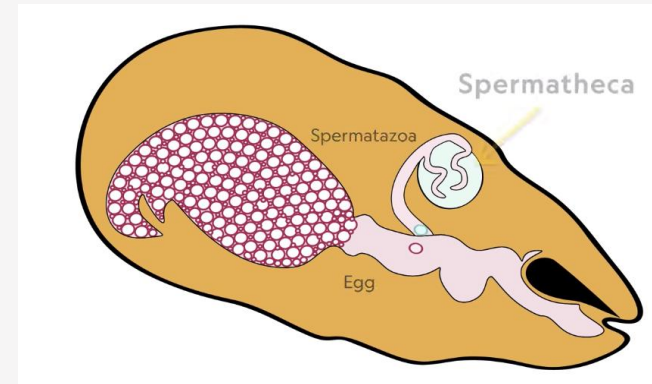
L'ape regina

Le api regine hanno un compartimento specializzato detta “spermateca” dove conservano il materiale seminale possono o meno fertilizzare ogni uovo mentre viene deposto.



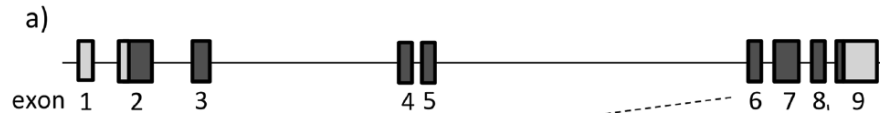
Genetica

- I maschi si sviluppano da uova non fecondate e quindi sono (**aploidi**)
- Le femmine si sviluppano da uova fecondate e quindi sono (**diploidi**).



“Aplodiploidia”

Gene csd



```

CU4T2  LSNKTIHNNNNYKYNY-NNNNNNHYNNNY----KKLQYYN--IINIEQIPVPVPVPIYCG
AU2T1  LSNKTIHNNNNYKYNYNNNNYNNNNYN-----KKL-YYKNYIINIEQIPVPVPV--YYG
DU4T1  LSNKTIHNNNNYKYNYNNNNYNNNNYNNNNYNNNCKKL-YYN--INIEQIPIVPVPV--YYG
FU24T2 LSNNTIH-NNNYKYN-----NYNNYN-----KKL-YYN--IINIEQIPVPVPV--YCG
  
```

Scientific Reports | 7: 2317 | DOI:10.1038/s41598-017-02329-9

La determinazione del sesso in *Apis mellifera* è regolata dal gene *csd*

Il gene *csd* è costituito da 9 esoni, di cui gli esoni da 6 a 8 codificano per il dominio di specificazione del potenziale (*csd*-PSD) che è composto da una regione ipervariabile (HVR) basata su ripetizioni e SNP che insieme definiscono l'allele *csd*.

Csd Alleli (maschi/femmine)

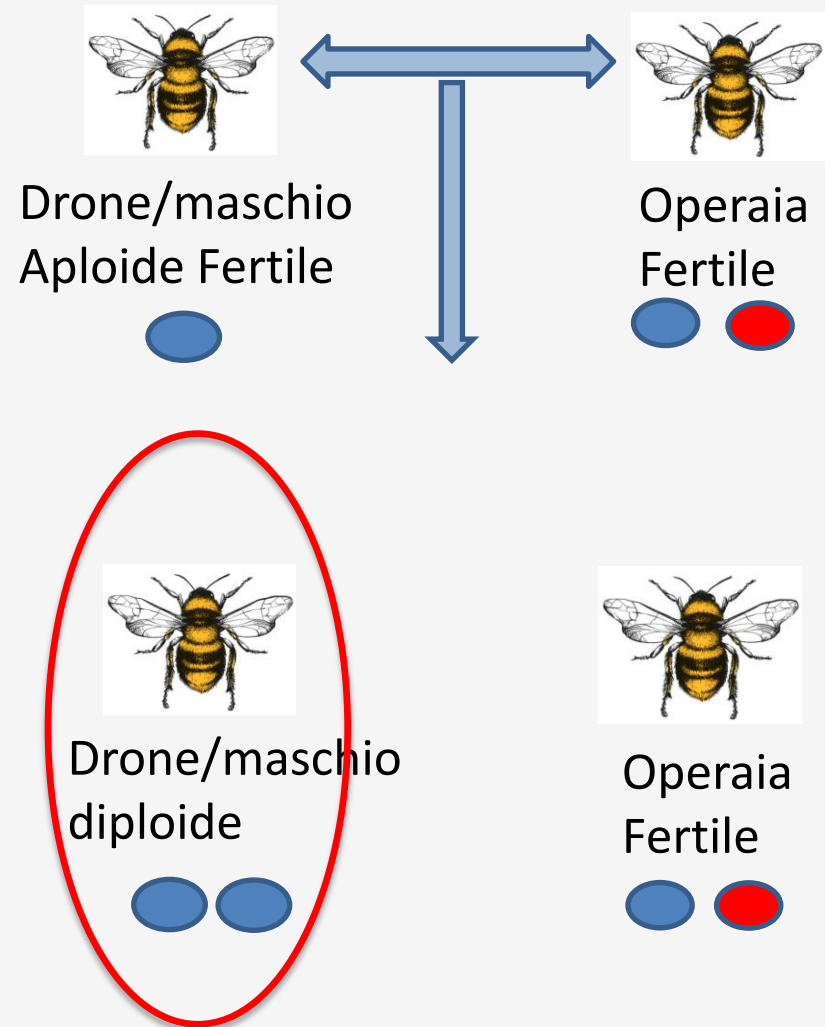
Le api diploidi vitali hanno due alleli diversi e sono femmine fertili.

Le api con un allele sono aploidi e maschi.

Quando sono presenti due alleli identici a *csd*, i diploidi dovrebbero svilupparsi in femmine, ma poiché hanno un solo allele di *csd*, si sviluppano nei maschi.

I droni diploidi vengono uccisi.

La variabilità allelica in questo locus è essenziale per prevenire le perdite e per le strategie di conservazione.

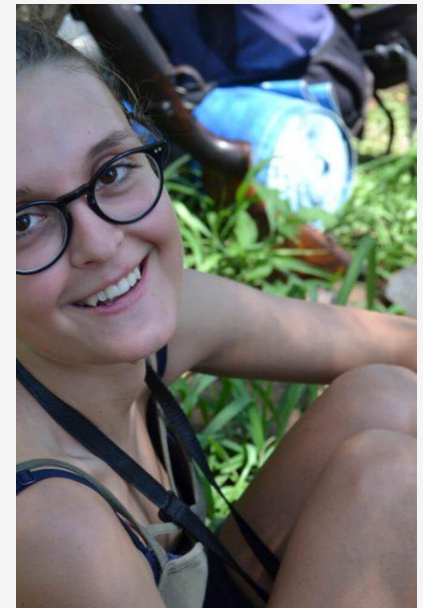




SCOPO del lavoro

Mettere a punto il protocollo per le analisi degli alleli del locus CSD e analizzarne la variabilità nelle api del Progetto BEENOMIX

- Diversi kit estrazione
- 3 primer set
- 3 parti anatomiche per l'estrazione :
torace, gambe , ali
- Due tipi di conservazione
(Etanolo e ghiaccio secco)





Risultati – 2 tecniche e (aploidi e diploidi)

allele	sequences	frequenza	Amelcsd-HVR ID
Allele 57	SSLSNKTIHNNNNYKLYNINIEQI	7,98%	Amelcsd-HVR111
Allele 20	SSLSNNYNSNNYKYNNSKLYNINIEQI	5,85%	Amelcsd-HVR213
Allele 9	SSLSNKTIHNNNNYKYNNSKLYNINIEQI	5,85%	Amelcsd-HVR70
Allele 26	SSLSNKTIHNNNNYKYNNSKLYNINIEQI	4,79%	Amelcsd-HVR107
Allele 33	SSLSNKTIHNNNNYKYNNSKLYNINIEQI	4,79%	Amelcsd-HVR115
Allele 4	SSLSNNTIHNNNNYKYNNSKLYNINIEQI	4,79%	
allele 90	SSLSNNTIHNNNNYKYNNSKLYNINIEQI	3,72%	Amelcsd-HVR28
Allele 16	SSLSNKTIHNNNNYKLYNINIEQI	3,72%	
allele 93	SSLSNNYNSNNNNNNYKQLCYNINIEQI	3,19%	Amelcsd-HVR42
Allele 59	SSLSNNTIHNNNNYKYNNSKLYNINIEQI	3,19%	Amelcsd-HVR31
Allele 95	SSLSNNYKYSNNNNNNNNYKLYNINIEQI	2,66%	Amelcsd-HVR166
Allele 21	SSLSNKTIHNNNNYKLYNINIEQI	2,66%	Amelcsd-HVR134
Allele 23	SSLSNHYNNNNNYKLYNINIEQI	2,66%	Amelcsd-HVR51
Allele 54	SSLSNKTIHNNNNYKYNNSKLYNINIEQI	2,66%	Amelcsd-HVR60
Allele 7	SSLSNKTIHNNNNYKYNNSKLYNINIEQI	2,66%	Amelcsd-HVR99
Allele 19	SSLSNNYKYSNNNNNNNNYKLYNINIEQI	2,13%	Amelcsd-HVR39
Allele 109	SSNNYNSNNNNNNNNYKLYNINIEQI	1,60%	-
Allele 98	SSLSNKTIHNNNNYKYNNSKLYNINIEQI	1,60%	Amelcsd-HVR114
Allele 2	SSLSNNYNSNNNNYKLYNINIEQI	1,60%	Amelcsd-HVR12
Allele 27	SSLSNNYNSNNNNNNNNYKLYNINIEQI	1,60%	Amelcsd-HVR43
Allele 46	SSLSNNYKYSNNNNNNYKLYNINIEQI	1,60%	Amelcsd-HVR21
allele 91	SSLSNKTIHNNNNNNNNNNYKLYNINIEQI	1,06%	Amelcsd-HVR54
Allele 94	SSLSNKTIHNNNNYKYNNSKLYNINIEQI	1,06%	Amelcsd-HVR124
Allele 96	SSLSNKTIHNNNNYKYNNSKLYNINIEQI	1,06%	Amelcsd-HVR86
Allele 97	SSLSNNYNSNNNNNNNNYKLYNINIEQI	1,06%	Amelcsd-HVR34
Allele 11	SSLSNNYNSNNNNNNNNYKLYNINIEQI	1,06%	Amelcsd-HVR38
Allele 13	SSLSNKTIHNNNNYKYNNSKLYNINIEQI	1,06%	Amelcsd-HVR120
Allele 17	SSLSNNTIHNNNNYKLYNINIEQI	1,06%	Amelcsd-HVR19
Allele 22	SSLSNNYKYSNNNNNNNNYKLYNINIEQI	1,06%	Amelcsd-HVR170
Allele 31	SSLSNKTIHNNNNYKYNNSKLYNINIEQI	1,06%	Amelcsd-HVR20
Allele 50	SSLSNKTIHNNNNYKYNNSKLYNINIEQI	1,06%	Amelcsd-HVR23
Allele 66	SSLSNNYNSNNNNNNNNYKLYNINIEQI	1,06%	Amelcsd-HVR195
Allele 8	SSLSNSCNSNNNNYKLYNINIEQI	1,06%	Amelcsd-HVR205

Considerando tutte le 188 di circa sequenze analizzate in totale sono stati trovati **63 diversi alleli**. Di cui **55 già riportate in bibliografia** mentre **8 sono nuove sequenze** (di cui però 4 già pubblicate nell'articolo Paolillo et al. 2022).

In tabella sono riportate le **33** sequenze ritrovate in più di un campione.

L'allele più frequente è il 57 che si dei campioni



Risultati analisi *csd* da WGS della linea Beenomix (diploidi)

allele	sequences	frequenza	Bilodeau
Allele 33	SSLSNKTIHNNNNYKNYNYKKLYYNIINIEQI	16,0%	Amelcsd-HVR115
Allele 20	SSLSNNYSNNYKNYNNNSKKLYYNINIEQI	14,0%	Amelcsd-HVR213
Allele 9	SSLSNKTIHNNNNYKNYNNKYNYNNNNNYKLYYKNYIINIEQI	14,0%	Amelcsd-HVR70
Allele 26	SSLSNKTIHNNNNKYNKYNNNNNNYKLYYNINIEQI	14,0%	Amelcsd-HVR107
allele 93	SSLSNNYSNNNNNNNNYNYKQLCYNINIEQI	10,0%	Amelcsd-HVR42
Allele 95	SSLSNNYKYSNNYNNNNNNYNSKKLYYNIINIEQI	10,0%	Amelcsd-HVR166
Allele 4	SSLSNNTIHNNNNYKNYNNNNYNYKLYYNINIEQI	8,0%	-
Allele 46	SSLSNNYKYSNNYNNNNYKLYYKNYIINIEQI	6,0%	Amelcsd-HVR21
Allele 57	SSLSNKTIHNNNNYKLYYNINIEQI	6,0%	Amelcsd-HVR111
Allele 54	SSLSNKTIHNNNNYKNYNNNNNNNNYNNCKKLYYNIINIEQI	6,0%	Amelcsd-HVR60
Allele 98	SSLSNKTIHNNNNYKNYNNNNNNYKLYYNIINIEQI	6,0%	Amelcsd-HVR114
Allele 7	SSLSNKTIHNNNNYKNYNNNNNNYKLYYQYNNINIEQI	6,0%	Amelcsd-HVR99
Allele 50	SSLSNKTIHNNNNYKNYNNNNNNYKLYYNIINIEQI	4,0%	Amelcsd-HVR23
Allele 16	SSLSNKTIHNNNNYNNNNYKLYYNIINIEQI	4,0%	-
Allele 94	SSLSNKTIHNNNNYKNYNNNNNNYNNYKLYYQYNNINIEQI	4,0%	Amelcsd-HVR124
Allele 11	SSLSNNYISNISNNNNNSKKLYYNINIEQI	4,0%	Amelcsd-HVR38
Allele 96	SSLSNKTIHNNNNYKNYNNNNNNYKLYYNIINIEQI	4,0%	Amelcsd-HVR86
Allele 13	SSLSNKTIHNNNNYKNYNNNNNNYKLYYNIINIEQI	4,0%	Amelcsd-HVR120
Allele 21	SSLSNKTIHNNNNYNNNNYKLYYNIINIEQI	4,0%	Amelcsd-HVR134
Allele 31	SSLSNKTIHNNNNYKNYNNKYNYNNNNNYKLYYKNYIINIEQI	4,0%	Amelcsd-HVR20
Allele 2	SSLSNNYNNYNNNNYKPLYYNINIEQI	4,0%	Amelcsd-HVR12

- In totale sono state ricostruite entrambi gli alleli di **51 operaie**.
- Sono stati trovati 47 diversi alleli di cui 21 condivisi da almeno 2 campioni.
- 42 sequenze erano già riportate in letteratura, 2 sono state già pubblicate in un nostro recente articolo e 3 sono nuovi alleli.



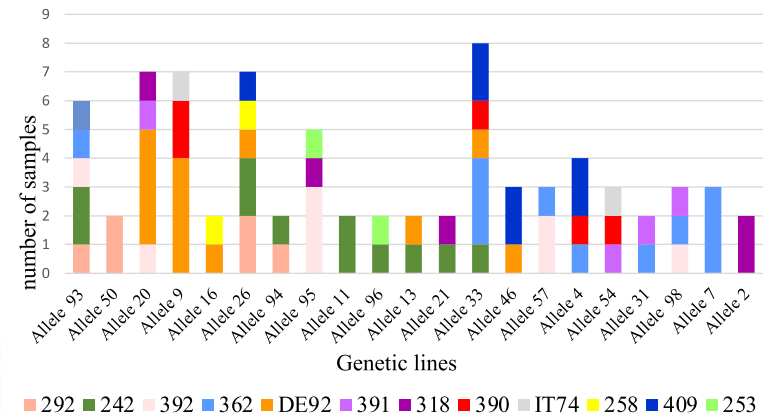
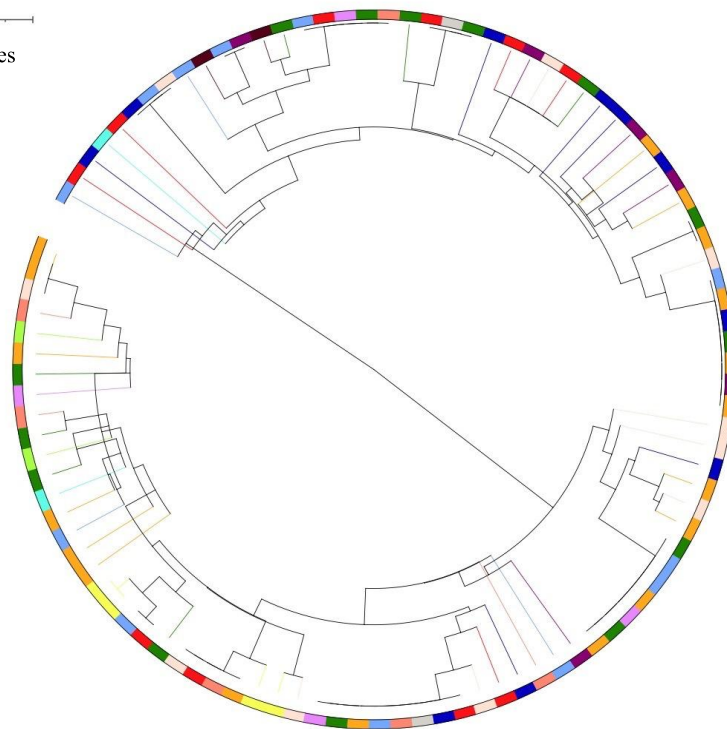
Article
Analysis of Complementary Sex-Determiner (*csd*) Allele Diversity in Different Honeybee Subspecies from Italy Based on NGS Data

Gianluigi Paolillo ^{1,*}, Maria Grazia De Iorio ^{1,†}, Joel E. Soares Filipe ¹, Federica Riva ¹, Alessandra Stella ², Gustavo Gandini ¹, Giulio Pagnacco ^{2,*} and Giulietta Minozzi ^{1,*}

Albero filogenetico e istogramma

Tree scale: 0.1

Genetic lines



L'albero filogenetico e l'istogramma mostrano che gli alleli ricostruiti dal WGS sono equamente distribuiti tra le diverse linee genetiche.



Sanger (linea maschile usando 6 droni per linea)

Linea maschile Beenomix

famiglia	sequenza	allele
fam1	KIISSNYYNYSYNNNNYNNNNYNNYKLYYKNIINIEQI	allele 109
	KIISLNNNTIHNNNNYKYNNNNYNNNNYNNKLYYNIINIEQI	allele 90
fam2	KIISLNNHYNYNNNKYNNNNYNDYKLYYNIINIEQI	allele 23
	KIISLNNKTIHNNNNYKLYYNIINIEQI	allele 57
	KIISLNNNTIHNNNNYKYNNNNYNNNNYNNKLYYNIINIEQI	allele 59
fam3	KIISLNNNTIHNNNNYKYNNNNYNNNNYNNKLYYNIINIEQI	allele 90
	KIISLNNKTIHNNNNYNNNNYNNNNYNNKLYYNIINIEQI	allele 91
fam4	KIISLNNYNYYSYNNNNYNNNNYNNYKLYYNIINIEQI	allele 6
	KIISLNNKTIHNNNNYKYNNNNYNNNNYNNKLYYKNIINIEQI	allele 9
fam5	KIISLNNKTIHNNNNYKLYYNIINIEQI	allele 57
	KIISLNNNTIHNNNNYKYNNNNYNNNNYNNKLYYNIINIEQI	allele 4
fam6	KIISLNNHYNYNNNKYNNNNYNDYKLYYNIINIEQI	allele 23
	KIISLNNNTIHNNNNYKYNNNNYNNNNYNNKLYYNIINIEQI	allele 4
fam7	KIISLNNNTIHNNNNYKYNNNNYNNNNYNNKLYYNIINIEQI	allele 59
	KIISLNNKTIHNNNNYKLYYNIINIEQI	allele 57
fam8	KIISSNYYNYSYNNNNYNNNNYNNYKLYYKNIINIEQI	allele 109
	KIISLNNNTIHNNNNYKYNNNNYNNNNYNNKLYYNIINIEQI	allele 90
fam9	KIISLNNNTIHNNNNYKYNNNNYNNNNYNNKLYYNIINIEQI	allele 90
	KIISLNNHYNYNNNKYNNNNYNDYKLYYNIINIEQI	allele 23
	KIISLNNNTIHNNNNYKYNNNNYNNNNYNNKLYYNIINIEQI	allele 90
fam10	KIISLNNNTIHNNNNYKYNNNNYNNNNYNNKLYYNIINIEQI	allele 4
	KIISLNNNTIHNNNNYKYNNNNYNNNNYNNKLYYNIINIEQI	allele 20
fam11	KIISLNNKTIHNNNNYKLYYNIINIEQI	allele 57
	KIISLNNNTIHNNNNYKYNNNNYNNNNYNNKLYYNIINIEQI	allele 90
	KIISLNNKTIHNNNNYKYNNNNYNNNNYNNKLYYNIINIEQI	allele 8
	KIISLNNKTIHNNNNYKYNNNNYNNNNYNNKLYYNIINIEQI	allele 110
fam12	KIISLNNKTIHNNNNYKLYYNIINIEQI	allele 57
	KIISLNNHYNYNNNKYNNNNYNDYKLYYNIINIEQI	allele 23
fam13	KIISLNNKTIHNNNNYKLYYNIINIEQI	allele 57
	KIISLNNKTIHNNNNYNNNNYNNNNYNNKLYYNIINIEQI	allele 21
fam14	KIISLNNYNYYSYNNNNYNNNNYNNYKLYYNIINIEQI	allele 93
	KIISLNNKTIHNNNNYKLYYNIINIEQI	allele 57
	KIISLNNNTIHNNNNYKYNNNNYNNNNYNNKLYYNIINIEQI	allele 90
	KIISLNNNTIHNNNNYKYNNNNYNNNNYNNKLYYNIINIEQI	allele 90

- alta variabilità allelica
- 33 sequenze trovate in 14 DPQ, tra queste sono stati identificati **14 diversi alleli circolanti**
- I due alleli più frequenti sono il 90 e il 57 (21%)

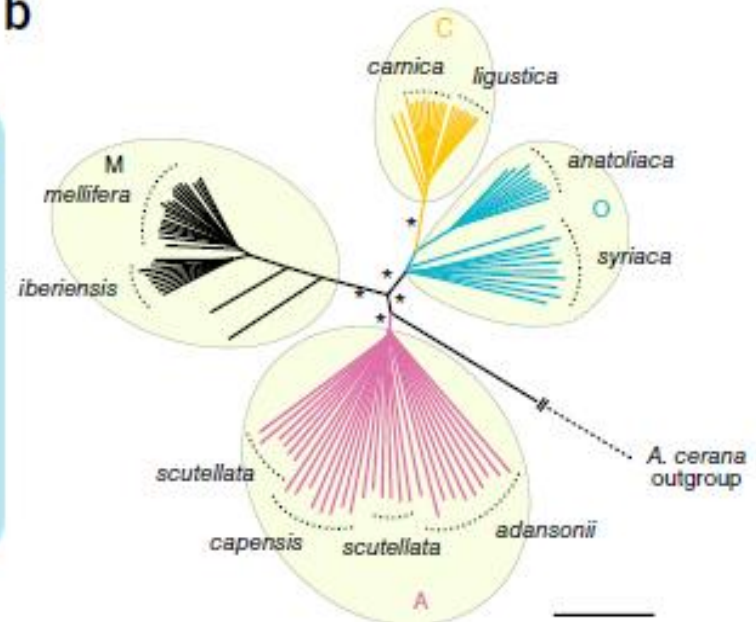


STUDIO DIVESTITA' GENETICA INTERNAZIONALE

a



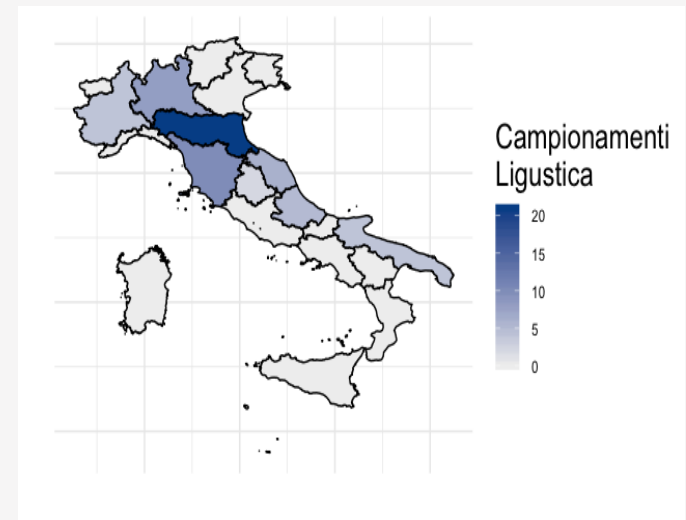
b





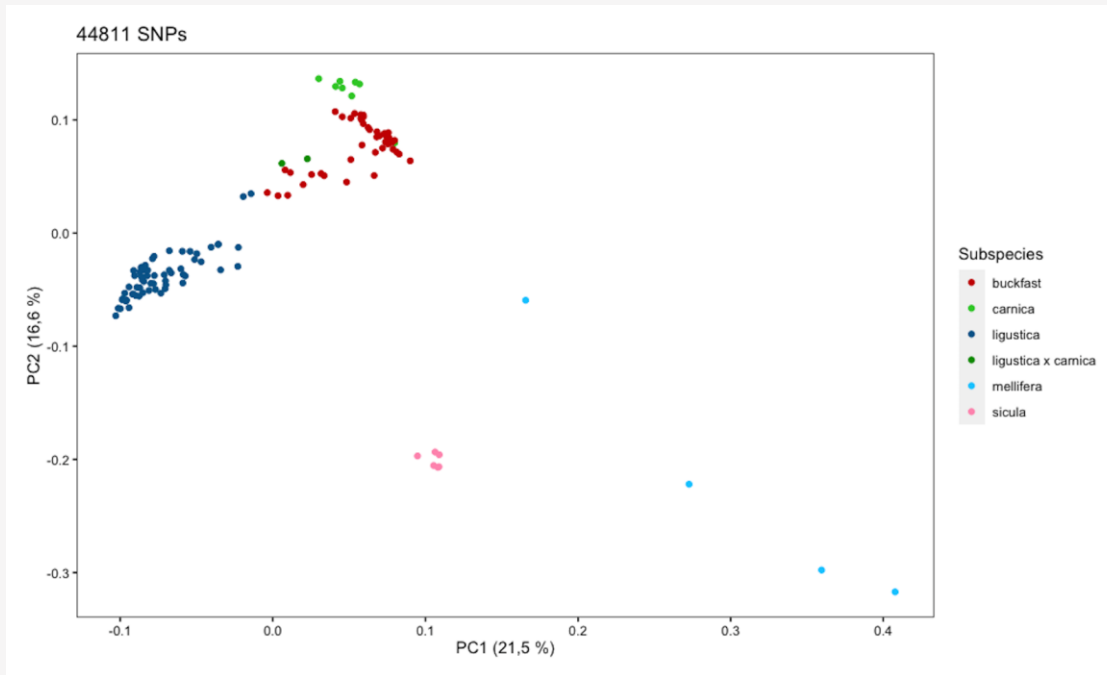
BEENOMIX 1.0

- 125 campioni
- 7 linee genetiche
- Analisi genoma completo 30X coverage





GENETICA – ATTRIBUZIONE TIPO GENETICO



animals



Article

Whole-Genome Sequence Analysis of Italian Honeybees (*Apis mellifera*)

Giulietta Minozzi ^{1,*}, Barbara Lazzari ^{2,†}, Maria Grazia De Iorio ¹, Cecilia Costa ³, Emanuele Carpana ³, Paola Crepaldi ⁴, Rita Rizzi ¹, Elena Facchini ⁵, Gustavo Gandini ¹, Alessandra Stella ² and Giulio Pagnacco ²



SCOPO – BEENOMIX 2.0

- Passare da analisi di milioni di marcatori a 44.000 Marcatori che riescono a distinguere i tipi genetici
- Validato su campioni diversi tipi genetici
- Caratterizzato Linea BEENOMIX 2.0
- Validato su CHIP Commerciali



PSR
2014-2020
LOMBARDIA
L'INIZIATIVA
RUSTICA



Regione
Lombardia

Fondo Europeo Agricolo per lo Sviluppo Rurale: l'Europa investe nelle zone rurali

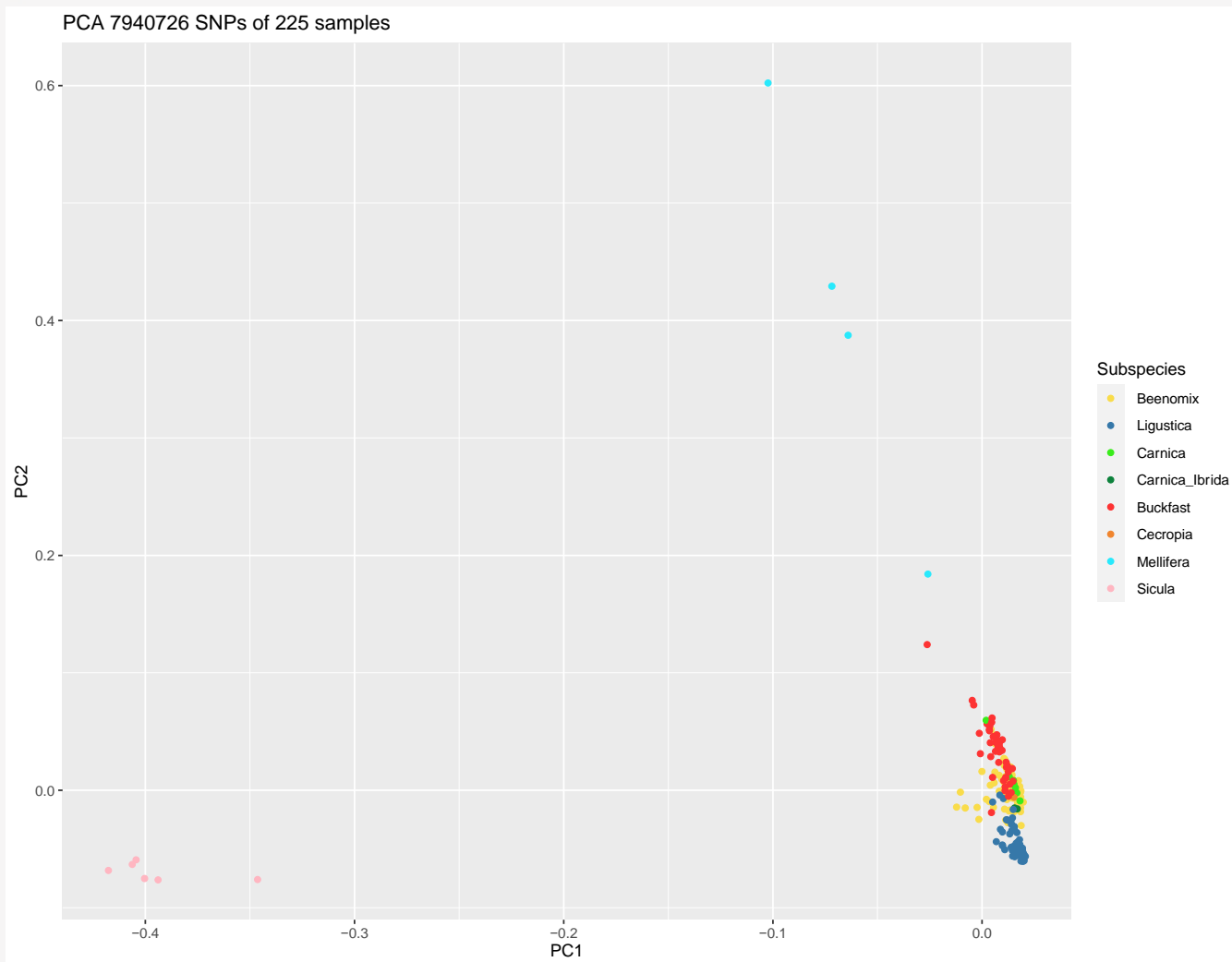
Fondo Europeo Agricolo per lo Sviluppo Rurale: l'Europa investe nelle zone rurali
Iniziativa realizzata con il finanziamento del FEASR nell'ambito dell'Operazione 16.2

Programma di Sviluppo Rurale 2014 - 2020

Clicca qui per il Sito della Commissione dedicato al FEASR



RISULTATI





[CHI SIAMO](#)

[IL PROGETTO](#)

[OBIETTIVI](#)

[NEWS](#)

[VIDEO](#)

[BEENOMIX 1.0](#)



Benvenuti nel sito web del Progetto

Beenomix 2.0





Grazie

UNIMI

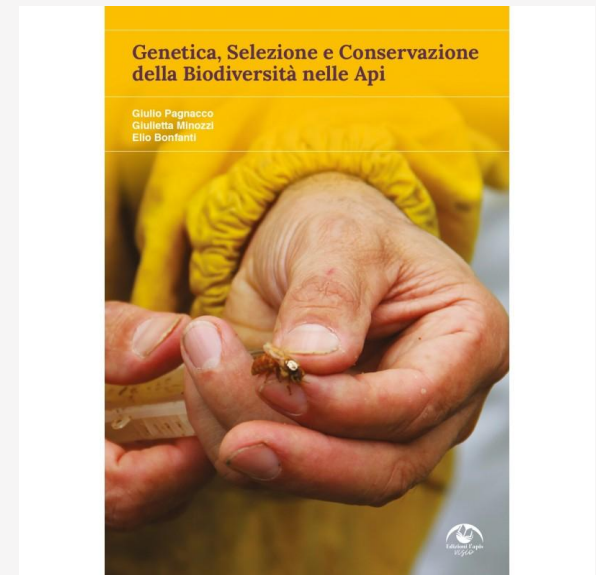
Gustavo Gandini
Maria Grazia De Iorio
Gianluigi Paolillo
Rita Rizzi

CNR

Giulio Pagnacco
Barbara Lazzari
Stefano Biffani
Alessandra Stella

MELYOS

Elio Bonfanti
Cristiano Arienti



Questo progetto è stato finanziato dai progetti BEENOMIX e BEENOMIX 2.0 finanziati dalla Regione Lombardia (programma FEASR), PSR 2014-2020 (grant number 2016/00361532-G42F16000540002) e PSR (grant number 201801057971 – G44I19001910002)



PSR LOMBARDIA
L'INNOVAZIONE
METTERE RAGIONE
2014 2020



Regione
Lombardia

Fondo Europeo Agricolo per lo Sviluppo Rurale: l'Europa investe nelle zone rurali

Fondo Europeo Agricolo per lo Sviluppo Rurale: l'Europa investe nelle zone rurali

Iniziativa realizzata con il cofinanziamento del FEASR nell'ambito dell'Operazione 16.2

Programma di Sviluppo Rurale 2014 - 2020

[Clicca qui per il Sito della Commissione dedicato al FEASR](#)