Honey bees increase social distancing when facing the ectoparasite *Varroa destructor*

Michelina Pusceddu Alessandro Cini Simona Alberti Emanuele Salaris Panagiotis Theodorou Ignazio Floris Alberto Satta
Science Advances • 29 Oct 2021 • Vol 7, Issue 44 • DOI: 10.1126/sciadv.abj1398

Finanziamento: Questa ricerca è stata finanziata dall'Università di Sassari, Italia (FAR2020FLORIS e FAR2020SATTA).

Le api da miele aumentano il distanziamento sociale quando affrontano l'ectoparassita *Varroa destructor*

Riassunto

Il distanziamento sociale in risposta alle malattie infettive è una strategia esibita da animali umani e non umani per contrastare la diffusione di agenti patogeni e/o parassiti. Le colonie di *api mellifere* (*Apis mellifera*) sono modelli ideali per studiare questo comportamento a causa della struttura compartimentata di queste società, evolute sotto l'esposizione alla pressione dei parassiti e la necessità di garantire un funzionamento efficiente. Qui, utilizzando una combinazione di approcci spaziali e comportamentali, abbiamo studiato se la presenza dell'acaro ectoparassita *Varroa destructor* induce cambiamenti nell'organizzazione sociale di *A. mellifera* colonie che potrebbero ridurre la diffusione del parassita. **I nostri risultati hanno dimostrato che le api reagiscono all'intrusione di *V. destructor* modificando l'uso dello spazio e le interazioni sociali per aumentare il distanziamento sociale tra coorti di api giovani (infermiere) e anziane (raccoglitrici)**. Questi risultati suggeriscono fortemente una strategia comportamentale non precedentemente riportata nelle api da miele per limitare la trasmissione del parassita intracolonia.

INTRODUZIONE

Gli insetti sociali sono particolarmente vulnerabili a patogeni e parassiti a causa della fitta rete di contatti tra compagni di nido altamente imparentati e delle grandi quantità di cibo immagazzinate in un nido in condizioni ambientali relativamente stabili (*1*). Per contrastare la pressione della malattia, gli insetti sociali hanno sviluppato, oltre alle risposte immunitarie individuali, molte forme di immunità sociale, cioè strategie basate sulla cooperazione dei singoli membri del gruppo (*2*). Questi ultimi si verificano a livello comportamentale, fisiologico e organizzativo e possono agire sinergicamente per evitare l'invasione, l'insediamento e la replicazione di agenti patogeni o parassiti all'interno della colonia (*2* , *3*).

Un aspetto di particolare importanza è l'organizzazione della colonia, cioè il modello delle interazioni sociali tra i membri della colonia nello spazio e nel tempo. Mentre l'ottimizzazione ergonomica seleziona società dense e interconnesse (*4*), la pressione di patogeni e/o parassiti è un fattore cruciale che guida **l'organizzazione delle colonie di insetti (*1*) che favorisce i meccanismi che limitano le interazioni tra gli individui per ridurre il rischio di diffusione della malattia** (*5* – *7*). Pertanto, si può prevedere che il tasso di contatti tra compagne di nido sarebbe limitato da compartimentalizzazione spaziale e comportamentale delle diverse coorti di individui, a seconda dell'età, ruolo (casta), e l'attività (task) (*6* - *8*). Tale "immunità organizzativa costitutiva" si verifica anche in assenza di malattia, agendo così come difesa immunitaria profilattica (*2* , *6* , *8*). Una chiara dimostrazione di questo modello teorico negli insetti sociali è stata data da Stroeymeyt *et al.* (*9*).

Essendo minacciate da dozzine di parassiti e malattie (*10*), le colonie di api da miele potrebbero beneficiare di un'immunità organizzativa costitutiva. Analisi spaziali e di social network ad alta risoluzione hanno dimostrato che **le colonie di api mellifere sono organizzate in due compartimenti principali: quello esterno occupato dalle bottinatrici (vecchie api) ammassate insieme vicino all'ingresso dell'alveare, e il compartimento più interno abitato dalle giovani api con la regina, che trascorrono la maggior parte del tempo nelle celle di covata (*11*). Questa segregazione spaziale all'interno della colonia porta a una minore frequenza di interazioni tra i due compartimenti rispetto all'interno di ciascun compartimento e consente agli individui più preziosi, cioè regina, api giovani e covata, di essere protetti dall'ambiente esterno e quindi dall'arrivo di malattie (*5* , *11*).**

Questo tipo costitutivo di difesa immunitaria potrebbe essere arricchito da strategie reattive, ovvero la modifica delle reti sociali della colonia e dell'uso dello spazio all'interno del nido quando sfidato da un parassita o da un patogeno (immunità organizzativa indotta), con l'obiettivo di ridurre ulteriormente il rischio di diffondere una malattia (*8* , *12*). Questa ipotesi è stata recentemente confermata nella formica *Lasius niger* infettata dal patogeno fungino *Metarhizium brunneum* , che ha indotto cambiamenti comportamentali non solo tra i raccoglitori esposti al patogeno ma anche tra i loro compagni di nido, riducendo così il rischio di contaminazione individuale (*9*). Allo stesso modo, **le colonie di api da miele infettate con un'inoculazione sperimentale del virus israeliano della paralisi acuta hanno ridotto i contatti sociali tra i membri della colonia, suggerendo una risposta immunitaria sociale adattativa da parte degli ospiti per ridurre la trasmissione del patogeno (*13*).**

Questi studi hanno dimostrato l'immunità organizzativa indotta in risposta alle malattie microbiche, ma mancano ancora prove di una risposta immunitaria sociale così reattiva quando le colonie di insetti sociali sono sfidate da ectoparassiti di artropodi, come gli acari. I nidi di insetti sociali ospitano un'ampia varietà di acari (*14*),

alcuni dei quali possono avere un impatto sostanziale sull'idoneità della colonia (15 – 19 **).** **La *varroa destructor*** è tra le minacce più gravi per le api da miele in tutto il mondo (17 , 19) e ha svolto un ruolo fondamentale nel declino delle colonie di api mellifere in tutto l'emisfero settentrionale negli ultimi decenni (20 , 21). **Questo acaro provoca una serie di effetti dannosi sulle api a livello individuale e di colonia (22 , 23), inclusa la trasmissione di virus delle api (24). L'intrusione del parassita all'interno di colonie non infestate avviene normalmente tramite bottinatrici della stessa colonia, che possono incontrare il parassita sui fiori (25), ma anche tramite bottinatrici di colonie estranee a causa di fenomeni di deriva o di saccheggio** (26). Per riprodursi, l'acaro fondatore deve entrare in una cella di covata con una larva d'ape matura (17 , 19). Al termine dello stadio di pupa dell'ape mellifera, l'acaro madre e la sua progenie usciranno dalla cellula con l'ape emergente (17). Successivamente, la dispersione del parassita all'interno dell'alveare avviene parassitando principalmente le api nutrici (fase foretica) (27).

In questo lavoro, abbiamo studiato se la presenza dell'acaro ectoparassita *V. destructor* nelle colonie di api mellifere induce cambiamenti nelle strategie di immunità sociale che potrebbero ridurre la diffusione del parassita. Ci siamo concentrati sull'uso dello spazio e sui modelli di interazione sociale, che sono due caratteristiche che influenzano l'immunità organizzativa (11). **Il nostro studio è stato condotto a due livelli: osservazione di intere colonie sottoposte a infestazioni naturali da *V. destructor* in ambienti di campo per osservare cambiamenti su larga scala in specifiche strategie di difesa immunitaria e osservazione ad alta risoluzione del comportamento individuale in piccoli gruppi di api in gabbia infestate sperimentalmente da *V. distruttore*in laboratorio, per valutare i cambiamenti su larga scala nel comportamento sociale dovuti all'infestazione di *Varroa* . Questi due livelli hanno permesso di testare previsioni specifiche derivanti dalla teoria dell'immunità sociale** (2).

Nell'esperimento intera colonia, abbiamo fatto osservazioni comportamentali comparative sulla *Varroa* -infested e *Varroa* -free colonie, collocati in alveari di osservazione. Il diverso livello di infestazione nei due gruppi sperimentali è stato ottenuto applicando diversi trattamenti acaricidi ad alveari selezionati casualmente. **Abbiamo monitorato due tipi di comportamento fortemente coinvolti nella dispersione del parassita (5): le danze del foraggiamento e l'allogrooming**. Una volta all'interno dell'alveare, i raccoglitori possono eseguire danze del foraggiamento (rotonde e ondeggianti) per comunicare l'esatta posizione di una fonte di cibo ad altri raccoglitori (seguaci della danza) (28). I raccoglitori preferiscono ballare sui favi vicino al centro dell'alveare riuniti nelle aree della metà inferiore più vicine all'ingresso (29). **Poiché i raccoglitori rappresentano una via di ingresso rilevante di *V. destructor* nella colonia, sarebbe vantaggioso limitare i contatti sociali tra raccoglitori e altri membri della colonia quando l'acaro è presente. Pertanto, una previsione sarebbe che, sotto la pressione dei parassiti, i raccoglitori**

cambierebbero il loro uso dello spazio, spostando spazialmente le loro danze verso la periferia della colonia (previsione 1).

L'allogrooming è un comportamento sociale mediante il quale un'ape rimuove particelle estranee e parassiti da un'altra ape (*30* , *31*). *L'Apis mellifera* è in grado di rimuovere e uccidere la *Varroa* attraverso l'attività di allogrooming, anche se meno efficacemente *dell'Apis cerana* (*32*). In genere, questo comportamento sporadico è esibito dalle api giovani, in un'età compresa tra i 6 e gli 11 giorni (*33*), quando agiscono principalmente come api nutrici (*34*). Sotto un *V. destructor*infestazione, sarebbe probabilmente meglio per le api concentrare lo sforzo di allogrooming nel nucleo della colonia, cioè nella regione del favo con covata, dove rimangono le nutrici e dove le api appena nate portatrici di acari potrebbero emergere più frequentemente (previsione 2). Pertanto, abbiamo fatto una previsione generale di uno schema opposto tra le danze del foraggiamento e l'allogrooming nelle colonie infestate, con spostamenti centrifughi e centripeti nel loro verificarsi: **ci aspettavamo che le danze del foraggiamento prevalessero nella periferia e l'allogrooming fosse concentrato nel centro della colonia.**

Nell'esperimento di laboratorio, le osservazioni ad alta risoluzione del comportamento individuale in gruppi di api infestate sperimentalmente e api esenti da *Varroa* sono state condotte su giovani coorti di api (api di 1 giorno), in quanto rappresentano il veicolo attraverso il quale le generazioni di acari post-pionieri emergono dalle cellule e si diffondono nel nido (*17* , *19*). Abbiamo analizzato se la presenza di *Varroa* ha influenzato il comportamento sociale individuale e come questo abbia influito sulla coesione della rete sociale su piccola scala, concentrandosi su **tre comportamenti sociali comuni che sono coinvolti anche nella lotta e nella diffusione dell'acaro: allogrooming, antennazione e trofallassi. L'antenna** è il metodo principale utilizzato dalle api per il riconoscimento dei nidi (*35*). **La trofallassi** è un processo in cui un'ape distribuisce cibo liquido ad altre api, con le lavoratrici di un giorno che sono più frequentemente api donatrici (*36*). Abbiamo previsto di trovare diversi modelli di comportamento sociale individuale sotto pressione parassitaria (previsione 3), in accordo con la teoria dell'immunità sociale (*2*). In particolare, abbiamo previsto un aumento dell'allogrooming e una diminuzione dell'antennazione e della trofallassi, perché la prima normalmente limita la dispersione della malattia, mentre le ultime due normalmente la aumentano. L'equilibrio tra un aumento dell'allogrooming e una diminuzione dell'antenna e/o della trofallassi inciderebbe sulla coesione della rete sociale (ovvero, quanto bene il gruppo è connesso) nei gruppi infestati (previsione 4). Poiché **l'allogrooming** è un'interazione sociale sporadica, soprattutto se paragonata all'antennazione e alla trofallassi (*33*), abbiamo previsto che l'effetto della riduzione dell'antenna e della trofallassi avrebbe superato l'aumento previsto dell'allogrooming. Pertanto, una diminuzione della connettività di rete e della centralità del nodo (la misura in cui un'ape è ben connessa all'interno della rete di interazioni sociali, considerando sia le interazioni eseguite che quelle ricevute, cioè rispettivamente la centralità in uscita e in entrata) nei gruppi infestati dell'intera rete livello e/o una diminuzione della centralità

individuale nei gruppi infestati (soprattutto negli individui infestati) a livello del singolo nodo (ape).

Il nostro studio dimostra che le colonie di api reagiscono all'invasione di un acaro ectoparassita con cambiamenti significativi nei tratti comportamentali associati all'immunità sociale (uso dello spazio e interazioni sociali) sia a livello dell'intera colonia che a livello individuale. Questi risultati suggeriscono fortemente che le api da miele limitano la diffusione dei parassiti all'interno della colonia mediante il distanziamento sociale.

RISULTATI

Esperimento su tutta la colonia

Pronostico 1

Per testare la previsione 1 (Fig. 1) , cioè lo spostamento spaziale delle danze di foraggiamento verso la periferia della colonia sotto pressione parassitaria, abbiamo verificato se le danze di foraggiamento avvenivano principalmente su strutture laterali piuttosto che su quelle centrali (previsione 1a) e/o più vicine all'ingresso dell'alveare piuttosto che sulla parte centrale del favo (previsione 1b), negli *alveari* infestati da *varroa* rispetto agli *alveari* esenti da *varroa* . Inoltre, poiché la colonizzazione delle cellule della covata è un passaggio cruciale nella *Varroa* riproduzione, un'ulteriore previsione che abbiamo verificato è stata una diminuzione delle danze di foraggiamento sulle cellule della covata nelle colonie infestate rispetto alle colonie non infestate (previsione 1c). Per determinare più facilmente la posizione nel favo rispetto all'ingresso dell'alveare dove si è verificato il comportamento, il favo osservato è stato suddiviso in sei porzioni di uguale area come mostrato in fig. S1.

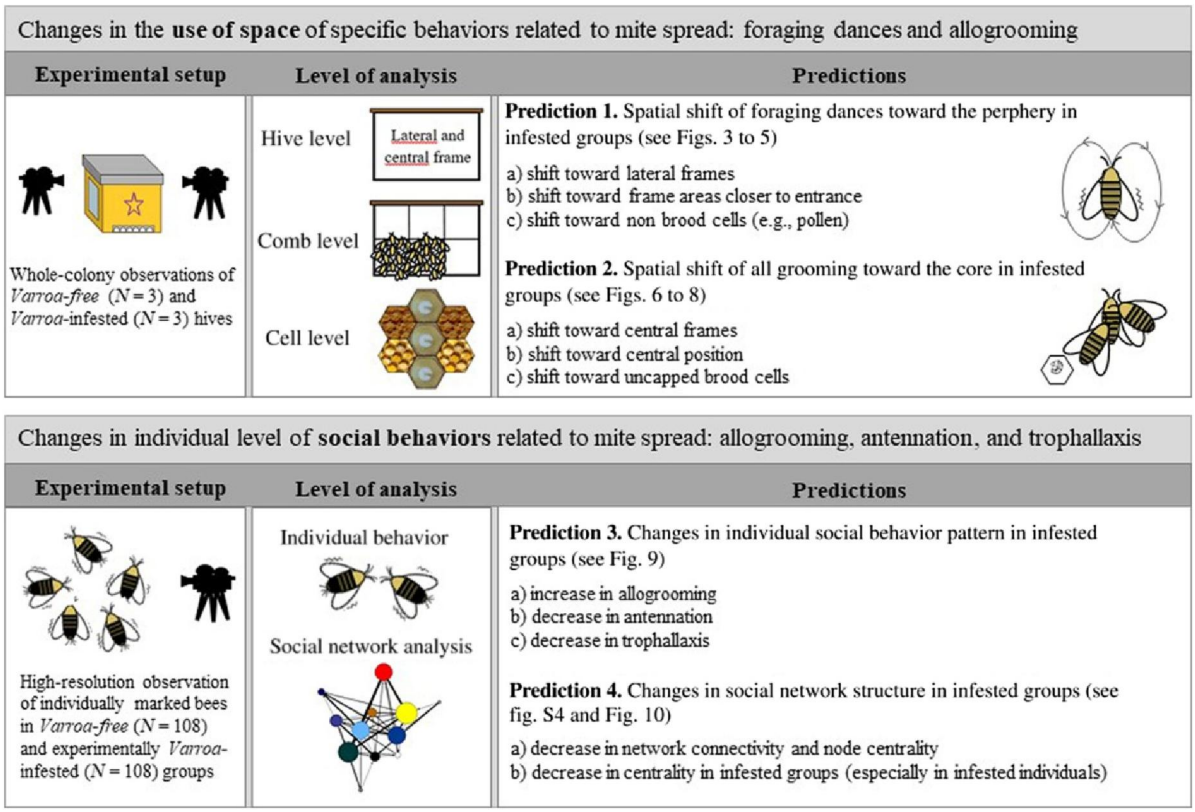


Fig. 1. Riepilogo del disegno sperimentale.

L'infestazione da acari Varroa induce cambiamenti nell'uso dello spazio e nel comportamento sociale delle api?

La forza media della colonia era simile nei due gruppi (numero di api adulte e celle di covata sigillate, esenti da varroa: 22.581 ± 1761 rispetto a infestate da varroa: 21.793 ± 3168; media + SE; test U di Mann-Whitney; U = 7, df = 4, P > 0,05; tabella S1), mentre il livello di infestazione (percentuale media di acari per api adulte ± SE) nel gruppo infestato da varroa era significativamente più alto rispetto al gruppo senza varroa (6,18 ± 0,34% contro 0,11 ± 0,11%, test U di Mann-Whitney; U = 10, df = 4, P < 0,05; tabella S1). Gli alveari privi di varroa sono stati ottenuti trattando metà delle colonie con acido ossalico gocciolato ogni settimana, per tre settimane consecutive, a partire da 2 mesi prima dell'inizio delle osservazioni. Nel gruppo infestato da Varroa è stato applicato solo il primo trattamento con acido ossalico gocciolato, 2 mesi prima dell'inizio delle osservazioni, dopodiché l'infestazione da Varroa è cresciuta naturalmente.

Controllando i video registrati all'interno delle arnie dei due gruppi sperimentali, abbiamo rilevato nello stesso intervallo di tempo (13 ore e 30 min per gruppo) un totale di 394 e 453 eventi di danze foraggianti (giro e dondolata) in Varroa-free e in Colonie infestate rispettivamente dalla varroa. La frequenza dei balli non differiva tra i due gruppi sperimentali [modello misto lineare generalizzato (GLMM) che utilizza giorno, fascia oraria di registrazione e codice alveare come fattori casuali; 2 = 0,254, df = 1, P = 0,613; Figura. S2A] anche considerando i due tipi di danza (rotondo e ondeggiante) (effetto di interazione tra gruppo sperimentale e tipo di danza; GLMM che utilizza giorno, fascia oraria di registrazione e codice hive come fattori casuali; $\chi 2 = 2.098$, df = 1, P = 0,147; fig. S2B).

Abbiamo trovato un forte supporto per la previsione di uno spostamento periferico nell'espressione delle danze del foraggiamento (Fig. 2A). Confrontando i due tipi di frame

(centrale e laterale), abbiamo trovato differenze significative nella frequenza relativa dei balli di foraggiamento (rotondo e oscillante) all'interno delle colonie infestate da Varroa e tra colonie infestate da Varroa e senza Varroa [effetto di interazione tra posizione del gruppo e del telaio; modello misto lineare (LMM) che utilizza giorno, fascia oraria di registrazione e codice hive come fattori casuali; 2 = 25,227, df = 1, P < 0,001]. In particolare, confermando la previsione 1a, la frequenza relativa dei balli era significativamente più alta nel frame laterale e significativamente più bassa nel frame centrale nel gruppo infestato rispetto al gruppo non infestato [LMM utilizzando giorno, fascia oraria di registrazione e codice dell'alveare come casuale fattori, test Tukey post hoc con correzione FDR (false discovery rate), frame centrale; z = 3.552, P < 0,001; telaio laterale; z = 3,550, P < 0,001; Fig. 3]. Inoltre, considerando i due gruppi sperimentali indipendentemente, abbiamo riscontrato una maggiore frequenza relativa di danze di foraggiamento nel favo laterale del cibo rispetto al favo centrale della covata nel gruppo infestato (LMM utilizzando giorno, fascia oraria di registrazione e codice dell'alveare come fattori casuali , test post hoc di Tukey con correzione FDR, z = 5,519, P <0,001; Fig. 3), mentre non sono state osservate differenze significative tra questi due tipi di frame nelle colonie esenti da varroa (LMM utilizzando giorno, fascia oraria di registrazione e codice dell'alveare come fattori casuali, test post hoc di Tukey con correzione FDR; z = 1,584 , P = 0,113, fig. 3). Il comportamento della danza di foraggiamento variava anche a seconda della posizione all'interno del favo rispetto all'ingresso dell'alveare (livello del fotogramma; fig. S1), confermando la previsione 1b (effetto di interazione tra il gruppo sperimentale e la posizione del favo; LMM che utilizza giorno, fascia oraria di registrazione e codice hive come fattori casuali; 2 = 29,941, df = 5, P <0,001; Fig. 4). **I balli erano più frequenti nella posizione inferiore vicino all'ingresso (fig. S1) e meno frequenti nella posizione centrale inferiore (fig. S1) nelle colonie infestate da Varroa rispetto alle colonie esenti da Varroa** (LMM utilizzando giorno, fascia oraria di registrazione e codice hive come fattori casuali, test post hoc di Tukey con correzione FDR; z = 4.201, P < 0.001; z = 3.020, P = 0.002; rispettivamente; Fig. 4). In tutte le altre posizioni del pettine, non si sono verificate differenze nella frequenza relativa dei balli di foraggiamento tra colonie libere da varroa e infestate da varroa (LMM utilizzando giorno, fascia oraria di registrazione e codice dell'alveare come fattori casuali, test post hoc di Tukey con correzione FDR ; P > 0,05; Fig. 4). Il tipo di substrato a pettine (livello cellulare) era anche un forte predittore della frequenza relativa dei balli di foraggiamento che si verificano nelle colonie prive di Varroa e infestate da Varroa (effetto di interazione tra il gruppo sperimentale e il tipo di substrato a pettine; LMM utilizzando giorno, fascia oraria di registrazione e codice hive come fattori casuali; 2 = 23.001, df = 5, P < 0.001; Fig. 5). In particolare, confermando la previsione 1c, **la frequenza relativa delle danze di foraggiamento sulle celle di covata chiuse era molto più bassa nelle colonie infestate da Varroa rispetto alle colonie esenti da Varroa** (LMM utilizzando giorno, fascia oraria di registrazione e codice dell'alveare come fattori casuali, Test post hoc di Tukey con correzione FDR; z = 3,219, P = 0,0012; Fig. 5). **Inoltre, i balli su provviste di polline (cellule non covate) erano molto più frequenti nelle zone infestate da Varroa rispetto alle colonie prive di varroa** (LMM utilizzando giorno, fascia oraria di registrazione e codice dell'alveare come fattori casuali, test post hoc di Tukey con correzione FDR; z = 2.962, P = 0,003; Fig. 5).

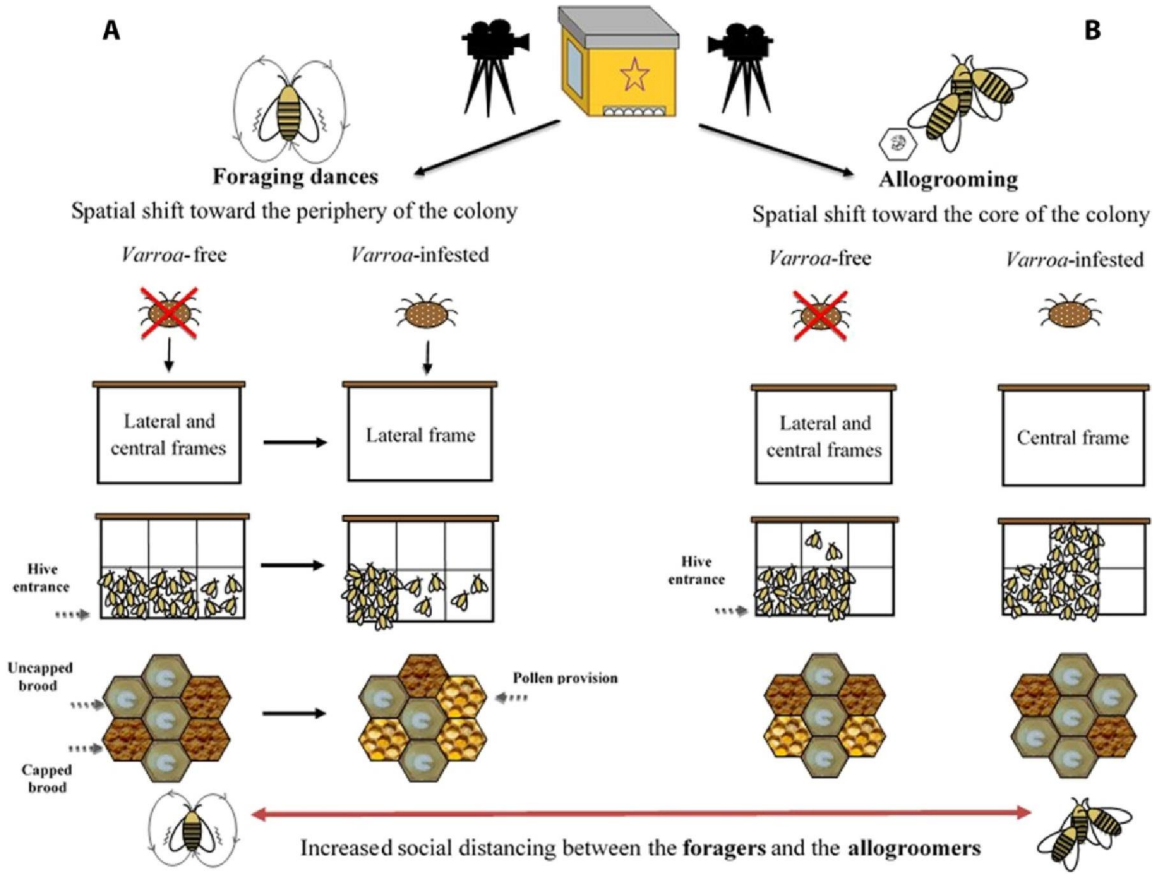


Fig. 2. Immunità organizzativa indotta.
Spostamento spaziale nelle danze del foraggiamento (A) e nel comportamento di allogrooming (B) osservato nell'esperimento dell'intera colonia.

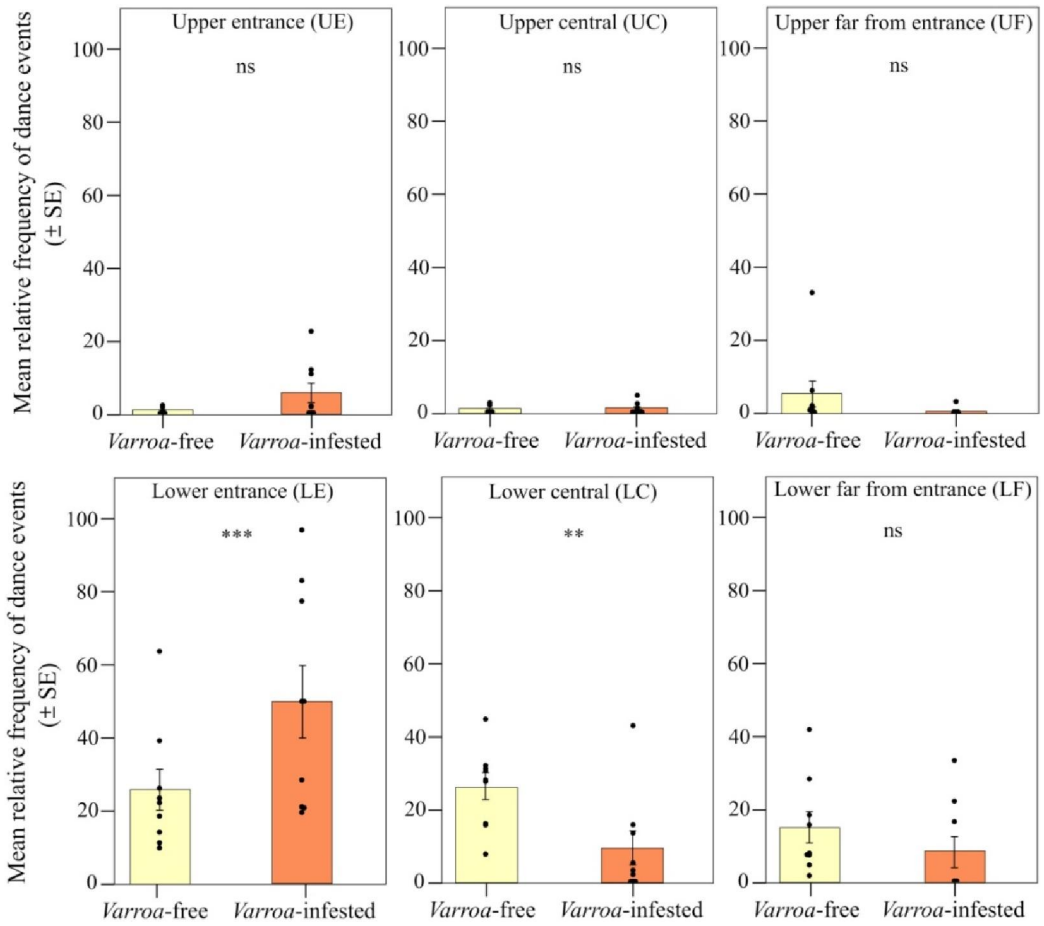


Fig. 4. Spostamento spaziale nelle danze del foraggiamento.
Frequenza relativa (media ± SE) degli eventi di danza (giro e dondolamento) per alveare e giorno di osservazione rilevati nelle colonie esenti da varroa e infestate da varroa a seconda della posizione nella cornice rispetto all'ingresso dell'alveare [posizione inferiore e superiore vicino l'ingresso (LE e UE), posizione centrale inferiore e superiore (LC e UC) e posizione inferiore e superiore lontana dall'ingresso (LF e UF)]. Non significativo (ns), $P > 0,05$; **$P < 0,01$; e ***$P < 0,001$.

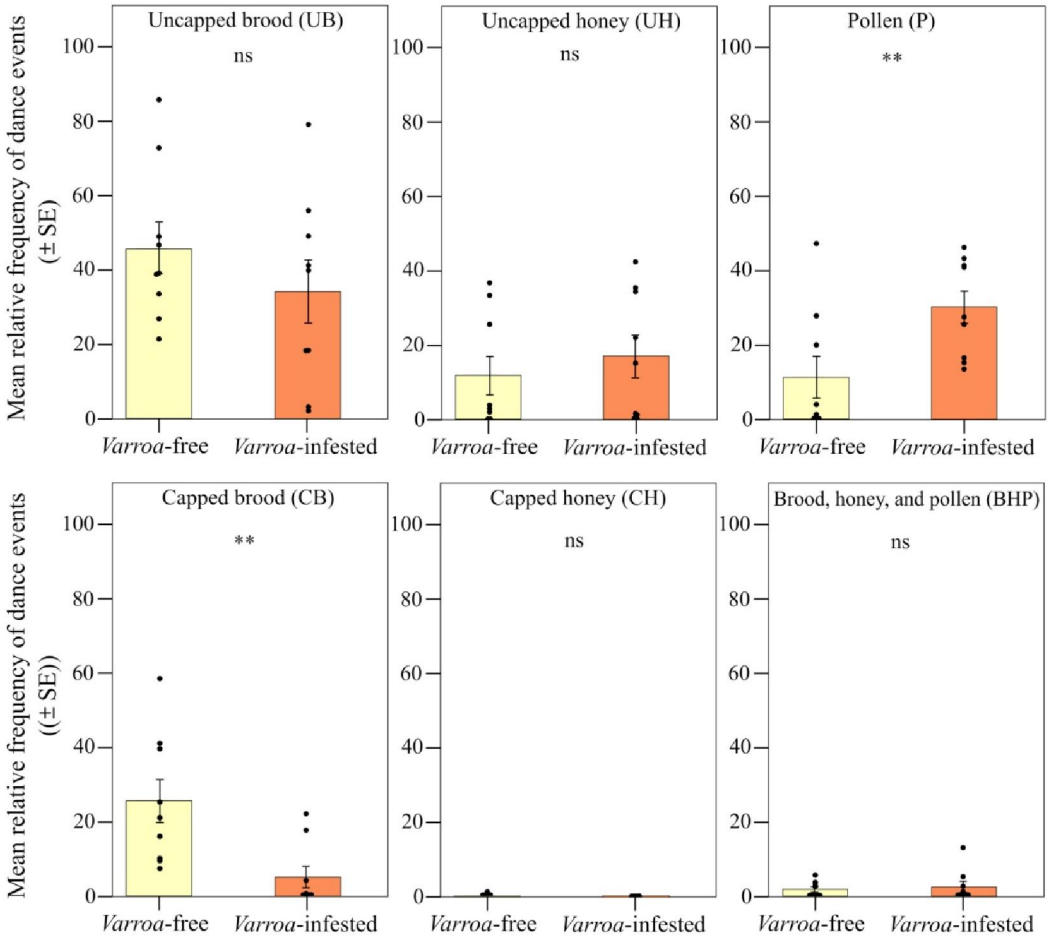


Fig. 5. Spostamento spaziale nelle danze del foraggiamento.

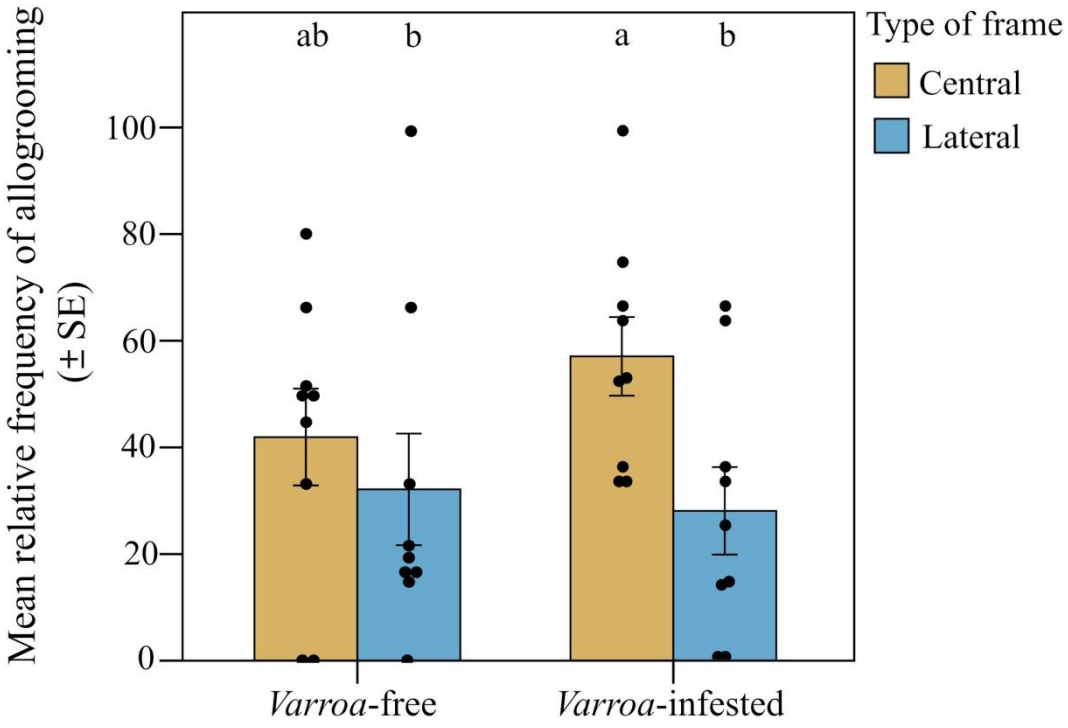
Frequenza relativa (media ± SE) di eventi di danza (giro e dondolamento) per alveare e giorno di osservazione rilevati in colonie esenti da varroa e infestate da varroa a seconda del tipo di substrato [covata scoperta e coperta (UB e CB); miele non tappato e tappato (UH e CH); polline (P); e un mix tra covata, miele e polline (BHP)]. ns, $P > 0,05$; e **$P < 0,01$.

Pronostico 2

Per testare la previsione 2 (Fig. 1), ovvero **lo spostamento spaziale del comportamento di allogrooming verso il nucleo della colonia sotto pressione parassitaria, abbiamo verificato se l'allogrooming è stato eseguito principalmente su favi centrali piuttosto che su quelli laterali** (predizione 2a), **sul parte del favo anziché in prossimità dell'ingresso dell'alveare** (previsione 2b; fig. S1) **e/o su celle di covata scoperte piuttosto che su celle alimentari** (previsione 2c; fig. S1) **in alveari infestati da varroa rispetto ad alveari esenti da varroa** . Negli stessi video utilizzati per le danze del foraggiamento (13 ore e 30 minuti per gruppo), abbiamo rilevato un totale di 67 e 100 eventi di allogrooming rispettivamente in colonie libere e infestate da Varroa. La frequenza osservata dell'allogrooming non differiva tra i due gruppi sperimentali (senza varroa contro infestato da varroa) (GLMM utilizzando giorno, fascia oraria di registrazione e codice dell'alveare come fattori casuali; $\chi2 = 2,828$, df = 1, $P = 0,092$; fig. S3). Anche il numero medio di groomer per evento di allogrooming, che era di circa 1, non differiva significativamente tra i due gruppi (GLMM utilizzando giorno, fascia oraria di registrazione e codice hive come fattori casuali; $\chi2 = 0,592$, df = 1, $P = 0,597$).

Abbiamo trovato un forte supporto per la nostra previsione 2 (Fig. 2B). Sebbene la frequenza relativa degli eventi di allogrooming osservati non fosse significativamente diversa tra le colonie libere da Varroa e infestate da Varroa quando si confrontavano i due tipi di frame [effetto di interazione tra il gruppo sperimentale (infestato da Varroa e privo di Varroa) e il tipo di frame; LMM che utilizza giorno, fascia oraria di registrazione e codice hive come fattori casuali; 2 = 1,407, df = 1, P > 0,05; Fig. 6], **abbiamo riscontrato una frequenza relativa significativamente maggiore di eventi di allogrooming nel favo centrale rispetto a quelli laterali nelle colonie infestate** (previsione 2a; LMM utilizzando giorno, fascia oraria di registrazione e codice dell'alveare come fattori casuali, Tukey post hoc test con correzione FDR;z = 2,536, P = 0,011; Fig. 6) e nessuna differenza tra frame centrale e laterale nel gruppo non infestato (LMM utilizzando giorno, fascia oraria di registrazione e codice alveare come fattori casuali, test post hoc di Tukey con correzione FDR;z = 0,858, P = 0,390; Fig. 3A). Uno spostamento nell'allogrooming verso il nucleo della colonia nelle colonie infestate è stato supportato anche dall'analisi spaziale a livello del favo (previsione 2b). **All'interno di ciascun gruppo sperimentale, l'allogrooming variava in modo significativo in base alla posizione nel favo rispetto all'ingresso dell'alveare** (LMM utilizzando giorno, fascia oraria di registrazione e codice dell'alveare come fattori casuali; $\chi 2$ = 18.813, df = 5, P = 0,002; Fig. .7). Quando si confrontano le colonie libere da varroa e infestate da varroa, si è verificata una frequenza relativa significativamente più alta di eventi di allogrooming nella posizione centrale superiore delle colonie infestate da varroa (LMM utilizzando giorno, fascia oraria di registrazione e codice dell'alveare come fattori casuali, Tukey test post hoc con correzione FDR; z = 7,417, P = 0,016; Fig. 4B). Per tutte le altre posizioni del pettine, non sono state rilevate differenze nella frequenza relativa degli eventi di allogrooming tra i due gruppi sperimentali (LMM utilizzando giorno, fascia oraria di registrazione e codice alveare come fattori casuali, test post hoc di Tukey con correzione FDR; P> 0,05;figura 7).

Infine, confermando la previsione 2c, **abbiamo osservato una frequenza relativa più elevata di eventi di allogrooming sulle celle di covata scoperte nelle colonie infestate rispetto alle colonie non infestate** (LMM utilizzando giorno, fascia oraria di registrazione e codice dell'alveare come fattori casuali, test post hoc di Tukey con FDR correzione; z = 2,345, P = 0,019; Fig. 8). In tutti gli altri tipi di substrato (miele, polline e miscela tra miele e polline), non abbiamo riscontrato differenze significative tra colonie libere da varroa e infestate da varroa (LMM utilizzando giorno, fascia oraria di registrazione e codice dell'alveare come casuale fattori, test post hoc di Tukey con correzione FDR; P > 0,05; Fig. 8).



. 6. Spostamento spaziale nel comportamento di allogrooming.

Frequenza relativa (media ± SE) degli eventi di allogrooming per alveare e giorno di osservazione rilevati all'interno del nido in colonie esenti da Varroa e infestate da Varroa a seconda del tipo di frame (centrale o laterale). Le barre con lettere diverse sono significativamente diverse (P <0,05).

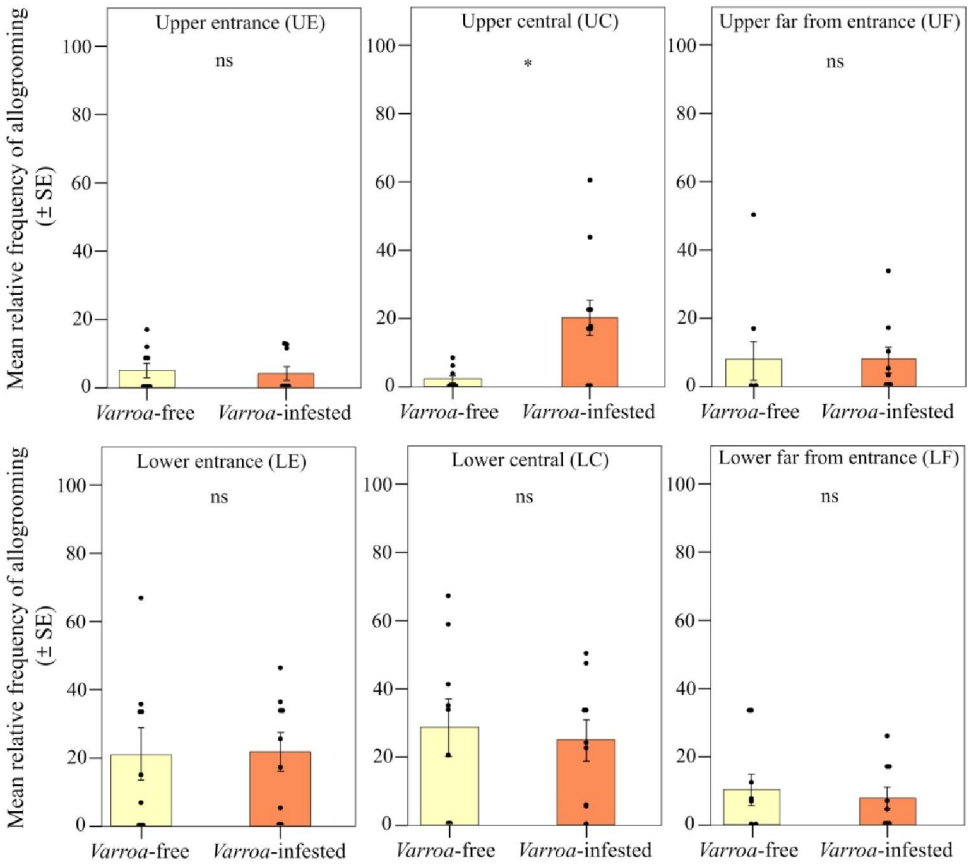


Fig. 7. Spostamento spaziale nel comportamento di allogrooming.

Frequenza relativa (media ± SE) degli eventi di allogrooming per alveare e giorno di osservazione rilevati all'interno del nido in colonie infestate e infestate da Varroa a seconda della posizione nel frame rispetto all'ingresso dell'alveare [posizione inferiore e superiore vicino all'ingresso (LE e UE), posizione centrale inferiore e superiore (LC e UC), posizione inferiore e superiore lontana dall'ingresso (LF e UF)]. ns, $P > 0,05$; e *$P < 0,05$.

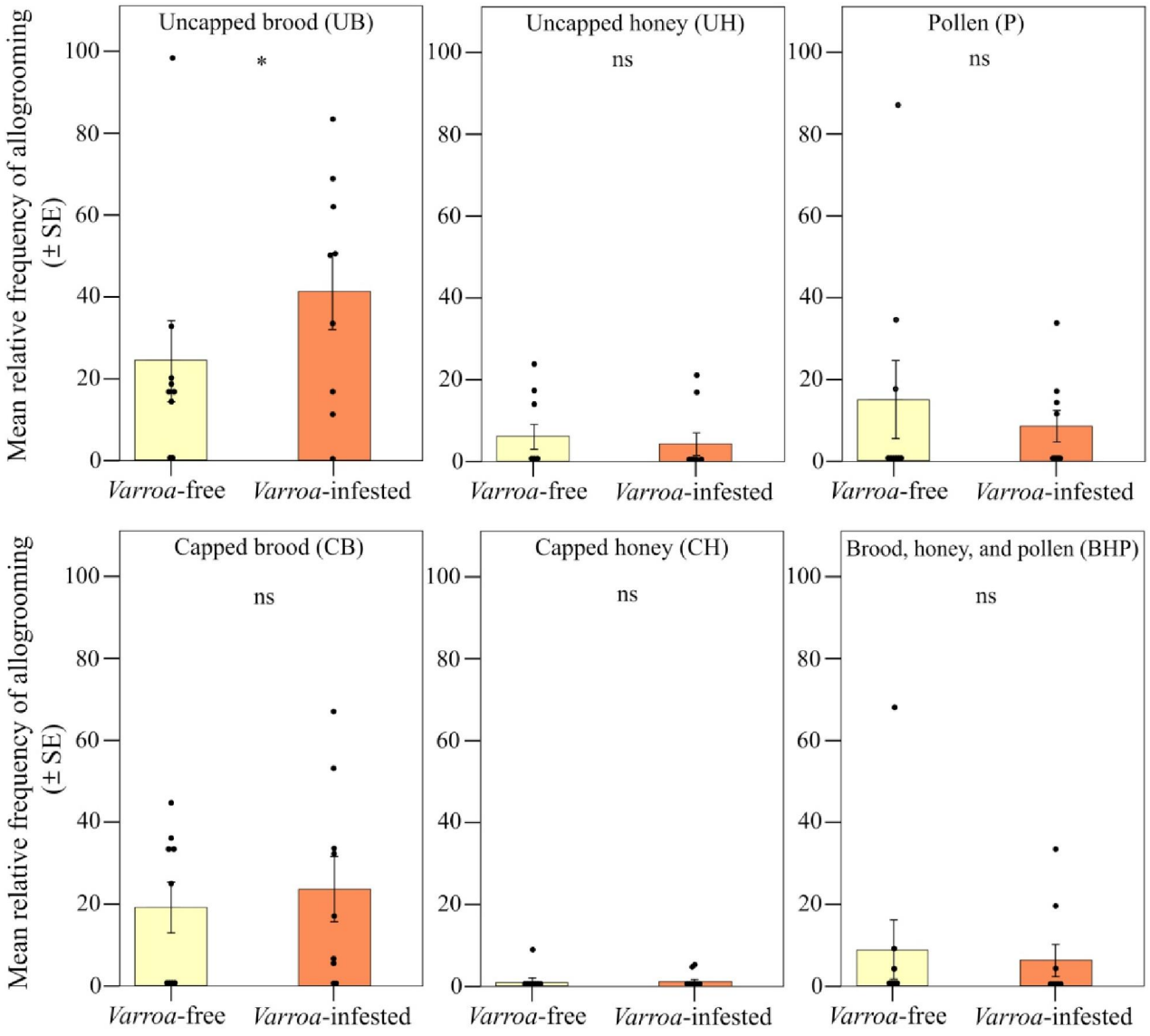


Fig. 8. Spostamento spaziale nel comportamento di allogrooming.

Frequenza relativa (media ± SE) di eventi di allogrooming per alveare e giorno di osservazione rilevati all'interno del nido in colonie esenti da Varroa e infestate da Varroa a seconda del tipo di substrato [covata scoperta e coperta (UB e CB); miele non tappato e tappato (UH e CH); polline (P); e un mix tra covata, miele e polline (BHP)]. ns, $P > 0,05$; e *$P < 0,05$.

Osservazione ad alta risoluzione del comportamento sociale individuale

Pronostico 3

Per testare la previsione 3 (Fig. 1), ovvero aumento dei comportamenti sociali individuali che normalmente limitano la diffusione della malattia, come l'allogrooming (previsione 3a), e una riduzione di quelli che aumentano la probabilità di diffusione, come l'antenna (previsione 3b) e trofallassi (predizione 3c), abbiamo condotto un esperimento per confrontare la frequenza individuale di ciascun tipo di comportamento tra le api adulte in gabbia del gruppo senza varroa, tutte non parassitizzate (V0), e quelle del gruppo infestato da varroa , che includeva api adulte parassitizzate (V+) e non parassitizzate (V-) in egual proporzione (percentuale di infestazione del 50%). L'esperimento a livello individuale è

stato replicato tre volte, utilizzando sei gabbie indipendenti (tre per il gruppo infestato e tre per il gruppo non infestato), ciascuna contenente 12 api contrassegnate, in ciascuna replica.

Controllando i video registrati su gabbie di gruppi senza Varroa e infestati da Varroa (180 min di riprese video per gruppo), abbiamo rilevato quanto segue: (i) 160 e 183 eventi di allogrooming, rispettivamente; (ii) rispettivamente 1198 e 1015 eventi di antenna; e (iii) 889 e 654 eventi di trofallassi, rispettivamente.
Quando abbiamo esaminato l'azione individuale delle api (campionamento focale degli animali), le differenze nella frequenza media di allogrooming tra esecutori (donatori) dei due gruppi in gabbia non erano significative [GLMM utilizzando gabbia ed esperimento (replica) come fattori casuali; 2 = 2,217, df = 1, P = 0,136; Fig. 9A]. Diversamente, quando sono stati considerati i ricevitori, è stata confermata la previsione 3a, con differenze significative nella frequenza media di allogrooming ricevuto tra i gruppi privi di Varroa e quelli infestati da Varroa [GLMM utilizzando la gabbia e l'esperimento (replica) come fattori casuali; 2 = 4.150; df = 1, P = 0,04; Fig. 9A]. La frequenza media di allogrooming ricevuto da un individuo era più alta nelle api adulte parassitate del gruppo infestato dalla varroa (V+) rispetto alle api adulte non parassitizzate del gruppo senza varroa (V0) [GLMM usando gabbia ed esperimento (replica) come casuale fattori, test post hoc di Tukey con correzione FDR; z = 2,393, P = 0,016;

Frequenza individuale degli eventi di allogrooming (A), antennazione (B) e trofallassi (C) eseguiti e ricevuti all'interno delle gabbie esenti da varroa e infestate da varroa (i box plot mostrano l'intervallo mediano e interquartile). V0 sono individui non parassitizzati del gruppo senza Varroa, mentre V− e V+ sono rispettivamente individui non parassitizzati e parassitizzati del gruppo infestato da Varroa. *P<0,05 e **P<0,01.
La previsione 3b, cioè diminuzione dell'antenna, un comportamento che aumenta la probabilità di diffusione del parassita, nelle colonie infestate non è stata confermata dalle nostre osservazioni. Al contrario, è stato registrato un aumento generale della frequenza di antenna nei gruppi infestati rispetto al gruppo non infestato [GLMM utilizzando la gabbia e l'esperimento (replica) come fattori casuali; 2 = 4,917, df = 1, P = 0,026]. Questo perché gli individui parassitizzati (V+) nelle gabbie infestate dalla Varroa hanno ricevuto più antenne rispetto a quelli non parassitizzati delle gabbie prive di Varroa (V0) e dello stesso gruppo (V-) [GLMM usando gabbia ed esperimento (replica) come casuale fattori, test post hoc di Tukey con correzione FDR; z = 1,968, P = 0,045; z = 2,587, P = 0,009, rispettivamente; Fig. 9B]. Inoltre, la frequenza media dell'antenna eseguita o ricevuta non differiva tra individui non parassitizzati delle gabbie infestate da Varroa (V-) e individui non parassitizzati delle gabbie senza Varroa (V0) [GLMM utilizzando gabbia ed esperimento (replica) come fattori casuali , Tukey post hoc test con correzione FDR; z = 1,297, P = 0,194; Fig. 9B]. All'interno del gruppo infestato dalla Varroa, abbiamo notato che gli individui parassitizzati (V+) hanno eseguito meno antenne rispetto a quelli non parassitizzati (V-) [GLMM usando la gabbia e l'esperimento (replica) come fattori casuali, test post hoc di Tukey con correzione FDR; z = 2,544, P = 0,011; Fig. 9B].

Anche la previsione 3c, cioè diminuzione della trofallassi, un altro tipo di comportamento che aumenta la probabilità di diffusione del parassita, nelle colonie infestate (Fig. 1) non è stata confermata dalle nostre osservazioni. Non abbiamo trovato differenze significative nella frequenza media della trofallassi eseguita o ricevuta tra gabbie senza varroa e infestate

da varroa [GLMM utilizzando gabbia ed esperimento (replica) come fattori casuali; 2 = 2,622, df = 1, P > 0,05]. Inoltre, all'interno del gruppo infestato da Varroa, abbiamo osservato ancora una volta un modello comportamentale significativamente diverso tra individui parassitizzati e non parassitizzati, in cui **gli individui parassitizzati (V+) hanno ricevuto più trofallassi rispetto agli individui non parassitizzati** (V-) [GLMM usando gabbia ed esperimento (replica) come fattori casuali, test post hoc di Tukey con correzione FDR; z = 2,763, P = 0,005; Fig. 9C].

Pronostico 4

Per testare la previsione 4 relativa ai cambiamenti nella struttura dei social network nei gruppi infestati (Fig. 1), abbiamo verificato se, sotto la pressione dei parassiti, ci fosse una diminuzione della connettività di rete e della centralità del nodo al a livello dell'intera rete (previsione 4a) e/o una diminuzione della centralità individuale a livello del singolo nodo (ape) (previsione 4b). I social network di gruppi liberi da Varroa e infestati da Varroa erano tutti realizzati da un singolo componente e nel complesso erano strettamente collegati. Non abbiamo trovato alcun supporto per la previsione 4a, perché non c'era alcuna differenza nell'indice di coesione della rete tra i gruppi privi di varroa e infestati da varroa (previsione 4a; LMM usando gabbia, esperimento e colonia di origine come fattori casuali; $\chi 2 = 0,075$, df = 1, P = 0,783, fig. S4). Non abbiamo trovato alcun supporto nemmeno per la previsione 4b. La posizione individuale nel social network non differiva tra individui non parassitizzati del gruppo senza varroa (V0) e individui non parassitizzati (V-) e parassitizzati (V+) del gruppo infestato da varroa per la maggior parte delle metriche misurate di centralità: centralità in uscita (LMM che utilizza gabbia, esperimento e colonia di origine come fattori casuali, test post hoc di Tukey con correzione FDR; P > 0,05; Fig. 10A), interezza (LMM che utilizza gabbia, esperimento e colonia di origine come fattori casuali, post di Tukey test hoc con correzione FDR; P > 0,05; Fig. 10B) e coefficiente di clustering (LMM utilizzando gabbia, esperimento e colonia di origine come fattori casuali, test Tukey post hoc con correzione FDR; P > 0,05; Fig. 10C). Solo la centralità in entrata differiva tra i gruppi ma in direzione opposta a quanto previsto, essendo più alta nel gruppo V+ che nel gruppo V− (LMM usando gabbia, esperimento e colonia di origine come fattori casuali, test post hoc di Tukey con correzione FDR; z = 2,487; P = 0,03, Fig. 10D).

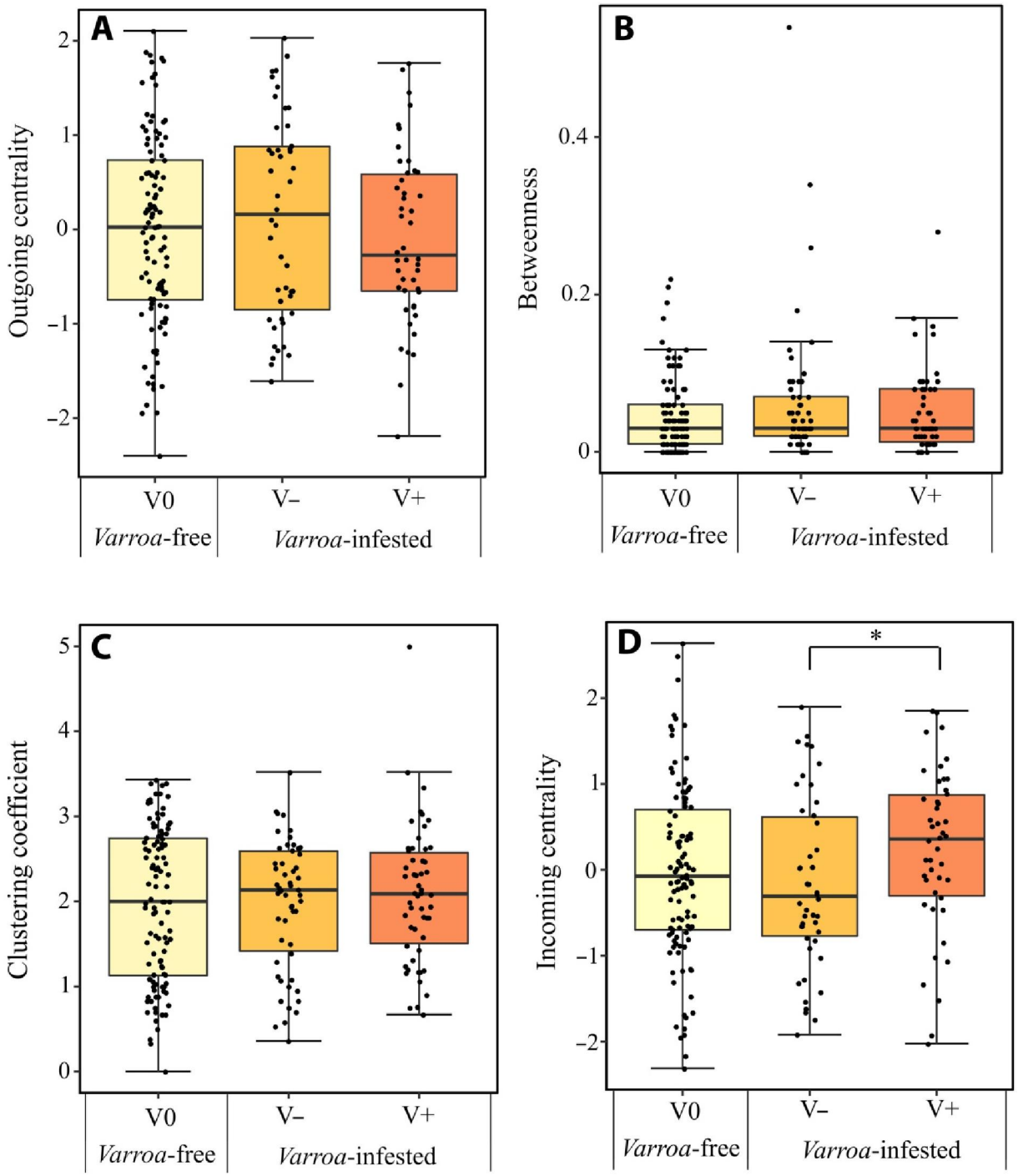


Fig. 10. Parametri del social network.
Confronto delle misure di centralità, ovvero centralità in uscita (A), interezza (B), coefficiente di clustering (C) e centralità in entrata (D), tra individui non parassitizzati (V0) in gruppi privi di varroa e non parassitizzati (V-) e parassitizzati (V+) individui in gruppi infestati da Varroa. I box plot rappresentano la mediana (linea), i quartili (riquadro) e i valori estremi (non superiori a 1,5 volte l'intervallo interquartile, baffi). *P < 0,05.

DISCUSSIONE

Gli acari parassiti rappresentano una sfida per diverse società di insetti e l'infestazione da V. destructor è tra le minacce più gravi per l'ape mellifera, A. mellifera. L'arrivo e la diffusione dell'acaro provocano una serie di marcati cambiamenti comportamentali all'interno delle colonie di api mellifere. Ad esempio, è stato dimostrato che **questo parassita influenza**

l'attività di allevamento della covata (23), accelera il polietismo temporale, determinando un'attività di foraggiamento precoce (37), e riduce la capacità di orientamento delle bottinatrici, aumentando così il fenomeno della deriva (38, 39). A nostra conoscenza, qui, forniamo la prova che **V. destructor influenza in modo significativo l'uso dello spazio e le interazioni sociali all'interno dell'alveare, con colonie infestate che mostrano cambiamenti nei tratti associati all'immunità sociale (uso dello spazio e interazioni sociali) nell'intera colonia e nel livello individuale**.
Quando sfidata da un parassita o da un patogeno, una colonia potrebbe trarre beneficio dall'adozione dell'immunità organizzativa indotta, ovvero limitare la diffusione del patogeno aumentando la compartimentazione spaziale e comportamentale delle diverse coorti di individui (8, 9). Abbiamo trovato due linee di prove a sostegno di ciò quando abbiamo monitorato due comportamenti probabilmente coinvolti nella dispersione del parassita, ovvero **balli di foraggiamento** e **allogrooming**, in colonie infestate e non infestate. In primo luogo, abbiamo scoperto che i balli di foraggiamento, che possono favorire l'ingresso della Varroa nella colonia attraverso l'autostop sui corpi dei raccoglitori (25, 26), si sono verificati più frequentemente alla periferia dell'alveare nelle colonie infestate rispetto alle colonie non infestate. In quest'ultimo, i raccoglitori danzavano sia nella cornice centrale che in quella laterale, in accordo con i risultati precedenti (29). Considerando la posizione all'interno del favo (a livello del telaio), la predominanza dei raccoglitori che danzano nella metà inferiore del favo in entrambi i gruppi era probabilmente dovuta al fatto che quell'area è più illuminata, come evidenziato in altri studi (29, 40, 41). Tuttavia, nelle colonie infestate, le danze del foraggiamento erano più concentrate vicino all'ingresso dell'alveare, mentre nel gruppo non infestato le danze del foraggiamento erano equamente distribuite nella posizione più vicina all'ingresso dell'alveare e nella porzione centrale del favo. A livello cellulare (tipo di substrato), nel gruppo infestato, si è registrato un relativo aumento della frequenza dei balli eseguiti su cellule alimentari, a scapito di quelli eseguiti su cellule di covata tappate, mentre non si sono verificati cambiamenti nelle cellule di covata scoperte . Questo risultato sembra contraddire parzialmente la nostra previsione, considerando che la covata scoperta rappresenta il substrato utilizzato dalla Varroa per la riproduzione.

Tuttavia, secondo Tautz (42) e Tautz e Rohrseitz (43), quando la danza viene eseguita su celle aperte, come le celle della covata non opercolate, il segnale vibrazionale viene trasmesso in modo più distante ed efficace, determinando così un maggiore reclutamento di altre bottinatrici. Pertanto, i nostri risultati suggeriscono un compromesso tra la necessità di limitare la diffusione del parassita e la necessità di mantenere una comunicazione efficiente all'interno della colonia negli alveari infestati. **Il cambiamento nell'uso dello spazio che abbiamo osservato in presenza di Varroa può essere interpretato come una strategia per mitigare gli effetti della parassitosi (immunità organizzativa indotta), poiché lo spostamento delle danze del bottinamento alla periferia riduce il contatto tra le bottinatrici e le nutrici della colonia** (8, 9). Allo stesso tempo, viene mantenuta una comunicazione efficiente all'interno delle colonie del gruppo infestato eseguendo danze di foraggiamento sulla covata scoperta tutte le volte che si osservano nel gruppo non infestato.
La seconda linea di evidenza è rappresentata dalle differenze nello schema spaziale di allogrooming rilevate tra colonie infestate e non infestate. **Abbiamo riscontrato che l'allogrooming, che può ridurre la diffusione e l'incidenza del parassitismo (32), si**

verificava più frequentemente su telai centrali piuttosto che su quelli laterali, nelle aree centrali del favo, solitamente occupate dalla covata, e su covata scoperta in alveari infestati rispetto agli alveari non infestati. Nelle colonie infestate, l'allogrooming dovrebbe essere concentrato nel nucleo della colonia, cioè nella regione del favo con covata, dove rimangono le nutrici e dove le api appena emerse portatrici di acari potrebbero emergere più frequentemente (17, 19).

Due processi non mutuamente esclusivi potrebbero spiegare lo spostamento spaziale nell'allogrooming osservato nelle colonie infestate. In primo luogo, l'allogrooming potrebbe essere eseguito dove è più probabile che si trovino gli acari, in linea con la teoria dell'immunità organizzativa. Gli acari parassitano preferenzialmente le api nutrici per migliorare la loro forma fisica (27) e per essere trasportati vicino alle celle di covata che devono invadere per riprodursi (17, 19). Inoltre, lo spostamento degli allogroomer verso il centro del nido nelle colonie infestate potrebbe rappresentare un indicatore dello spostamento dell'intera coorte di giovani lavoratori verso il centro del nido, per aumentare la distanza tra quest'ultimo e la coorte di anziani api (raccoglitrici) che normalmente occupano la parte più esterna del nido.
Sulla base dei nostri risultati relativi alle danze del foraggiamento e all'allogrooming, ipotizziamo che le colonie di api mellifere rispondano alla presenza di Varroa spostando le bottinatrici alla periferia del nido e le giovani api (infermiere) verso il suo centro, aumentando così la distanza tra le due coorti di api rispetto a quella rilevata in assenza di parassitismo.

Le analisi a livello dell'intera colonia hanno fornito una forte evidenza dell'immunità organizzativa indotta, mentre i risultati a livello individuale, ottenuti su individui di coorte (api di 1 giorno) in esperimenti in gabbia, hanno fornito un supporto misto. Da un lato, i maggiori livelli di allogrooming ricevuti dalle api di 1 giorno infestate da Varroa hanno confermato le previsioni della teoria dell'immunità sociale. D'altra parte, gli aumenti osservati nell'antenna e nella trofallassi osservati nei gruppi infestati rispetto ai gruppi non infestati non hanno confermato le nostre previsioni. L'aumentata antenna ricevuta dagli individui infestati era probabilmente correlata alla rilevazione di segnali emessi dal parassita (35, 44), e la loro maggiore attitudine a ricevere più trofallassi rispetto agli individui non infestati dello stesso gruppo potrebbe essere un modo per limitare il comportamento aggressivo di compagne di nido e crescente accettazione da parte di altre api (13). Questi risultati contraddicono la previsione di un livello ridotto di interazione per ridurre la diffusione dell'acaro. Inoltre, l'analisi della struttura della rete ha rivelato la mancanza di una significativa strategia di immunità organizzativa indotta dalla presenza dell'acaro, non essendo stata riscontrata alcuna evidenza di una riduzione della coesione sociale all'interno della stessa coorte di individui (a livello di rete intera) o per un riduzione della centralità delle api infestate, rispetto alle altre api, all'interno del social network. Al contrario, le api infestate erano ancora più centrali di quelle non infestate, probabilmente a causa dei livelli più elevati di allogrooming, antenna e trofallassi ricevuti. Questa mancanza di distanziamento sociale, con una connettività ancora maggiore di individui infestati, contraddice le previsioni sull'immunità organizzativa, mentre un aumento del caregiving potrebbe essere una spiegazione ragionevole dal punto di vista dell'immunità sociale, poiché questo comportamento potrebbe aiutare a ridurre il carico parassitario (32). Tuttavia,

dovremmo considerare che il comportamento di caregiving, che richiede il contatto fisico, può avere effetti opposti: può ridurre i livelli di infezione uccidendo alcuni degli acari che attaccano le api infestate, ma potrebbe anche facilitarne la diffusione ai caregivers (45). I nostri risultati combinati indicano che il distanziamento sociale si verifica su larga scala (cioè a livello di colonia) ma non su scala più ridotta (all'interno di una coorte di api), dove sembra prevalere il comportamento di cura. Ciò suggerisce che il compromesso tra protezione e rischio di trasmissione dovuto alle interazioni sociali potrebbe variare con la scala spaziale e la coorte considerata. Sebbene riconosciamo che la mancanza di prove non è una prova di assenza, potremmo ipotizzare che nei gruppi situati al centro della rete sociale coloniale (ad esempio, i nostri gruppi sperimentali di 12 api appena emerse), l'ottimizzazione ergonomica potrebbe prevalere sulla necessità per ridurre la diffusione della malattia. Al centro della società, un eccesso di compartimentazione, evitando interazioni con compagni di nido infetti, potrebbe portare a disagi sociali e una drammatica perdita di forza lavoro. Sebbene il nostro studio non fornisca prove a sostegno di nessuna delle due ipotesi (assistenza sanitaria o ottimizzazione ergonomica), mostra l'importanza di indagare la variazione nelle strategie di immunità sociale e la loro interazione tra diversi livelli (ad es. età di coorte) e contesti nelle società degli insetti (46-48).

Il nostro studio mostra chiaramente che le colonie di api mellifere rispondono all'ectoparassita V. destructor modificando l'uso dello spazio, aumentando così la distanza sociale tra la coorte di api giovani e vecchie. Questi risultati sono in linea con la teoria dell'immunità organizzativa indotta descritta da Stroeymeyt et al. (9) in L. niger infettato dal patogeno fungino M. brunneum e da Geffre et al. (13) nelle api da miele infettate dal virus della paralisi acuta israeliana. Nelle api da miele, questa dinamica si osserva anche a livelli più alti di organizzazione biologica. È stato riscontrato che la trasmissione orizzontale di V. destructor aumenta significativamente al diminuire della distanza intercoloniale (49, 50). Si può quindi ipotizzare che **le elevate distanze osservate tra colonie di api in condizioni naturali (51), molto maggiori di quelle utilizzate nell'apicoltura moderna, derivino da un percorso evolutivo indotto, almeno in parte, dalla necessità di limitare il diffusione delle malattie e garantire uno sfruttamento più razionale delle risorse alimentari.**

Il distanziamento sociale come risposta comportamentale alla malattia è certamente costoso per tutti gli animali sociali, come sta vivendo anche l'umanità durante l'attuale pandemia di COVID-19 (malattia di coronavirus 2019) (52, 53), **ma l'uso diffuso di questa strategia in natura suggerisce che i benefici possono superare i costi** (54, 55). La capacità mostrata dagli insetti sociali di modulare la propria struttura sociale in relazione al rischio di trasmissione di malattie consente agli individui di massimizzare i benefici delle interazioni sociali ove possibile e minimizzare il rischio specifico di malattie infettive (54, 55). Inoltre, per minimizzare i costi sociali, possono essere favoriti cambiamenti specifici nella struttura sociale (ad esempio, nello spazio, nelle frequenze e nelle proprietà della rete) mantenendo l'interazione all'interno del gruppo (54).

In conclusione, i nostri risultati sull'immunità sociale in A. mellifera suggeriscono che l'acaro V. destructor innesca una variazione comportamentale e spaziale nelle api da miele in risposta alla diffusione dell'infestazione. Questa plasticità comportamentale probabilmente aiuta a trovare un equilibrio tra lo scambio di informazioni, indispensabile negli animali sociali come le api mellifere, e la lotta alla diffusione di malattie e parassiti nell'alveare.

MATERIALI E METODI

apiario sperimentale

Lo studio è stato eseguito in un apiario dell'azienda agricola sperimentale del Dipartimento di Scienze Agrarie dell'Università degli Studi di Sassari, situata ad Ottava nel nord-ovest dell'isola di Sardegna (40°46′23″N, 8°29′34″E) (Italia), da maggio 2019 a novembre 2019. L'apiario era composto da 18 colonie di A. mellifera ligustica: 6 colonie sono state mantenute in alveari di osservazione (che avevano due finestre di vetro, una a destra e una a sinistra) per la indagini effettuate all'interno del nido, e 12 colonie sono state mantenute negli alveari standard Dadant-Blatt come fonte di api operaie e acari per gli esperimenti di laboratorio. Gli alveari Dadant-Blatt e gli alveari di osservazione contenevano 10 favi ciascuno e avevano un ingresso del nido caratterizzato da un diverso motivo di colore per ridurre la deriva (56). Durante il periodo sperimentale, ogni colonia è stata monitorata ogni 15 giorni per valutare la presenza della regina, della covata e delle provviste alimentari. Prima di ogni esperimento, il livello di infestazione della colonia è stato monitorato secondo la procedura standard (57). Inoltre, la forza della colonia è stata valutata stimando l'estensione totale della covata sigillata e la quantità di api adulte nell'alveare (58). A tale scopo è stato utilizzato come unità di misura un sesto di un telaio Dadant-Blatt (1880 mm2) e il numero di cellule tappate e di api adulte è stato ottenuto moltiplicando il numero di sesti di ciascuna matrice per 780 e254, rispettivamente (58). **Nove alveari esenti da varroa sono stati ottenuti trattando la metà delle colonie dell'apiario con acido ossalico gocciolato ogni settimana, per tre settimane consecutive, a partire da 2 mesi prima dell'inizio delle osservazioni.** Nelle altre nove colonie è stato applicato solo il primo trattamento con acido ossalico gocciolato, 2 mesi prima dell'inizio delle osservazioni, e poi il livello di infestazione da Varroa è cresciuto naturalmente. La forza della colonia è stata bilanciata in entrambi i gruppi sperimentali rimuovendo i telai di covata dalle colonie più forti.

Osservazioni comportamentali dell'intera colonia

Le osservazioni sulle danze del foraggiamento e sull'allogrooming sono state eseguite secondo il “metodo di campionamento di tutte le occorrenze” (59). I video sono stati realizzati contemporaneamente su gruppi privi di varroa (tre colonie, media ± SE, livello di infestazione 0,11 ± 0,11%) e infestati da varroa (tre colonie, media ± SE, livello di infestazione 6,2 ± 0,34%) utilizzando quattro telecamere a definizione (HD) (Canon LEGRIA HF R506, Tokyo, Giappone), due per ciascuno dei due alveari di osservazione confrontati simultaneamente (60). In tre giorni consecutivi, ogni colonia è stata registrata durante una sessione di 15 minuti, tre volte al giorno (mattina, pomeriggio e sera), tra le 10:30 e le 18:30. posizionando due videocamere a ~30 cm da ciascuna finestra di vetro (sui lati destro e sinistro). Un totale di 27 ore di registrazione video è stata catturata seguendo uno schema casuale tra i sei alveari, ciascuno osservato per la stessa durata (4,5 ore). Le osservazioni sono state effettuate contemporaneamente su due tipi di favo selezionati 12 ore prima di iniziare l'esperimento: uno è stato prelevato dalla parte centrale del nido e ha presentato covata coperta e scoperta su almeno il 60% della sua superficie
(cornice centrale), mentre il secondo è stato prelevato dai lati dell'alveare e presentava miele e polline scoperti e incappucciati su almeno il 60% della sua superficie (frame laterale). Entrambi i favi presentavano tutti i tipi di substrati sulla loro superficie: covata con e senza cappuccio, miele e polline con e senza cappuccio. Un'ora prima di iniziare la registrazione video, i due pettini selezionati sono stati posizionati immediatamente dietro le finestre di vetro di ogni alveare. Spostare i favi centrali in posizione laterale per il tempo necessario alle riprese video non altera il loro status di “favi centrali”, in quanto le raccoglitrici

segnano le posizioni dei favi dove eseguono le danze dopo i primi voli di foraggiamento per poi tornare a le stesse posizioni per ripeterle durante il resto della giornata (29, 41, 42). I due tipi di favi sono stati osservati alternativamente sul lato destro e sinistro dell'alveare per evitare qualsiasi effetto di posizione. Successivamente, i video sono stati proiettati utilizzando BORIS versione 7.9.15 (61) per determinare le frequenze (cioè il numero di eventi per unità di tempo) delle danze di foraggiamento e degli eventi di allogrooming. Questi ultimi sono stati considerati solo quando si sono verificati per almeno 2 s. Per determinare più facilmente la posizione del favo rispetto all'ingresso dell'alveare dove si sono verificati i comportamenti osservati, gli operatori hanno suddiviso ciascun quadro di osservazione in sei porzioni di uguale area come mostrato in fig. S1. Sono stati anche registrati i tipi di substrato in cui si sono verificati i balli di foraggiamento e l'allogrooming: covata scoperta e coperta, miele, polline e una miscela di covata, miele e polline senza cappuccio e senza cappuccio. Quando sono stati visualizzati i video, l'operatore non era a conoscenza del livello di infestazione dell'alveare (piano sperimentale cieco).

Osservazione ad alta risoluzione del comportamento sociale individuale

Fonte di api e acari del miele

Le api da miele e gli acari V. destructor utilizzati nei nostri test biologici sui social network sono stati campionati dagli alveari Dadant-Blatt del nostro apiario sperimentale. Le colonie infestate sono state utilizzate come fonte di acari Varroa, mentre quelle non infestate (livello di infestazione < 1%) sono state utilizzate come fonte di covata di api. Per ottenere api emergenti per i nostri esperimenti, è stata raccolta una covata di api da miele pronta per emergere da tre colonie prive di varroa e conservata in un incubatore in condizioni ambientali controllate (35°C, 70% di umidità relativa, buio) per 20 ore (62). Tutte le api emergenti sono state alimentate con soluzione di saccarosio 50% (p/v) per 2 ore, prima di iniziare gli esperimenti, per evitare che una dieta differenziata potesse influenzare i social network, come notato da Naug e Smith (6) e Naug (7). Le femmine adulte di acari sono state campionate da cellule di covata di api provenienti da colonie infestate da varroa lo stesso giorno in cui è stato allestito ogni saggio biologico. Le api da miele o gli acari che mostravano mobilità, dimensione o colore anormali non sono state incluse negli esperimenti.

Configurazione del test biologico comportamentale

Le api emergenti non infestate, originate da tre colonie prive di varroa non correlate, sono state contrassegnate utilizzando un kit marcatore regina composto da etichette numerate colorate (2 mm Ø), una colla di tipo resina non tossica e un bastoncino. Al torace di ogni ape è stata incollata una targhetta, che aveva un colore (bianco, rosa e giallo) che corrispondeva alla colonia di origine dell'ape e un numero specifico ad ogni singola ape (codice ape). Per ottenere api non infestate o infestate, ogni ape marcata è stata quindi trasferita in una singola capsula di Petri, con o senza acaro Varroa, e tenuta lì per 2 ore. Le api infestate utilizzate nei nostri biosaggi erano solo quelle su cui il parassita era rilevabile visivamente (V+) e preferibilmente inserite tra i loro segmenti addominali. In ciascun saggio biologico, sono stati formati i seguenti gruppi di api sperimentali (trattamenti): gruppi privi di varroa (V0), senza api parassitate, e infestati da varroa, con il 50% di api parassitate. Ogni trattamento consisteva in tre gabbie metalliche indipendenti con 12 api ciascuna (12 api × 3 repliche = 36 api per trattamento per saggio). Per prevenire qualsiasi effetto genotipico, ogni gruppo di 12 api da miele era composto da quattro api provenienti da ciascuna delle tre colonie. Per ottenere il 50% del livello di infestazione nel gruppo

infestato dalla Varroa, sono state poste in ciascuna gabbia di questo trattamento sei api infestate (V+) (due api per colonia) e sei api non infestate (V-) (due api per colonia). Ogni saggio biologico è stato replicato tre volte per un totale di 108 api per trattamento. Ogni gabbia metallica (10 cm per 10 cm per 5 cm) aveva un foglio di pettine di cera d'api (9 cm per 9 cm) che copriva il suo lato interno più grande ed era chiusa con una finestra di vetro (10 cm per 10 cm). Il codice dell'ape (colore del cartellino e numero specifico) di ogni ape ha fornito le seguenti informazioni: colonia di origine, gruppo sperimentale e, all'interno del gruppo infestato dalla varroa, ape con o senza acaro.
Osservazioni comportamentali in gabbia
Il comportamento di ogni gruppo è stato monitorato utilizzando due telecamere HD (Canon LEGRIA HF R506, Tokyo, Giappone) (una telecamera per gabbia di trattamento), per 20 minuti per gabbia. Le attività di videoregistrazione sono state condotte contemporaneamente in una gabbia di ciascun gruppo sperimentale (senza o infestato da Varroa). La frequenza dei seguenti tipi di comportamento sociale è stata registrata utilizzando il "campionamento animale focale", ovvero per ogni singola ape presente nelle gabbie (59): antennazione, trofallassi e allogrooming. Per ricostruire la rete sociale tra individui all'interno dello stesso gruppo sperimentale (Varroa-free o Varroa-infested) e per confrontare la struttura della rete sociale in relazione all'esposizione ai parassiti, sono stati determinati l'attore e il destinatario di ogni interazione sociale osservata, per tutti i tipi di interazione sociale (comportamento). Durante le osservazioni comportamentali è stato anche notato il trasferimento del parassita da un individuo all'altro. Inoltre, la presenza o l'assenza di Varroa su ciascuna ape è stata ricontrollata prima e dopo il campionamento focale di 20 min. Tutte le tracce di registrazione video sono state visualizzate al rallentatore, utilizzando VLC Media Player versione 3.0.11.

analisi statistica
Osservazioni comportamentali dell'intera colonia, previsioni 1 e 2
Per verificare le differenze nella frequenza dei balli di foraggiamento e nell'allogrooming tra alveari privi di varroa e infestati da varroa, abbiamo utilizzato un GLMM con una struttura di errore binomiale negativa, utilizzando giorno, fascia oraria di registrazione e codice dell'alveare come fattori casuali. La frequenza dei balli di foraggiamento e l'allogrooming sono stati utilizzati come variabili di risposta e il gruppo sperimentale (senza Varroa e infestato da Varroa) è stato utilizzato come fattore fisso. Per il modello di danza del foraggiamento, oltre al gruppo sperimentale, sono stati utilizzati come fattori fissi il tipo di danza (rotondo e ondeggiante) e l'interazione tra il gruppo sperimentale e il tipo di danza. Inoltre, per verificare se gli alveari privi di varroa e infestati da varroa differivano nella loro preferenza per eseguire danze di foraggiamento e allogrooming in relazione alla posizione del telaio (centrale o laterale), alla posizione in relazione all'ingresso dell'alveare e al tipo di substrato, abbiamo utilizzato LMM, con giorno, fascia oraria di registrazione e codice hive come fattori casuali. Frequenza relativa dei balli di foraggiamento e allogrooming [cioè, frequenza degli eventi di un particolare comportamento in relazione alla posizione del telaio, posizione nel favo o tipo di substrato, divisa per la frequenza totale di tutti gli eventi osservati per lo stesso comportamento nel gruppo sperimentale (infestati o non infestati), moltiplicati per 100] sono stati utilizzati come variabili di risposta e il gruppo sperimentale (senza e infestato da Varroa), la posizione spaziale e la loro interazione sono stati utilizzati come fattori fissi. Inoltre, i test post hoc di Tukey, aggiustati per multipli

confronti utilizzando il FDR, sono stati utilizzati per esplorare le differenze riguardanti la posizione spaziale in cui le api eseguivano danze di raccolta e comportamento di allogrooming negli alveari esenti da Varroa e infestati da Varroa. Inoltre, abbiamo utilizzato un GLMM con una struttura di errore binomiale negativa per confrontare il numero di groomer (esecutori e ricevitori) tra il gruppo privo di Varroa e quello infestato da Varroa, utilizzando giorno, fascia oraria e codice dell'alveare come fattori casuali. Il numero di toelettatori è stato utilizzato come variabile di risposta e il gruppo sperimentale (senza Varroa e infestato da Varroa) è stato utilizzato come fattore fisso.

Osservazione ad alta risoluzione del comportamento sociale individuale, previsioni 3 e 4

Abbiamo usato GLMM con una struttura di errore binomiale negativo, con gabbia ed esperimento (replica) come fattori casuali per i seguenti scopi: (i) test per le differenze nell'allogrooming, nell'antenna e nella trofallassi tra individui in gabbie libere e infestate da Varroa. Le frequenze di allogrooming, antennazione e trofallassi sono state utilizzate come variabili di risposta e il gruppo sperimentale (senza Varroa e infestato da Varroa) è stato utilizzato come fattore fisso; e (ii) testare le differenze nel comportamento di allogrooming, antennazione e trofallassi tra individui del gruppo senza Varroa e individui con o senza acari sui loro corpi dal gruppo infestato da Varroa. Le frequenze di allogrooming, antennazione e trofallassi sono state utilizzate come variabili di risposta e categoria di individui [individui del gruppo senza varroa (V0) e individui con (V+) o senza acari (V-) sui loro corpi dal gruppo infestato da varroa gruppo] è stato utilizzato come fattore fisso. Inoltre, i test post hoc di Tukey, aggiustati per confronti multipli utilizzando l'FDR, sono stati utilizzati per esplorare le differenze nel comportamento di allogrooming, antenna e trofallassi tra individui V0, V+ e V−. Abbiamo usato modelli separati per artisti e ricevitori. Tutte le analisi del modello misto sono state eseguite utilizzando il pacchetto R lme4 (63).

Tutte le ipotesi del modello GLMM e LMM sono state verificate visivamente utilizzando grafici residui (cioè densità dei residui, grafico quantile-quantile e valori adattati rispetto ai residui standardizzati) generati utilizzando la funzione mcp.fnc all'interno del pacchetto R LMERConvenienceFunctions (64) e la distanza di Cook grafici generati utilizzando l'influenza del pacchetto R. IO (65). Le ipotesi del modello sono state soddisfatte (residui normalmente distribuiti, omogeneità della varianza e assenza di valori anomali). I test post hoc di Tukey aggiustati per confronti multipli con il metodo Benjamin-Hochberg, per controllare l'FDR, sono stati eseguiti utilizzando il pacchetto R multcomp (66). Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando la versione R 4.0.2 (67).

Per verificare se l'infestazione da varroa inducesse cambiamenti nella rete sociale delle api, abbiamo confrontato gruppi di api non infestate (senza varroa) e infestate (infestate da varroa) a due livelli: (i) la coesione della rete sociale complessiva e (ii) la posizione individuale di ogni ape all'interno del proprio social network. Abbiamo costruito un modello di rete diretto e ponderato per ciascun gruppo (N = 18), in cui i nodi rappresentavano le singole api e i collegamenti tra i nodi rappresentavano le interazioni sociali tra due nodi qualsiasi. La direzione del collegamento andava dall'attore al destinatario di un comportamento; ad esempio, per la trofallassi, è passato dal donatore al ricevitore della goccia di cibo. Il peso di ogni collegamento era la somma del numero di interazioni che si verificavano tra i due nodi dati. Poiché eravamo interessati alla rete complessiva delle interazioni sociali e dato che alcuni comportamenti non erano abbastanza frequenti da consentire il calcolo della rete (ad es. 0.001), ed è stata eseguita un'analisi individuale di ogni singolo comportamento (vedi sopra), abbiamo messo insieme antenna, trofallassi e allogrooming per ogni coppia di nodi. Esistono diverse misure che valutano la coesione

complessiva di una determinata rete. Per ottenere una caratterizzazione completa della struttura e della connettività della rete, abbiamo calcolato le seguenti metriche: (i) densità di rete, determinata come il totale di tutti i valori di collegamento diviso per il numero di collegamenti possibili; (ii) coefficiente di clustering ponderato, una misura del grado in cui i nodi di un grafo tendono a raggrupparsi, calcolato come media pesata del coefficiente di clustering di tutti gli attori, ciascuno pesato per il proprio grado; (iii) grado medio ponderato, calcolato come media della somma dei pesi degli spigoli dei nodi; (iv) indice K-core, una misura della robustezza di una comunità in degenerazione, rappresentata dal sottografo massimale in cui ogni vertice ha almeno grado k; e (v) indice di Wiener, cioè la somma di tutti i cammini più brevi tra un dato nodo e tutti gli altri nodi correlati nel grafico. Inoltre, a livello di diadi (motivi di sottorete), abbiamo calcolato la transitività del tripletto e la reciprocità dell'arco. Il primo è il numero di triple transitive diviso per il numero di triplette potenzialmente transitive per l'aggiunta di un singolo arco. La reciprocità degli archi misura la proporzione di archi che sono reciprocamente ricambiati, cioè, se il nodo x invia un legame a y, y invia anche un legame a x.

Le misure di coesione della rete sono spesso correlate positivamente tra loro e, come nel nostro caso, abbiamo applicato un'analisi delle componenti principali (PCA) per evitare problemi di collinearità. Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) e il test di Bartlett hanno indicato che c'è spazio per un PCA (KMO = 0,841, test di Bartlett per la sfericità $P < 0,001$). La PCA ha prodotto un unico componente principale di autovalori maggiori di 1, che spiegava l'85% della varianza totale. Quindi, il PC1 risultante (che abbiamo chiamato indice di coesione della rete) rappresentava tutte le misure di rete calcolate. In sostanza, più alto era l'indice di coesione della rete, più la rete era connessa e stretta. Abbiamo quindi valutato l'influenza del trattamento (infestato contro non infestato, N = 9 contro 9) utilizzando un LMM con indice di coesione della rete come variabile di risposta, il trattamento come fattore fisso e l'esperimento (replica) come effetto casuale.

Per verificare se l'infestazione da Varroa inducesse cambiamenti nella posizione individuale all'interno del social network, abbiamo confrontato la posizione individuale nella rete (quanto un individuo era centrale nel suo social network) di api di tre categorie: api da gruppi senza Varroa (V0), api senza Varroa da gruppi infestati (V-), e api con Varroa da gruppi infestati (V+). Per ogni individuo, abbiamo calcolato quattro misure standard di centralità del nodo (normalizzate all'interno della rete): grado nodo ponderato, ovvero il numero di collegamenti diretti che un individuo focale aveva con altri individui, ponderato per la forza di ciascun collegamento (numero di interazioni); centralità della vicinanza, cioè la distanza media, misurata come numero di archi, da un dato nodo di partenza a tutti gli altri nodi della rete; beta centralità, che cattura la nozione che un grado si estende oltre il solo strato di connessioni di primo ordine che ha un nodo focale considerando la centralità dei vertici a cui è connesso il vertice focale; e betweenness, che misura la frequenza con cui un nodo appare sui percorsi più brevi tra i nodi della rete e il coefficiente di clustering, che misura la densità di una vicinanza del nodo focale, cioè il grado in cui i vicini immediati di un individuo sono connessi.

Abbiamo calcolato separatamente le misure in entrata (cioè ricevute) e in uscita (cioè eseguite) per le tre metriche di rete direzionali (grado del nodo pesato, centralità di prossimità e centralità beta). Ad esempio, il grado pesato in uscita considera solo le interazioni avviate in un nodo specifico e dirette verso un altro nodo (ad esempio, dall'attore di un'antenna), mentre la vicinanza in entrata considera solo i legami in entrata (ad esempio, dal destinatario dell'antenna). Le misure di centralità dei singoli nodi sono spesso correlate

positivamente nei social network (68, 69). Per questo motivo, abbiamo applicato una PCA (rotazione Varimax) alle tre misure della rete direzionale (grado del nodo pesato, centralità di prossimità e centralità beta) per ridurre il numero di variabili in un numero minore di componenti principali non correlati, quindi
estraendo componenti principali con autovalori maggiori di 1, e quindi utilizzandoli come metriche di social network nel nostro studio insieme a betweenness e coefficiente di clustering. KMO e il test di Bartlett indicano che qui c'è spazio per un PCA (KMO = 0,669) e il test di Bartlett per la sfericità (P <0,001). La PCA ha prodotto due componenti principali degli autovalori maggiori di 1, che insieme spiegavano l'82,24% della varianza totale. Il PC1 risultante (che abbiamo chiamato indice di centralità in uscita) è stato rappresentato da grado esterno ponderato, centralità beta in uscita e vicinanza in uscita. Il PC2 risultante (che abbiamo chiamato indice di centralità in entrata) era rappresentato da grado ponderato, centralità beta in entrata e vicinanza in entrata. In alcuni casi, gli acari Varroa si sono spostati tra gli individui durante l'esperimento e abbiamo rimosso dall'analisi gli individui coinvolti (N = 16 dei 216 individui in totale).
Abbiamo valutato l'importanza della categoria, vale a dire, individui non parassitizzati del gruppo Varroa-free (V0), individui non parassitizzati del gruppo infestato da Varroa (V-), e individui parassitizzati del gruppo infestato da Varroa (V+) sulla centralità individuale in il social network di interazione eseguendo un LMM per ogni misura di centralità: centralità in uscita PC1, centralità in entrata PC2, betweenness e coefficiente di clustering. Abbiamo utilizzato ogni misura di centralità come variabile dipendente; categoria come fattore fisso; e gabbia, esperimento e colonia di origine come fattori casuali. I test post hoc di Tukey aggiustati per confronti multipli utilizzando l'FDR sono stati utilizzati per esplorare le differenze tra individui V0, V+ e V−. Tutte le metriche dei social network sono state calcolate utilizzando UCINET v6.665 (70). Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software statistico R.

Ringraziamenti
Siamo grati ad A. H. Dias Francesconi per l'aiuto nella revisione del manoscritto e ai revisori anonimi per aver fornito utili commenti sulle versioni precedenti del manoscritto.
Finanziamento: **Questa ricerca è stata finanziata dall'Università di Sassari, Italia (FAR2020FLORIS e FAR2020SATTA).**
Contributi degli autori: I.F., M.P. e A.S. progettato lo studio. S.A., M.P. e E.S. esperimenti eseguiti. S.A., A.C., M.P., A.S. e P.T. ha eseguito la cura e l'analisi dei dati. SE. e come. finanziamenti acquisiti. A.C., M.P. e A.S. hanno scritto la versione originale del documento. Tutti gli autori hanno contribuito in modo significativo alla stesura finale di questo articolo.
Interessi in competizione: Gli autori dichiarano di non avere interessi in competizione.
Disponibilità dei dati: Tutti i dati necessari per valutare le conclusioni del paper sono presenti nel paper e/o nei Materiali Supplementari.