



***Considerații ecopatologice la insecte,
abordare moleculară***



Volumul 1. Apis mellifera L.





CUPRINS

	pag.
Lista figurilor	5
Lista tabelelor	8
Introducere	9

CAPITOLUL I.

BOLILE ȘI PARAZIȚII ALBINELOR	17
1.1. BOLILE ALBINELOR	18
1.1.1. Boli provocate de viruși	18
1.1.2. Boli provocate de bacterii	28
1.1.3. Boli provocate de protozoare	32
1.1.4. Boli provocate de ciuperci și mucegaiuri	36
1.2. PARAZIȚII ALBINELOR	39
1.2.1. <i>Acarapis woodi</i>	41
1.2.2. <i>Varroa</i> sp.	42
1.2.3. <i>Tropilaelaps clareae</i>	51

CAPITOLUL II

BAZELE GENETICE ALE REZISTENȚEI

ALBINELOR LA BOLI ȘI PARAZIȚI	53
2.1. MECANISME FIZIOLOGICE	55
2.2. MECANISME COMPORTAMENTALE	57
2.3. EVIDENȚIEREA COMPORTAMENTULUI IGIENIC LA <i>APIS MELLIFERA</i> L. ÎN STUPINE DIN TRANSILVANIA	69
2.3.1. Metode	69
2.3.2. Rezultate	71
2.4. MECANISME ANATOMICE	79

CAPITOLUL III

MARKERI MOLECULARI ASOCIAȚI CU REZISTENȚA

LA PARAZIȚI ȘI BOLI LA ALBINE	82
3.1. MARKERI PROTEICI	91
3.1.1. Izozimele	92
3.1.2. Alozimele	92
3.2. MARKERI ADN	94
3.2.1. Polimorfismele lungimii fragmentelor de restricție (RFLP)	95
3.2.2. Polimorfismele lungimii secvențelor simple (SSLPs)	98
3.3.3. Polimorfismul lungimii fragmentelor de ADN amplificate (AFLP)	110

3.3.4.	Polimorfismul ADN-ului amplificat la întâmplare (RAPD)	112
3.2.	UTILITATEA IMPLEMENTĂRII MARKERILOR LA MOLECULARI ÎN STUDIUL REZISTENȚEI BOLI ȘI PARAZIȚI LA <i>APIS MELLIFERA</i> L.	118
3.3.	GENE UTILIZATE ÎN STUDIUL COMPORTAMENTELOR COMPLEXE LA ALBINE	123

CAPITOLUL IV

	TEHNICI DE BIOLOGIE MOLECULARĂ UTILIZATE ÎN ANALIZA GENETICĂ LA ALBINE	129
4.1.	TESTAREA PROTOCOALELOR DE IZOLARE A ADN-ULUI DE LA ALBINA MELIFERĂ (<i>APIS MELLIFERA</i> L.)	134
4.1.1.	Protocolul propus de Hunt și col.	139
4.1.2.	Protocolul propus de Wilkes și Oldroyd	142
4.2.	TEHNICA REACȚIEI ÎN LANȚ A POLIMERAZEI – PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)	146
4.3.	VIZUALIZAREA PROBELOR	153
4.4.	APLICAȚII ALE PCR	156
4.4.1.	Tehnica SAGE	156
4.4.2.	Tehnica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – Polimorfismul fragmentelor de restricție)	162

4.4.3. Tehnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – Polimorfismului ADN-ului Amplificat la Intâmplare)	165
4.4.4. Tehnica AFLP (Amplified Length Polymorphism – Polimorfismul amplificat al lungimi fragmentelor de ADN)	171
4.4.5. Tehica RT – PCR (Reverse Transcriptase – PCR - Revers Transcripția – PCR)	182
Bibliografie	188



LISTA FIGURILOR

Figura 1. Relația dintre factorii de mediu și patologia necontagioasă la albine

Figura 2. Indivizii coloniei de albine, **a** - matcă, **b** - albină lucrătoare, **c** – trântor

Figura 3. Albină lucrătoare

Figura 4. Matcă înconjurată de albine lucrătoare

Figura 5. Ciclul de viață al parazitului *Varroa* sp.

Figura 6. Transmiterea comportamentului igienic la *Apis mellifera* L.

Figura 7. Structura defensinei la *Apis mellifera* L. (AA) cu evidențierea reziduurilor de cisteină cu grad înalt de conservare

Figura 8. Structura apidecinelor și abaecinei la *Apis mellifera* L. (AA) cu evidențierea reziduurilor cu grad înalt de conservare

Figura 9. Modul de acțiune intracelulară a polipeptidelor antimicrobiene

Figura 10. Localizarea zonelor de prelevare a probelor și testare a stării de sănătate a albinelor

Figura 11. Experiența crescătorilor de albine prezentată comparativ pe județele studiate (% din total apicultori chestionați)

Figura 12. Tipul de apicultură practicat, prezentat comparativ pe județele studiate (% din total apicultori chestionați)

Figura 13. Numărul de intervenții practicate, prezentat comparativ pe județele studiate (% din total apicultori chestionați)

Figura 14. Tratamentele practicate împotriva Varroa, prezentate comparativ pe județele studiate (% din total apicultori chestionați)

Figura 15. Celule descăpăcite, județul Alba

Figura 16. Celule descăpăcite, județul Bistrița – Năsăud

Figura 17. Celule descăpăcite, județul Cluj

Figura 18. Celule descăpăcite, județul Covasna

Figura 19. Celule descăpăcite, județul Harghita

Figura 20. Celule descăpăcite, județul Hunedoara

Figura 21. Celule descăpăcite, județul Mureș

Figura 22. Celule descăpăcite, județul Satu-Mare

Figura 23. Celule descăpăcite, județul Sălaj

Figura 24. Celule descăpăcite, județul Sibiu

Figura 25. Distribuția valorilor medii ale procentului de celule descăpăcite

Figura 26. Clasificarea markerilor moleculari utilizați în studiile de biologie moleculară aplicate la insecte

Figura 27. Exemplu de STS (Sequence-tagged Site) polimorfic

Figura 28. Transmiterea la descendenți a STS

Figura 29. Gelul de electroforeză al produșilor PCR ai STS polimorfici

Figura 30. Harta genomului circular la *Apis mellifera* L.

Figura 31. Plasarea probei în vederea cuantificării

Figura 32. Poziționarea probei pe parcursul cuantificării

Figura 33. Îndepărtarea probei după cuantificare

Figura 34. Schema de principiu a funcționării unui spectrofotometru în domeniul UV – VIS

Figura 35. Cantitatea de ADN (ng/μl) extrasă din probele analizate

Figura 36. Purity ADN-ului extras din probele analizate

Figura 37. Cantitatea de ADN (ng/μl) extrasă din probele analizate

Figura 38. Puritatea ADN-ului extras din probele analizate

Figura 39. Fragment de ADN din care se va amplifica gena B

Figura 40. Etapele PCR

Fig. 41. Sinteza produșilor „scurți” ai PCR

Figura 42. Principiul tehnicii SAGE (www.ergito.com)

Figura 43. Etapele SAGE (www.ergito.com)

Figura 44. Diagrama schematică a RAPD

Figura 45. Gelul obținut în urma amplificării ADN-ului polimorfic generat de primerul UBC-239

Figura 46. Harta de linkage la *Apis mellifera* L. alcătuită pe baza markerilor RAPD

Figura 47. Reprezentarea schematică a principiului AFLP

Figura 48. Principul RT – PCR



LISTA TABELELOR

Tabelul 1. Valorile medii și indicii dispersiei pentru procentul de celule descăpăcite în cadrul experimentului de testare a comportamentului igienic la albinele din stupinele studiate în județele din Transilvania

Tabelul 2. Kit-uri comerciale disponibile pentru utilizare în tehnicile moleculare folosite la *Apis mellifera* L. (după Loxdale și col., 1998)



INTRODUCERE

La fel ca orice organism viu, insectele sunt vulnerabile la acțiunea agenților patogeni, bacterii, fungi, virusuri, paraziți etc. Pentru insectele cu rol benefic în economia mediului a existat o preocupare continuă de-a lungul timpului în găsirea soluțiilor menite atât să reducă riscul la îmbolnăviri, dar și să crească sau intensifice rezistența naturală a unor specii sau populații din rândul acestora la atacul patogenilor. Pentru soluționarea acestei problematice complexe, în ultimele decenii, au câștigat tot mai mult teren abordările sistemice, care îmbină concepte ecopatologice cu cele de ordin genetic și de domeniul biologiei moleculare (http://www.lifescience-zurich.ch/focus1/material_method-en.asp).

Datorită atât unor considerente de ordin etologic cât și productiv *Apis mellifera* L. este poate cea mai importantă reprezentantă a clasei insectelor. Din acest motiv, prevenirea și combaterea bolilor albinelor constituie una dintre preocupările majore ale apicultorilor pe plan mondial. Atât mierea cât și produsele apicole secundare (polen, lăptișor de matcă, propolis, ceară) sunt bogate în factori nutritivi și au acțiune terapeutică valoroasă.

De asemenea, albinele sunt un important vector în procesul de polenizare al plantelor și ca urmare a progresului înregistrat de biotehnologii s-au obținut rezultate notabile chiar în transformarea lor în virtuali agenți de vehiculare al transgenelor provenite de la plantele modificate genetic (Dezmirean, D. și col., 2007; Rakosy-Tican, Elena, 2005)

În ceea ce privește ecopatologia, aceasta a devenit de mai bine de cinci decenii un concept familiar în soluționarea pe baze științifice a problemelor ridicate de patologiile multifactoriale frecvente în practicarea agriculturii intensive. Această abordare implică o pregătire atentă a stragiilor menite să asigure un management eficient al stării de sănătate a întregului ecosistem, gestionat prin intermediul unui grup de lucru competent alcătuit, ce include specialiști din diverse domenii (ex. ingineri, agricultori, medici veterinari, statisticieni etc.).

Prin interpretări statistice multidimensionale ale datelor colectate sunt găsite soluții optime ce includ atât identificarea cât și prevederea potențialilor factorilor de risc, care, luați în considerare în programele de sănătate aplicate fermelor vegetale și animale contribuie la soluții preventive și non-medicale în măsură să rezolve principalele probleme legate de starea de sănătate în agricultură (Faye B. și col., 1999).

Introducerea acestei abordări alături de diagnoza bazată pe metode moleculare în sistemele de creștere a albinelor se constituie într-o valoroasă oportunitate menită să deschidă calea pentru crearea de instrumente importante și mult mai eficiente comparativ cu cele tradiționale, pentru suportul decizional conceput pentru asigurarea stării de sănătate a stupului, simultan cu reducerea la minimum a demersurilor invazive a acțiunilor curative.

Pe baza acestor considerente, a crescut disponibilitatea ipotezelor care pot permite aprofundarea cunoștințelor despre maladiilor specifice familiilor de albine.

Bolile albinelor pot fi de natură necontagioasă sau contagioasă. Cele de natură necontagioasă au cauze fiziologice, pe când cele contagioase sunt provocate de diversitate largă de agenți patogeni de natură bacteriană, virală, micotică și/sau parazitară (Mărghițaș, L.Al., 2003).

Bolile necontagioase cel mai frecvent întâlnite la albine sunt: puietul răcit (boala apare primăvara în familiile slabe care au cuiburile nerestrânse și neîmpachetate), diareea albinelor (este în principal consecința consumului de hrană de calitate inferioară) și anomaliile mătcilor (apar ca rezultat al distrofiilor sistemului neuro-endocrin, sau sunt de natură congenitală).

Apariția și manifestarea acestora este frecvent asociată cu influența exercitată de mediu, ce are consecințe directe asupra stării fiziologice a albinelor (fig. 1). Condițiile de ecomediu sunt ilustrate de o varietate largă de factori, ce pot fi reprezentați de la climă și grad de poluare, până la sistemele de creștere și/sau tipul de alimentație practicate în apicultură.

Bolile contagioase reprezintă o amenințare mult mai severă asupra stării de sănătate a albinelor, comparativ cu cele necontagioase, în special datorită largii diversități a factorilor care le produc. Deși influența mediului asupra acestora este minoră, uneori condițiile climatice sau de practicare a apiculturii pot constitui factori favorizanți în atacul agenților bacterieni, virali, micotici sau parazitari.

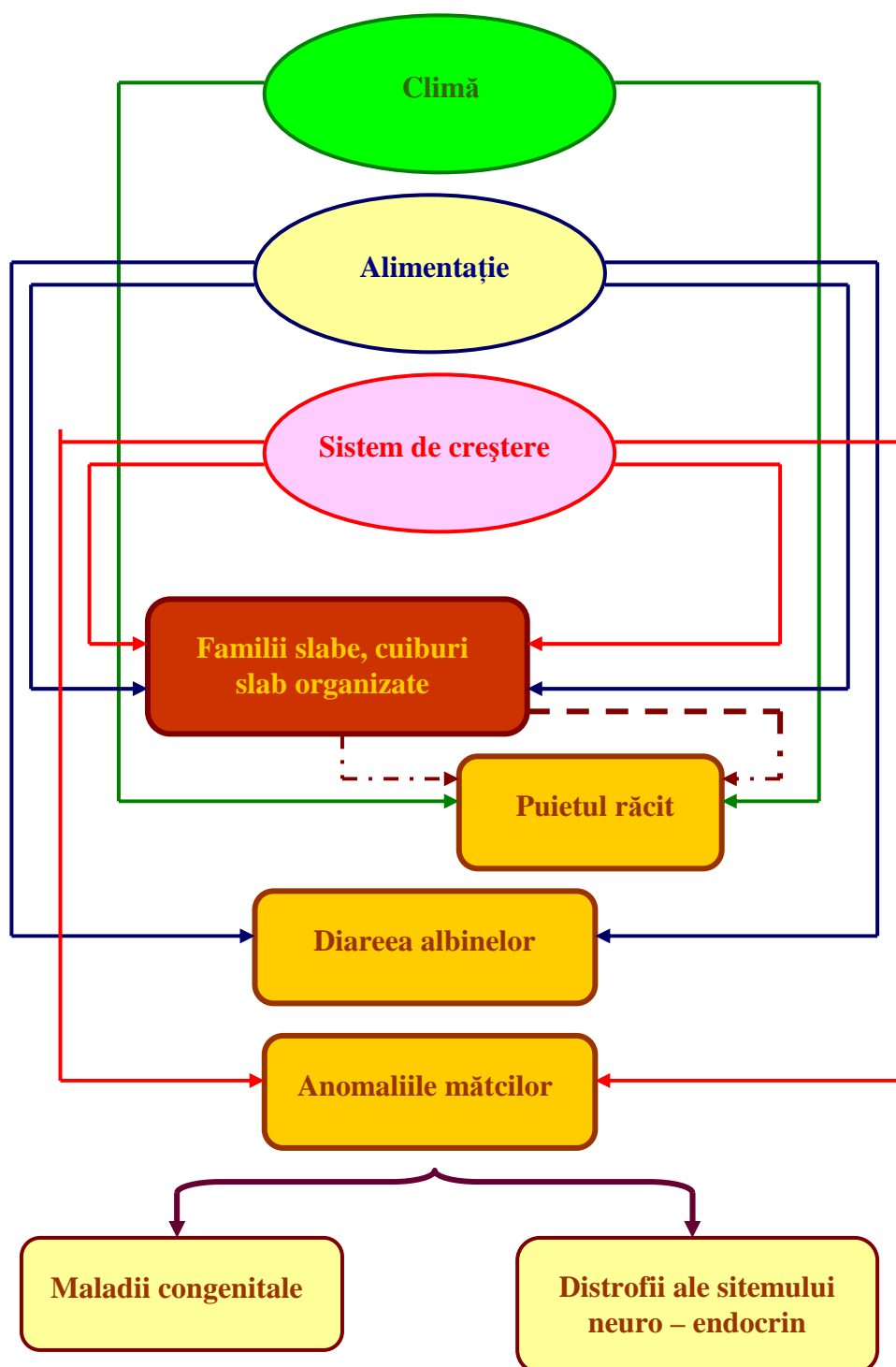


Figura 1. Relația dintre factorii de mediu și patologia necontagioasă la albine

Printre cei mai răspândiți agenți bacterieni ce produc boli contagioase la albine putem enumera: *Bacillus larvae* (loca americană), *Bacillus pluton*, *Bacillus alvei*, *Bacillus orpheus*, *Bacterium euridice*, *Streptococcus apis* (loca europeană), *B.apisepticus* (septicemia), *Bacillus paratyphi alvei* (paratifoza).

Boala puietului de albine – puietul în sac este provocată de **virusul** *Morator aetatule*, iar boala neagră, cunoscută și sub denumirile de boala de pădure sau paralizia are drept cauză tot un virus dar detalii referitoare la natura acestuia nu sunt încă pe deplin elucidate.

Cele mai frecvente **boli micotice** ale albinelor sunt: ascosferoza (boala puietului văros) provocată de *Ascosphaera apis*, aspergiloza (boala puietului pietrificat) provocată de *Aspergillus flavus* și uneori de *Aspergillus niger* și melanoza al cărei agent patogen este *Melanosella mors apis*.

Bolile parazitare sunt provocate de diverși paraziți care trăiesc pe corpul albinelor și care pe lângă faptul că se hrănesc cu hrana și/sau hemolimfa acestora sunt și agenți patogeni ai unor boli endo- sau ectoparazitare, în funcție de localizarea acestora. Dintre endoparazitoze amintim: nosemoza (provocată de protozoarul unicelular *Nosema apis*), amiboza (provocată de parazitul unicelular *Malphigamoeba mellifica*) și acarioza (provocată de acarianul *Acarapis woodi*). Bolile ectoparazitare sunt provocate de paraziți, iar dintre acestea cele mai des întâlnite sunt: brauloza (*Braula coeca*), varooza (*Varroa destructor*), senotainioza (*Senotainia tricuspis*) și triunghiulinoza (*Meloë verigatus* și *Meloë proscarabeus*).

Au fost identificate albine ce prezintă rezistență naturală la boli și paraziți. Astfel, experimente efectuate în SUA pe unele linii de albine provenite din Rusia, ce se presupunea că sunt rezistente la *Varroa destructor (jacobsoni)* au demonstrat faptul că acestea aveau exprimat cel puțin un mecanism de rezistență. La coloniile ce nu prezentau rezistență s-a înregistrat un grad de infestare a puietului de 65 – 75%, în timp ce albinele care se presupunea că prezintă rezistență la parazit au înregistrat rate de infestare considerabil reduse (Rinderer, T.E. și col., 1999)

Liakos, V. și col. (2002) a efectuat încercări de identificare a unor linii de albine care prezintă rezistență naturală la *Varroa destructor* în coloniile de *Apis mellifera macedonica*. În același timp se încearcă și obținerea unor linii de albine rezistente prin procese de selecție, în care rezistența este moștenită de la părinți la descendenți ca însușire aditivă (Lewy L. și col. 2003).

Numeroase programe de ameliorarea a populațiilor de albine în vederea măririi rezistenței acestora la boli au fost lansate și dezvoltate în întreaga lume.

Creșterea albinelor rezistente la acțiunea paraziților cu ajutorul programelor de selecție convenționale ce utilizează măci cu caracteristici dezirabile împerecheate cu trântori aparținând coloniilor selecționate au condus la rezultate promițătoare. O cale promițătoare de a obține prin selecție albine rezistente la boli și paraziți o constituie și selecția gameților proveniți de la masculi homozigoți, care s-a dovedit deja eficientă în procesele de selecție a albinelor în funcție de performanțele de producție (Jandrić, S.E. și col., 2003).

În acest context, biologia moleculară oferă importante mijloace de control și monitorizare a prezenței agenților patogeni, a paraziților și a bolilor provocate de acestea.

Identificarea locilor însușirilor cantitative asociate cu rezistența la boli și paraziți la albine are o deosebită importanță economică, pentru că oferă instrumentele necesare selecției indivizilor cu însușiri dezirabile și includerea lor în schemele de ameliorare a căror alcătuire este facilitată de selecția asistată de markeri (MAS – Marker Assisted Selection)

La albine, au fost utilizați markeri moleculari atât pentru identificarea relațiilor filogenetice dintre populații (Cameron, S.A., 2003), cât și în studiile de evidențiere completă a genomului (Crozier și col., 1993), caracterizarea unor regiuni intergenice în ADN-ul mitocondrial (Cornuet și col., 1991), și a unor secvențe de ADN cu un grad înalt de conservare (Tars, S. și col., 1993), pentru punerea în evidență a unei rate înalte de recombinare la nivelul locusului sexului (Beye, M. și col., 1999). Markerii genetici s-au dovedit a fi de o deosebită importanță și utilitate în procesele de selecție a albinelor rezistente la boli, cât și pentru studiul diversității paraziților, în vederea stabilirii structurii populaționale și a relațiilor taxonomice (Navajas, M. și col., 2000).

La populațiile de albine, unde variația alozimelor este relativ scăzută, se acordă importanță markerilor ADN care prezintă un polimorfism adecvat studiilor necesare identificării rezistenței la boli și paraziți în cadrul acestor populații. Acești markeri ADN pot prezenta fie variații ale situs-urilor de restricție, cum sunt markerii RAPD, fie variații ale lungimii, cum este cazul microsateliților (Rowe și col., 1997).

Multitudinea de markeri moleculari utilizați în entomologie poate fi inclusă în două mari categorii, markeri proteici și markeri ADN (Loxdale, H.D. și col., 1998). Dacă markerii moleculari sunt reprezentați de **izozime** (enzime cu funcții similare produse la loci diferiți) și **alozime** (pentru o enzimă dată, alozimele sunt produși ai diferitelor alele la un anumit locus), markerii ADN prezintă o mult mai mare variabilitate, în funcție de tehnicile în care aceștia își găsesc utilizarea.

Comparativ cu markerii proteici, izozimele și alozimele, markerii ADN utilizați la insecte (inclusiv la albine) sunt mai numeroși. Aceștia sunt:

- **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphisms) **Polimorfismele Lungimii Fragmentelor de Restricție**
- **SSLPs** (Simple Sequence Length Polymorphisms) **Polimorfismele Lungimii Secvențelor Simple**
 - Minisateliții sau **VNTRs** (Variable Number of Tandem Repeats)
Numărul Variabil al Repetițiilor în Tandem
 - Microsateliții
- **AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphisms) **Polimorfismul lungimii fragmentelor de ADN amplificate**
- **RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA) **Polimorfismul ADN-ului amplificat la întâmplare**

Importanța tuturor acestor markeri rezidă în posibilitatea utilizării acestora la alcătuirea hărților de linkage și a identificării locilor însușirilor cantitative, care au un rol decisiv în furnizarea de date utile în controlul rezistenței la boli și dăunători la populațiile de albine.



CAPITOLUL I

BOLILE ȘI PARAZIȚII ALBINELOR

Albina meliferă (*Apis mellifera* L.) este o insectă socială cu trei caste. Face parte din regnul **Animalia**, clasa **Insecta**, ordinul **Hymenoptera**, familia **Apidae**, genul **Apis**. O colonie de albine (fig. 2, 3, 4) constă din matcă (regină) - femela fertilă – (2.a, 4), câteva mii de lucrătoare - femele care nu au capacitatea de a se reproduce – (2.b, 3) și din câteva sute de trântori – masculi – (2.c).

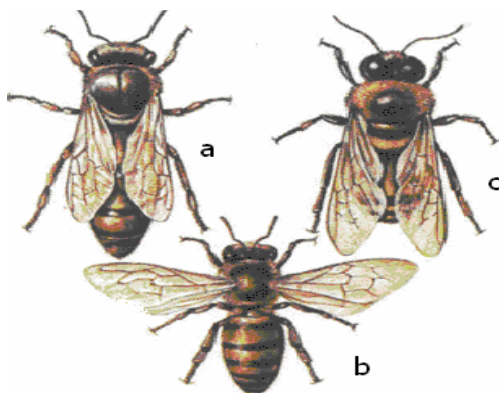


Figura 2. Indivizii coloniei de albine, **a** - matcă, **b** - albină lucrătoare, **c** – trântor
(www.liis.lv/kukaini/lkuk2.htm - *This image may be subject to copyright*)

Îndatoririle albinelor lucrătoare sunt diversificate pe parcursul vieții acestora, de la asigurarea curățeniei, clădirea fagurilor și hrănirea puietului, până la activitățile de hrănire a mătci.

De la vârsta de 15 zile asigură ventilația coloniei, paza și culegerea polenului. La începutul anului, o colonie de albine constă din regină și câteva sute de lucrătoare care au iernat (Mărghițaș, L. Al., 2003).

Pe măsură ce crește lungimea zilei, matca începe să depună ponta. În condiții normale, din ouăle fertilizate (diploide) se dezvoltă lucrătoare, iar din cele nefertilizate haploide, trântorii.



Figura 3. Albină lucrătoare
(www.uni-bayreuth.de/departments/toek1/fortner/ *This image may be subject to copyright*)



Figura 4. Matcă înconjurată de albine lucrătoare
(www.tuat.ac.jp/~ethology/Sasaki/queen-L.jpeg - *This image may be subject to copyright*)

Timpul de dezvoltare a lucrătoarelor și trântorilor de la stadiul de ou până la cel de adult este o caracteristică de castă și diferă mult. În medie, o lucrătoare se dezvoltă din ou până la stadiul de adult în 21 de zile, iar un trântor în 16 zile (Winston, 1987, citat de Denholm, C.H., 1999).

Tipul hranei administrate larvei diploide femele după vârsta de 3 zile va conduce la obținerea unei lucrătoare, sau regine. Inițial, toate larvele sunt hrănite cu lăptișor de matcă (secreție bogată în proteine a glandelor mandibulare și hipofaringiene a „doicilor”).

Larvele destinate a ajunge regine sunt hrănite cu cantități mai mari de lăptișor de matcă pe toată perioada existenței lor. După vârsta de 3 zile, larvele albinelor lucrătoare și ale trântorilor nu mai sunt hrănite cu lăptișor de matcă, ci cu nectar (care cu ajutorul enzimelor salivare este convertit în miere) și polen (Denholm, C.H., 1999).

1.1. BOLILE ALBINELOR

1.1.1. Boli provocate de viruși

Toate formele de viață sunt atacate de viruși, existând o foarte mare varietate a tipurilor acestora. Fiecare tip de virus are însă o gazdă specifică, sau un spectru foarte restrâns de gazde. Particulele virale constau dintr-un fragment de material genetic, ARN sau ADN, situat în interiorul unui înveliș proteic. Ele se înmulțesc doar în interiorul celulelor vii ale gazdei.

Cea mai mare parte a virușilor care atacă albinele au drept efect scurtarea vieții acestora. Aceștia produc boli grave sau chiar fatale, se înmulțesc și se răspândesc în organismele gazdă pe o perioadă îndelungată, fără a cauza semne aparente ale bolii pe care o provoacă. Această particularitate este caracteristică în cvasitotalitate bolilor provocate de viruși la albine.

Există diferite clasificări ale virușilor identificați la albine, toate realizate în funcție de relațiile filogenetice existente între aceștia. Pe baza metodelor ce utilizează secvențierea fragmentelor de ADN din genomul viral, s-a stabilit faptul că majoritatea virușilor identificați la albine sunt de tip „picorna” (E v a n s , J. D., și col., 2000).

Metode directe de control a virusurilor la albine nu au fost încă stabilite, diagnosticul precis al prezenței acestora fiind greu de stabilit.

Paralizia cronică

Deși această boală a fost descrisă încă de acum un secol, cauza sa a fost identificată abia în anul 1963. Inițial s-a considerat că parazitul *Acarapis woodi* ar fi cel care provoacă boala, abia ulterior demonstrându-se că aceasta este rezultatul acțiunii unui virus – **virusul paraliziei cronice**.

Acest virus este probabil întotdeauna însoțit de un virus „satelit” - virusul asociat al paraliziei cronice – a cărui acțiune nu se cunoaște cu exactitate, dar se pare că este implicat în mecanismele de apărare.

La albine acest virus „satelit” inhibă replicarea particulelor virale cu dimensiunile cele mai mari și cu capacitatea infectantă cea mai ridicată.

În cazul acestei boli se întâlnesc două tipuri de simptome. Primul este caracteristic așa numitei „boli a insulei Wight” identificată în Marea Britanie la începutul secolului XX și constă în pierderea capacității de zbor, dilatarea abdomenului, distanțarea aripilor însoțită de mișcări necoordonate.

Coloniile sever afectate adesea colapsează, în special la mijlocul sezonului de vară. Al doilea tip de simptome caracterizează așa numita boală neagră. Acestea sunt identice cu primele, dar în plus albinele își pierd învelișul pilos, având ca urmare corpul negru cu aspect unsuros.

Se presupune că apariția acestor două tipuri diferite de simptome cauzate de același virus se datorează diferențelor genetice dintre albine (Morse, R.A. & Florttum K., Eds., 1997).

Paralizia acută

Această boală este provocată de *virusul paraliziei acute* și afectează albinele adulte, în special pe perioada de vară. Inițial nu a fost asociat cu inducerea vreunei boli sau cu provocarea morții pentru că albinele infestate păreau sănătoase. Mecanismul inducerii bolii nu este încă elucidat, se știe doar că purtător al virusului ce o provoacă este parazitul *Varroa destructor (jacobsoni)*, ce acționează ca un vector de transmitere a lui la albine adulte, sau la puiet, așa cum demonstrează și observațiile efectuate în Europa, SUA și America centrală (Hung și col., 2000; Ball și col., 1988, Bailey și col., 1979; Shimanuki și col., 1994, citați de Morse, R.A. & Florttum K., Eds., 1997). Analize serologice au demonstrat prezența masivă a acestui virus în Ungaria (Bekesi, L. și col., 1999).

Pentru evidențierea acestuia sunt utilizate analize ale secvenței nucleotidice izolate din coloniile de albine infestate (Evans, J. D., 2002). Albinele adulte infectate pot constitui la rândul or focare de infecție pentru larvele tinere, prin secreția unor cantități mari de virus în hrana acestora.

Boala produsă de virusul albinelor din Kashmir (KBV)

KBV a fost inițial detectat la albinele adulte din Asia, *Apis cerana* (Bailey și Woods, 1977, citați de Morse, R.A. & Florttum K., Eds., 1997), dar ulterior a fost identificat și la *Apis mellifera* în Europa, Australia și America de Nord (Allen și col., 1995; Anderson, 1990; Bruce și col., 1995; Hung și col., 1995 citați de Hung, A.C.F., 2000). Acesta este un virus înrudit serologic cu virusul paraliziei acute, are o acțiune similară lui. Unii autori consideră că acesta

ar fi vehiculat de parazitul *Varroa destructor (jacobsoni)* (Hung A. C. și col., 1999). Pentru evidențierea KVB au fost utilizate inițial metode serologice (Hung A. C. și col., 1999), dar la momentul de față sunt utilizate analize ale secvenței nucleotidice izolate din coloniile de albine infestate (Evans, J. D., 2002, Hung, A.C. și col., 2002).

Spre deosebire de virusul paraliziei acute, toate tulpinile KBV sunt extrem de virulente, virusul se înmulțește rapid în hemolimfa albinelor adulte sau a puietului, producând moartea doar în trei zile.

Boala puietului în sac

Virusul care provoacă această boală este *Morator aetatule*, fiind unul dintre primele virusuri detectate la albine. Organizarea genomică a virusului este similară membrilor familiei *Picornaviridae*, cu gene structurale la capătul 5' și gene nestructurale la capătul 3' (Ghosh, R. și col., 1999, citat de Grabensteiner, E. și col., 2001).

Virusul se înmulțește rapid în mai multe țesuturi larvare, iar larvele par să aibă o dezvoltare normală până după căpăcire. Apoi devin galbene, cenușii sau brune, cu capul de culoare mai închisă decât corpul, sunt întoarse complet cu partea ventrală în sus și cea dorsală se sprijină pe pereții inferiori ai celulei luând aspectul unor saci cu lichid. Acest lichid care conține milioane de particule virale este situat între corpul larvei și pereții celulei. Larvele mor apoi curând, se usucă și primesc o colorație maro închis. Virușii existenți în larvele moarte își pierd repede capacitatea de a infecta noi indivizi, în special pe timpul iernii. Pericolul de infestare este mai

mare la lucrătoarele tinere pe perioada în care curăță celulele fagurilor. Se pare că trântorii, care niciodată nu mănâncă polen nu sunt afectați de acest virus.

La vârsta de două zile larvele sunt cel mai susceptibile la acțiunea virusului. Perioada de vârf a infestării este cea de la sfârșitul primăverii și începutul verii. Este interesant de observat faptul că efectele virusului puietului în sac sunt identice cu cele produse de anestezia rapidă cu CO₂.

Malformația aripilor

Este o anomalie produsă de un virus, numit ***virusul ce produce malformația aripilor***, care a fost inițial identificată la *Apis mellifera* din coloniile infestate cu *Varroa destructor (jacobsoni)* în Japonia. Albinele din coloniile infestate au aripile slab sau foarte slab dezvoltate. Virusul are o perioadă îndelungată de înmulțire. În cazul infestării ouălor, la scurt timp după eclozionare larvele mor, la puiet moartea se produce în stadiile de dezvoltare timpurie, iar dacă infecția se produce la albinele adulte, acestea nu prezintă malformații, dar moartea se produce. Se pare că virusul produce mortalitate și în coloniile neinfestate cu *Varroa destructor (jacobsoni)*, iar mecanismul său de transmitere este similar cu ce întâlnit la virusul paraliziei acute (Ball, 1989, citat de Morse, R.A. & Flottum K., Eds., 1997). Cercetări similare efectuate în Anglia de Bowen-Walker și col. (1998) și de van Oers și col. (2000) în Olanda confirmă rolul de vector pe care îl are *Varroa destructor (jacobsoni)* în transmiterea virusului ce provoacă malformația aripilor la albine (DWV – deformed wing virus). Cu toate acestea, pentru a cauza boala virusul trebuie să se găsească peste o anumită concentrație în pupele albinelor infestate (Bowen – Walker și col., 1998).

Boala produsă de virusul albinelor din Egipt

Această boală este întâlnită doar în Egipt și este produsă de un virus denumit ***virusul albinelor din Egipt***, despre care însă nu se cunoaște nimic nici în privința apariției sale și nici detalii despre mecanismele sale de acțiune (Bailey și col., 1979 citați de Morse, R.A. & Flottum K., Eds., 1997).

Paralizia lentă

Virusul paraliziei lente este responsabil de producerea acestei boli. Indivizii infestați mor la 12 zile de la inducerea experimentală a bolii prin injectarea virusului în hemolimfă, iar cu două zile înainte de colaps se produce paralizia celor două perechi de membre anterioare. Recent s-a descoperit ca acest virus este letal în coloniile infestate cu *Varroa destructor (jacobsoni)*, dar nu se cunosc încă date referitoare la istoricul bolii sau la răspândirea acesteia (Morse, R.A. & Flottum, K., 1997).

Boala produsă de virusul celulei negre a mătcii

Virusul celulei negre a mătcii constituie cauza morții larvelor de matcă după închiderea în celule. Este un virus de tip „picorna” și a fost inițial izolat de la albinele din Africa de Sud (Leat, N. și col., 2003). Pereții celulelor devin maro închis sau negri. Larvele bolnave au o colorație galben pal semănând cu cele infestate de virusul ce provoacă boala puietului în sac. Adesea, virusul este prezent la albinele infestate cu *Nosema apis* (Allen și col., 1993 citați de Benjeddou, M. și col., 2002). Există încercări de manipulare a genomului acestui virus în vederea exploatării potențialului acestuia ca vector viral și

utilizarea lui în experimente conduse cu scopul aprofundării cunoștințelor despre PMS la albine (Benjeddou, M. și col., 2002).

Boala produsă de virusul filamentos

Virusul filamentos a fost inițial identificat în SUA (Clark, 1978, citat de Morse, R.A. & Florttum K., Eds., 1997). El se înmulțește în corpul gras și în țesutul ovarian al albinei adulte. La indivizii care prezintă infestare severă, hemolimfa devine de culoare albă lăptoasă, acesta fiind singurul simptom cunoscut al acțiunii virusului.

Boala produsă de virusul Y al albinelor

Virusul Y al albinelor se înmulțește doar când este introdus în organism odată cu hrana. Nu se cunosc detalii despre acesta și nici despre simptomele infecției.

Virusul celulei negre a mătcii, cel filamentos și virusul Y al albinelor se înmulțesc în organismul albinelor adulte atunci când acestea sunt infestate cu protozoarul *Nosema apis* (Morse, R.A. & Florttum K., Eds., 1997).

Boala produsă de virusul X al albinelor

Această boală este produsă de un virus înrudit serologic cu virusul Y al albinelor și denumit *virusul X al albinelor*, fiind aproape imposibil de separat de acesta pe cale fizică sau chimică. Spre deosebire de virusul Y, virusul X al albinelor nu este asociat cu *Nosema apis*, dar s-au găsit uneori asocieri între acesta și

protozoarul *Malpighamoeba mellificae*. Virusul se răspândește predominant prin fecalele contaminate. Prezența sa în albinele deja contaminate cu *M.mellificae* accelerează moartea acestora (Morse, R.A. & Flottum K., Eds., 1997).

Boala produsă de virusul aripilor opace

Infestarea albinelor cu *virusul aripilor opace* devine vizibilă în momentul în care aripile acestora devin opace. Diagnoza precisă a acestei boli poate fi stabilită doar serologic. Virusul se înmulțește în capul și toracele indivizilor infestați.

Prezența acestuia conduce la scurtarea vieții, iar coloniile cu infestare masivă devin inactive după care colapsează la scurt timp (Morse, R.A. & Flottum K., Eds., 1997).

Boala produsă de virusul *Apis iridiscent*

Virusul Apis iridiscent este un iridiovirus asociat cu „boala clusterelor” identificată în India la *Apis cerana*. Infestarea cu acest iridiovirus conduce la inactivitatea coloniilor în principal vara, colapsul producându-se la un interval de circa două luni de la infestare.

Se înmulțește în diferite țesuturi: corpul gras, tractusul alimentar, glandele hipofaringiene și ovarele albinelor (Morse, R.A. & Flottum K., Eds., 1997).

Boala produsă de virusul albinei din Arkansas

Virusul ce produce această boală - *virusul albinei din Arkansas*, a fost inițial identificat în Arkansas la albine aparent sănătoase, fără a se cunoaște detalii despre acesta. Nu a fost întâlnit în afara granițelor SUA.

În California, L o m m e l și col., 1985 (Morse, R.A. & Flottum, K. Eds., 1997) a întâlnit un virus asemănător pe care l-au denumit *virusul Berkley al albinelor*, dar nu se cunoaște încă dacă acesta este identic cu virusul albinelor din Arkansas (M o r s e , R.A. & F l o r t t u m K., Eds., 1997).

1.1.2. Boli provocate de bacterii

Datorită pierderilor economice considerabile pe care acestea le produc apicultorilor, bolile provocate de bacterii au fost cele mai studiate boli ale albinelor.

Loca americană

White în 1907 (Morse, R.A. & Flottum, K. Eds., 1997) a fost primul care a demonstrat faptul că loca americană este rezultatul infestării cu bacteria sporulată *B.larvae*. Este foarte contagioasă și dacă nu este tratată la timp și corespunzător poate conduce la dispariția întregii colonii, răspândindu-se și la alte stupini.

Această boală este una dintre cele mai grave boli ale albinelor în întreaga lume, agentul patogen fiind *Bacillus larvae*.

Cadavrele larvelor infestate reprezintă sursa de infecție. Albinele lucrătoare încercând să elimine din stup larvele infestate și moarte, preiau sporiile bacteriei pe piesele bucale, picioare și corp, devenind agenți infectanți. Contaminarea se face pe cale bucală, începând cu a doua zi a stadiului larvar când puietul începe să fie hrănit de către albine. Cel mai frecvent, boala se transmite de la un stup la altul prin intermediul albinelor hoațe, sau prin achiziționarea necontrolată a unor familii de albine sau măci.

Deși la indivizii adulți infestarea este greu de identificat, diagnosticul poate fi stabilit prin examinarea puietului infestat. Larvele au culoare galben – maronie și miros similar cu cel al cleiului de oase. Cel mai frecvent larvele mor după căpăcire, căpăcelele fiind perforate și concave. Cadavrul larvei se deshidratează și aderă la peretele celulei cu care formează un corp comun.

Loca europeană

Această boală este considerată de majoritatea apicultorilor mai puțin gravă decât loca americană.

Deși a fost studiată încă de la sfârșitul secolului al XVIII-lea (Schirach, 1771 - în Honey Bee Pests, Predators, and Diseases, 45, Morse, R.A. & Flottum, K. Eds., 1997) detaliile referitoare la această boală nu sunt încă elucidate.

Agentul patogen este *Melissococcus pluton*, o bacterie care inițial a fost cunoscută sub denumirile de *Bacillus pluton* și *Streptococcus pluton*. Este răspândită pe tot globul, apare primăvara timpuriu până toamna. Contaminarea se face pe cale bucală, prin consumul de hrană infestată, iar răspândirea în principal prin albinele hoațe și trântori.

Boala este dificil de depistat la început. Larva devine la începutul îmbolnăvirii mai transparentă, corpul se înmoaie, își schimbă poziția, devine gălbui, iar la 3 – 4 zile de la infestare larvele mor și se descompun. În locul acestora apare un lichid opalescent care devine cafeniu și vâcos.

Când boala apare la puietul căpăcit, căpăcelele celulelor se adâncesc și devin mai închise la culoare.

În 1984, Pinnock și Featherstone (citați de Morse, R.A. & Florttum K., Eds., 1997) au arătat că testul ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) poate fi utilizat cu succes în identificarea *Melissococcus pluton*, punând astfel în evidență existența bolii încă din stadiile timpurii când coloniile infestate par sănătoase.

Septicemia

La albine, septicemia este o boală bacteriană a albinelor adulte descrisă pentru prima dată de Burnside încă de la începutul secolului XX (în Honey Bee Pests, Predators, and Diseases, 51, Morse, R.A. & Flottum, K. Eds., 1997). Boala este provocată de *Bacillus apisepeticus*, bacterie reclasificată în anul 1959 de către

Landerkin și Katznelson (în Honey Bee Pests, Predators, and Diseases, 51, Morse, R.A. & Flottum, K. Eds., 1997) ca *Pseudomonas apiseptica*. Aceasta este o bacterie nesporulantă gram-negativă. Contaminarea se produce pe cale respiratorie, agentul patogen pătrunde în hemolimfă care are un aspect lăptos și mobilitate redusă. În hemolimfă se înmulțește și în final produce moartea, la 20 – 30 ore după infestare.

Boala este favorizată de condiții necorespunzătoare de întreținere, mai ales locuri umbroase și răcoroase. Se pot înregistra vindecări spontane atunci când cauzele care au favorizat apariția acesteia dispar.

Paratifoza

Această boală este tot o boală a albinelor adulte favorizată de condițiile nefavorabile de întreținere. Agentul patogen este *Bacillus paratyphi alvei*. Contaminarea se face pe cale bucală prin intermediul apei infestate. Albinele infestate își pierd capacitatea de zbor, au abdomenul inflammat, prezintă diaree după care intervine moartea. Boala poate fi confundată cu nosemoza și acarioza și pentru stabilirea unui diagnostic corect trebuie utilizat examenul microscopic.

Boala produsă de *Bacillus pluvifaciens*

Este o boală întâlnită destul de rar, probabil datorită faptului că nu este ușor de identificat (Morse, R.A. & Flottum, K. Eds., 1997). Este produsă de

Bacillus pluvifaciens, o bacterie sporulată gram-pozitivă. Ea afectează doar larvele albinelor, iar etiologiei ei nu este încă elucidată.

Boala produsă de spiroplasma

Spiroplasma sunt bacterii din clasa *Mollicutes*. Clark, 1977b, 1978 (citată de Morse, R.A. & Flottum, K. Eds., 1997). a descoperit în SUA o specie aparținând acestei clase, letală pentru albine. Nu se cunosc detalii referitoare la boală.

Boala produsă de *Rickettsia*

Rickettsia este o bacterie gram-negativă care are acțiune parazitară intracelulară. La albine au fost identificate puține cazuri de îmbolnăviri produse de această bacterie (Poltev și col., 1967 în Rusia, Wille 1964b, 1966, 1967 în Elveția, Wille 1964b în Germania). Cercetări efectuate după 1970 aduc în discuție natura virală (Clark, 1977a, 1978) sau bacteriană (Bailey, 1981) a speciei, însă acest aspect nu a fost încă elucidat.

1.1.3. Boli provocate de protozoare

Protozoarele sunt organisme unicelulare cu acțiune patogenă asupra insectelor, cauzându-le infecții cronice care pot fi sau nu letale pentru gazda infestată.

La albine nu se cunosc semne clinice în cazul infestării cu protozoare, de aceea diagnosticul poate fi stabilit doar prin examen microscopic.

Deși s-au efectuat multe studii referitoare la protozoarele care infestază albinele și la bolile pe care acestea le produc, sunt încă multe necunoscute cu privire la genetica și ciclul de viață al protozoarelor (Morse, R.A. & Flottum, K. Eds., 59, 1997).

Nosemoza

Boala este produsă de protozoarul *Nosema apis*. Acesta infectează celulele epiteliale ale peretelui intestinal al albinelor unde se înmulțește, împiedicând digestia și asimilarea hranei. Agentul patogen are două forme, vegetativă și sporulată. În forma vegetativă se multiplică în ventricul, care devine în întregime infestat în două săptămâni de la contaminare (Fries și col., 2003). Forma sporulată apare după moartea albinelor, sau când protozoarul este eliminat în mediul exterior, unde rezistă timp îndelungat, iar când ajunge din nou în organismul albinei se transformă în formă vegetativă.

Contaminarea se face pe cale bucală, prin consumul de apă sau hrană infestată. Boala se poate transmite și prin contact direct între matca infestată și albinele care o îngrijesc, sau mai ales primăvara în timpul curățirii fagurilor infectați.

Familiile infestate prezintă o activitate redusă primăvara. Albinele bolnave prezintă diaree, au abdomenul umflat, își pierd capacitatea de zbor, tremură, paralizează și apoi mor.

Îmbolnăvirea cu *Nosema* conduce la scăderea producției de miere și la pierderi mari în timpul iernii, în ciuda lipsei unor evidențe clare ale instalării bolii.

Amoeboza

Boala a fost identificată în 1916 de către Maassen care observat prezența unor chiști amoebici în tubii Malpighi ai albinelor infestate. Această amoebă a fost denumită *Malpighamoeba mellificae* (Prell, 1962b, citat de Morse, R.A. & Florttum K., Eds., 1997). Acest protozoar este răspândit în toate continentele dar are o frecvență mai redusă de cât *Nosema apis*.

Trântorii și mătcile sunt foarte rar infestate. Boala se transmite prin chiștii de *Malpighamoeba mellificae* din depozitele de fecale, mai ales primăvara când albinele curăță fagurii.

Nu se cunosc simptome clare ale infestării cu acest protozoar. Diagnosticul poate fi stabilit doar prin examenul microscopic, atunci când se observă prezența chiștilor în amoebici tubii Malpighi. Celulele epiteliale ale tubilor infestați se aplatizează și vor fi consumate de către parazit.

De asemenea, prezența *Malpighamoeba mellificae* cauzează disfuncții ale reglării osmozei la albinele infestate.

Boala provocată de gregarine

Gregarinele sunt protozoare ce formează o clasă mare care cuprinde peste 1500 de specii (Levine, 1982, citat de Morse, R.A. & Florttum K., Eds., 1997).

Unele dintre acestea au fost identificate în tractusul intestinal al albinelor, atacând epiteliul stomacului.

Speciile identificate la albine nu sunt specifice pentru această gazdă (Wallace, 1966, citat de Morse, R.A. & Florttum K., Eds., 1997) dar pot proveni din nectarul cules, sau din apă, ori chiar prin contaminare de la alte insecte.

Deși pot produce modificări patologice în celulele pe care le atacă, gregarinele nu produc efecte negative majore în coloniile pe care le atacă. Climatul cald se pare că este favorabil răspândirii bolii, fiind identificată în SUA și America Latină.

Boala provocată de *flagellate*

Flagellatele sunt protozoare nesporulate ce posedă flagel, pseudopode, sau ambele mijloace de locomoție. La albine au fost identificate flagellate din clasa *Kinetoplastida*, care au formă alungită și prezintă flagel.

În intestinul albinelor a fost identificată prezența *Leptomonas apis* (Lotmar, 1946, citat de Morse, R.A. & Florttum K., Eds., 1997) care produce semne vizibile ale prezenței sale atacând peretele intestinal în regiunea pilorică, dar nu există nici o dovadă că prezența acestora ar cauza vreo stare patologică.

1.1.4. Boli provocate de ciuperci și mucegaiuri

Ciupercile și mucegaiurile sunt organisme saprofite frecvent întâlnite atât în faguri, cât și la albine. Bolile pe care acestea le produc la albine, micozele, sunt boli infecto – contagioase și evoluția lor este influențată de condițiile de mediu.

Ascosferoza (Puietul văros)

Puietul văros este o micoză ce atacă larvele albinelor. Ea este cauzată de *Ascosphaera apis*, o ciupercă ce are micelii de ambele sexe.

Boala are o răspândire largă peste tot în lume și apare în lunile aprilie – mai. Primele observații privitoare la boală au fost efectuate în 1913 de către Maassen în Germania (Lotmar, 1946, citat de Morse, R.A. & Florttum K., Eds., 1997).

Contaminarea se face pe cale bucală prin intermediul albinelor care igienizează stupul și care vin în contact cu albinele sănătoase. Umiditatea și temperatura ridicată favorizează apariția bolii.

În primul rând este atacat puietul de trântori, pentru că de obicei acesta se află la periferia fagurilor, unde umiditatea este mai mare și temperatura mai scăzută, extinzându-se mai apoi și la restul puietului de albine.

Larvele infestate se înnegresc, își pierd segmentația, pielea se asprește, iar corpul se acoperă cu un miceliu alb. Larva moare, iar în urma evaporării apei se usucă, având aspect mumificat și devine asemănătoare unor pietricele de var.

Boala provocată de mucegaiul polenului

Această micoză este produsă de ciuperca saprofită *Bettsia alvei* care acționează asupra polenului depozitat în celulele fagurelui. Are o răspândire largă în Europa și Noua Zeelandă. Boala nu atacă puietul. Ea poate fi confundată cu ascosferoza, dar spre deosebire de aceasta apare iarna. Infestarea coloniilor cu această ciupercă nu constituie o problemă gravă, neproducând maladie gravă sau moartea.

Aspergiloza (puietul pietrificat)

Aceasta este o boală rară și apicultorii o considerau de importanță minoră, dar ulterior s-a dovedit a fi foarte periculoasă, fiind transmisibilă și omului căruia îi atacă mucoasele oculare și pe cele ale aparatului respirator. Este răspândită în stupinele de pe toate continentele.

Boala este provocată de specii de ciuperci aparținând genului *Aspergillus*. Cel mai frecvent boala este produsă de *Aspergillus flavus*, dar ocazional este produsă și de *A.fumigatis* și *A.niger*. Sunt atacate larvele, nimfele și albinele adulte.

Contaminarea cu *Aspergillus* se produce mai frecvent după un cules abundent de polen, când datorită netasării corespunzătoare ciuperca îl infestează, boala fiind agravată de acțiunea factorilor negativi de mediu. Primele semne ale infestării

sunt reprezentate de neliniște, după care albinele prezintă mișcări anormale, paralizează și în final mor.

Larvele infestate cu *Aspergillus* se deshidratează, au o consistență dură (de aici numele de puiet pietrificat), devin gălbui, sau galben – verzui.

Nu se cunoaște cu exactitate modalitatea de răspândire a bolii, dar se presupune că aceasta s-ar extinde prin intermediul schimbului de rame pe care îl realizează crescătorii, adică prin ramele provenite din coloniile bolnave și ajunse în cele sănătoase.

Giauffret și Taliercio (1967) (citați de Morse, R.A. & Florttum K., Eds., 1997) au evidențiat posibilitatea ca boala să fie legată și de administrarea antibioticelor, care modifică echilibrul florei intestinale normale la albine, precum și de influența unor factori de mediu (umiditate, lipsa ventilației, o hrană cu un conținut prea mare de apă etc.), sau genetici care favorizează apariția bolilor produse de fungi.

Melanoza

Este o boală ce afectează sistemul reproducător al mătcilor, producând sterilitate. Boala a mai fost denumită H – melanoză (de la cuvântul german Hefe care înseamnă drojdie) pentru a fi deosebită de B – melanoza care este produsă de o bacterie. Nu se cunosc detalii despre incidența naturală a bolii.

Agentul patogen care produce H – melanoza este *Melanosella mors apis*. Se pare că acesta intră prin orificiul vaginal în oviducte și ovare unde produce melanoza, adică o colorație neagră.

Punga cu venin și glandele veninoase ale albinelor sunt de asemenea afectate, prezentând inflamații negre extinse, care exercită presiune asupra oviductelor, iar ouăle sunt pierdute, matca devenind sterilă (Fyg, 1964, citat de Morse, R.A. & Florttum K., Eds., 1997).

1.2. PARAZIȚII ALBINELOR

Paraziții albinelor aparțin clasei *Arachnida*, subclasa *Acari*, având următoarele caracteristici: patru perechi de picioare segmentate, un corp nesegmentat, iar cavitatea bucală alcătuită din două părți, papilele senzoriale și chelicerele ascuțite.

Stupul de albine reprezintă un habitat potrivit pentru o largă diversitate de paraziți. Au fost identificate peste 86 de specii de paraziți în habitatul albinelor (de Jong și col., 1982b, citați de Morse, R.A. & Florttum K., Eds., 1997). Aceștia pot fi clasificați în patru categorii (Eickwort, 1988, citat de Morse, R.A. & Florttum K., Eds., 1997):

- **paraziți „vidanjori”** care se hrănesc cu resturile din stup (bucăți vechi de faguri cu miere, resturi de albine moarte, fungi etc.) și care invadează proviziile de hrană depozitate. Aceștia sunt paraziți globulari cu mișcări lente, corp de culoare deschisă și membrele de culoare închisă. Din această categorie fac parte *Glycyphagus sp.*, în speță

Glycyphagus domesticus care se hrănește exclusiv cu fungii din stup, *Acarus* sp. în special *Acarus siro* și *Acarus immobilis* care se hrănesc atât cu fungi cât și cu alte resturi de natură organică, precum și *Tyrophagus* sp. *Tyrophagus putrescentiae*, *Tyrophagus longior* și *Tyrophagus palmarum*. Deși se găsesc în număr mare, acești paraziți nu aduc prejudicii coloniilor sănătoase, neconstituind un pericol pentru acestea.

➤ **paraziți prădători** care se hrănesc cu paraziții „vidanjori”, se găsesc în cea mai mare parte în resturile din stup. Cu mici excepții, aceștia nu au drept habitat stupul, dar se află acolo unde organismele pe care le atacă își procură hrana. Majoritatea aparțin subordinului *Mesostigmata*, fiind paraziți cu mișcări rapide și corp aplatizat. Cei mai des întâlniți aparțin familiilor *Ascidae*, *Macrochelidae* și *Parasitidae*. Cea mai mare parte pot fi observați cu ochiul liber și nu aduc nici un prejudiciu albinelor și/sau puietului.

➤ **paraziți foretici**, care se instalează pe albine cu scopul de a ajunge la locul din care acestea își procură hrana (flori, stupi). Cei mai răspândiți aparțin genului *Neocypholaelaps*. Aceștia se atașează într-un anumit stadiu al dezvoltării lor de o insectă adultă proaspăt apărută pentru a fi transportați într-un cuib nou.

➤ **paraziți care parazitează albinele adulte și puietul lor**. Aceștia reprezintă cea mai importantă categorie de paraziți datorită efectelor lor dăunătoare atât asupra albinelor adulte cât și asupra puietului. *Varroa*

destructor și *Acarapis woodi* sunt paraziții cu cele mai serioase efecte asupra albinelor și puietului, atât datorită acțiunii lor parazitare propriu-zise cât și datorită bolilor pe care aceștia le vehiculează. Aici trebuie amintiți și paraziții aparținând genului *Tropilaelaps* (*T. clareae* și *T. koenigerum*), dar a căror acțiune este restrânsă la perimetrul Asiei. Mai există și alte specii de paraziți caracteristici altor gazde și care doar accidental parazitează albinele. Din această categorie fac parte cei aparținând *Piemontes* sp. (*Piemontes ventricosus*, *Piemontes anobii* și *Piemontes tritici*), care sunt paraziți polifagi ai larvelor insectelor și care invadează albinele doar ocazional.

Dintre categoriile de paraziți mai sus menționate doar trei produc mortalitate masivă în familiile de albine, respectiv *Varroa destructor* (*jakobsoni*), *Acarapis woodi* și *Tropilaelaps clareae* în Asia.

Toți fac parte din categoria celor care parazitează albinele adulte și puietul lor.

1.2.1. *Acarapis woodi*

Apicultorii din întreaga lume se confruntă cu pierderi masive datorită bolii produse de invazia acestui parazit, care mai poartă numele de „parazit al traheilor” datorită faptului că se hrănește și e reproduce în traheea albinelor.

Este un parazit cu dimensiuni microscopice, corp oval, segmentat și opt picioare. Femelele au o lungime de 143 – 174 μm și o lățime de 77 – 88 μm , în timp ce masculii sunt de dimensiuni mai reduse, 125 – 136 μm lungime și 60 – 77 μm lățime.

Atât adulții, cât și larvele și ouăle lor au ca habitat sistemul respirator al albinelor. La nivelul primei perechi de stigme toracice care se deschide într-o mică excavație în depresiunea mezotoracelui femelele depun ouăle, producând până la 20 de descendenți, care ajung la maturitate după circa 11 – 12 zile masculii și 14 – 15 zile femelele. În mod obișnuit acarienii produc doar o generație în aceeași gazdă. Acest acarian infestează atât albinele lucrătoare cât și mătcile și trântorii

(Pettis și col., 2003), deși trântorii datorită tuburilor traheale mai largi sunt infestați preferențial (Dawicke, 1991, citat de Morse, R.A. & Florttum K., Eds., 1997).

Contaminarea se face prin intermediul albinelor hoațe, a trântorilor, mătcilor și roiurilor infestate. Albinele parazitare își pierd capacitate de zbor, cad în fața urdinișului, abdomenul este dilatat, iar corpul prezintă tremurături. Aripile au mișcări nesincronizate și sunt îndepărtate.

La o infestare masivă, traheile își schimbă culoarea, din alb sidefiu devenind mate, galben – castanii și apoi negre. Coloniile cu un grad ridicat de infestare sunt mai slăbite și produc mai puțin puiet (Scott-Dupree și Otis, 1988, citați de Morse, R.A. & Florttum K., Eds., 1997).

Există o serie de tratamente în combaterea acestui parazit, cele mai utile dovedindu-se acelea pe bază de mentol (Tew, J.E., 2003).

1.2.2. Varroa sp.

Datorită efectelor sale extrem de nocive și răspândirii largi *Varroa destructor* (*jacobsoni*) constituie o problemă majoră pentru apicultorii din întreaga lume. *Varroa* sp. este un parazit ce face parte din regnul **Animalia**, încrengătura **Arthropoda**, Clasa **Arachnida**, Ordinul **Acari**, Familia **Parasitidae**, Genul **Varroa**, Specia *destructor* (Walker, K.L. și col., 1997).

Cercetările efectuate în ultimii zece ani au demonstrat faptul că *Varroa* reprezintă nu numai o specie (Anderson, D., 2000), iar în Europa, efectele dăunătoare produse de *Varroa jacobsoni* se datorează de fapt speciei *Varroa destructor* (Anderson, D., 2000; Delaplane, K. și col., 2005).

Inițial *Apis cerana*, albina asiatică, a fost gazda parazitului. Se pare că *Varroa destructor* (*jacobsoni*) a început să infesteze *Apis mellifera* doar în ultima sută de ani, odată cu pătrunderea ei în Asia, adaptându-se la noua gazdă. Doar două tulpini ale parazitului *Varroa destructor* au devenit paraziți ai albinei europene (*Apis mellifera* L.) peste tot unde este prezentă (Anderson, D., 2000).

Este un parazit extern care poate fi observat cu ochiul liber. Femela are o lungime de 1,1 – 1,2 mm și 1,5 – 1,6 mm lățime, de culoare maro-roșcată, corpul transversal oval, aplatizat. Masculul, de culoare alb cenușie, are dimensiuni mai reduse, cu lățime și lungime de aproximativ 0,7 mm (<http://MAAREC.cas.psu.edu,2000>, <http://www.beekeeping.com/vita/bdiseases/varroam.htm>, 2003, <http://www.main.org/cahbs/varroam.htm>, 2003).

Masculii se dezvoltă din ouă nefertilizate și mor după împerechere, iar femelele din ouă fertilizate. Femela se fixează atât pe abdomen cât și pe torace și membre (fig. 5).

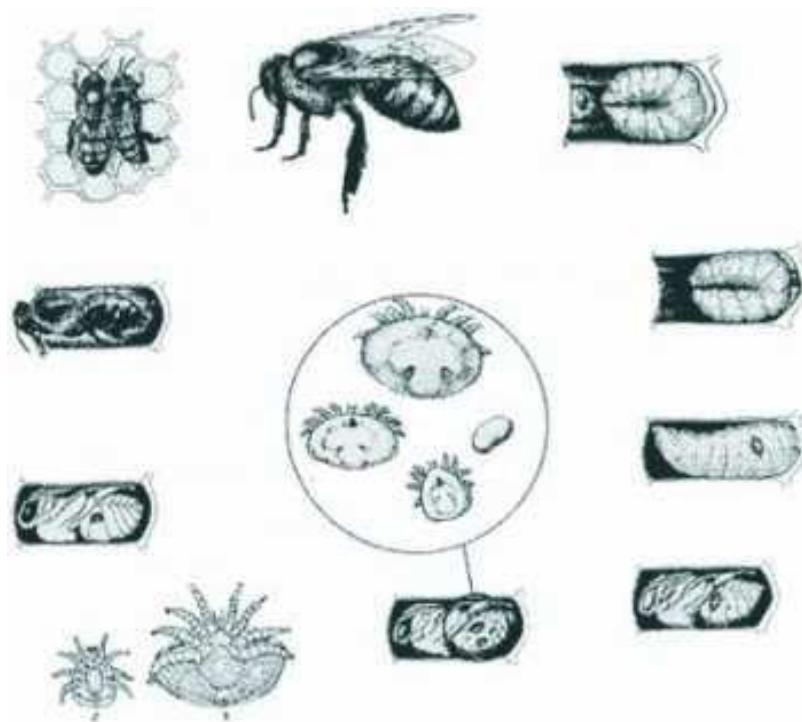


Figura 5. Ciclul de viață al parazitului *Varroa* sp.
(www.mossopshoney.co.nz/From+hive+to+honeypot/)

Depune 7 – 8 ouă în celulele cu puiet sau pe larvele de trântori (Boot și col., 1992, citați de Morse, R.A. & Flottum K., Eds., 1997), din care după 2 zile ies larvele ce se hrănesc cu hemolimfa larvelor și nimfelor de albină și ajung la

maturitate după 7 zile când se împerechează înainte de eclozionarea albinelor (Corrêa-Marques, M. H. și col., 2003).

Femelele împerecheate trec pe albinele lucrătoare, trântori și matcă unde se hrănesc cu hemolimfa acestora producându-le în final moartea (Medina, M. L. și col., 2002).

Contaminarea se face prin intermediul albinelor hoațe, a trântorilor, roiurilor, fagurilor cu puiet, precum și prin practicarea stupăritului pastoral.

La începutul infestării, parazitul nu poate fi observat cu ochiul liber, datorită numărului redus de indivizi, precum și datorită poziției acestuia între inelele abdominale. În timpul iernii paraziții neliniștesc familia de albine, se produce un consum mai ridicat de miere și se produce apariția diareei.

Când există un număr mare de paraziți, după 2 – 3 ani de la infestare, albinele eclozionate vor fi neviabile, cu aripile nedevelopate, capul și picioarele diforme. Acestea cad pe fundul stupului și sunt evacuate de către albinele sănătoase.

Când infestarea atinge 30 – 40% din efectivul stupului, familia slăbește și moare (Mărghițaș, L. Al., 2003).

Varroa destructor (jacobsoni) este un parazit care are acțiune distructivă majoră asupra familiilor de albine predominant în zonele temperate (Wilkinson, D. și col., 2002; Fries, I. și col., 2003; Harris, J. W. și col., 2004).

Acțiunea nocivă a parazitului nu se datorează doar parazitării coloniilor de albine cu hemolimfa cărora se hrănește, ci mai ales faptului că el constituie un puternic vector al virusilor ce infestază coloniile de albine (Benoit, J. B. și col., 2004).

Infestările severe cu *Varroa* sp. sunt de obicei însoțite de o multitudine de simptome denumite generic Sindromul parazitic (PMS - Parasitic Mite Syndrome). Pe lângă asocierile cu transmiterea virusului paraliziei acute, virusul paraliziei lente, sau cel al malformației aripilor (Nordström, S., 2000), se pare că *Varroa destructor (jacobsoni)* este asociat și cu un alt virus de tip „picorna” (picorna – like virus) recent izolat atât din parazit, cât și din albinele infestate cu *Varroa* sp. (Vlak, J. M. și col., 2003).

Cercetări efectuate pe populații de albine infestate simultan cu *Acarapis woodi* și *Varroa destructor (jacobsoni)* au indicat faptul că ar putea exista o interacțiune biologică între cei doi paraziți la nivel individual, ceea ce ar aduce prejudicii suplimentare coloniilor infestate (Downey, D. L. și col., 2000).

Combaterea eficientă a parazitului constituie una dintre cele mai mari provocări ale apicultorilor din întreaga lume (Tew, J. E., 2000; Moosbeckhofer, R. și col., 2003; Donzé, G., 1998).

Una dintre cele mai mari probleme ale apicultorilor de azi constă în rezistența parazitului la tratamentul cu **Apistan** (pesticid piretroid având component activ tau – fluvalinatul), una dintre substanțele cu cea mai mare utilizare în combaterea *Varroa destructor (jacobsoni)*, dar și la cele cu Amitraz și Cumafos (Pettis, J. S., 2003).

Cercetările efectuate la nivel molecular au evidențiat posibilitatea asocierii acestei rezistențe a parazitului la Apistan, dar și la celelalte substanțe de sinteză utilizate în tratamente care intră în categoria pesticidelor (Odagiu, Antonia și col., 2005), cum sunt, de exemplu, Cumafos-ul (produs de sinteză pe bază de compuși organoclorurați ce intră de obicei în compoziția pesticidelor) și Amitrazul (pe bază de antibiotice) cu mutațiile punctiforme apărute la nivelul genelor canalului sodiului (Wang, R. și col., 2002; Wang, R. și col., 2003; Wang, R. și col., 2003).

Experimentele desfășurate în Italia, Franța, Germania, Belgia, Austria, Spania ș.a. începând cu 1994, au demonstrat experimental prezența fenomenului (Hillesheim, E. și col., 1996; Milani, N., 1995; Trouiller, J., 1996; Bruneau, E. și col., 1997; Trouiller, J. și col., 1997; Higes, M. și col., 1998; Trouiller, J., 1998). Rezistența parazitului *Varroa* sp. la principalii produși de combatere, bazați pe piretroizi s-ar putea explica prin mecanisme identificate la momentul de față.

Aceasta, însă, în contextul mai larg al dezvoltării rezistenței la pesticide atât a plantelor cât și al altor organisme (echinoderme, insecte, arahnide etc.), care se pare că sunt guvernate de procese similare (Doyle, K. și col., 1991; Sibbesen, O. și col., 1995; Besten, P.J., 1998; Valles, Rinderer, T.E. și col., 1999; S.M. și col., 2003; Tan, J. și col., 2005; Eleftherianos, I. și col., 2008, ș.a.).

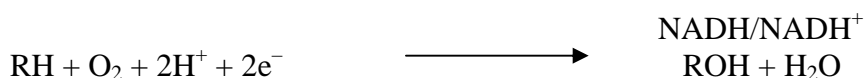
Unul dintre ele este reprezentat de prezența anumitor esterase (monooxigenazele), care stau la baza unui mecanism metabolic de rezistență specific, mediat de acestea - detoxifierea.

În prezența monooxigenazelor piretroizii sintetici sunt oxidați, ceea ce conduce la anihilarea activității lor toxice asupra paraziților (S a m m a t a r o , D i a n a și col., 2005). Aceste monooxigenaze fac parte dintr-un grup mai extins (L e w i s ,

D.F.V., 2001) localizat în reticulul endoplasmatic și este desemnat ca Citocrom P – 450 (CYP sau P450). Acestea aparțin superfamiliei de proteine care conțin cofactorul Hem (hemoproteine).

Denumirea atribuită acestui grup enzimatic se datorează localizării celulare a acestora (**cito**), dar și caracteristicilor spectrofotometrice (**crom**) – când fierul din Hem este redus, P450 absoarbe radiațiile luminoase cu lungimea de undă caracteristică de 450 nm.

Reacția de bază prin care Citocromul P450 își manifestă rolul catalitic, este tipică monooxigenazelor (oxidare prin introducerea unui atom de oxigen într-un substrat organic – RH și reducere prin formarea apei cu participarea celui alt atom de oxigen):



La echinoderme a fost evidențiată dependența de P450 a metabolismului compușilor piretroidici (B e s t e n , P. J. și col., 1990; B e s t e n , P. J., 1998).

În cazul insectelor, a fost confirmată prezența oxidazelor din complexul enzimatic microzomal P450, care utilizează sistemul NADPH/NADH pentru a cliva reducător oxigenul atmosferic, conducând la o funcțiune organică și o moleculă de apă (Schuler, Mary A., 1996; Dong, K., 2007; Soderlund, D. M., 2008). Descrierea acestor mecanisme a facilitat explicarea fenomenului de rezistență a parazitului *Varroa* sp. la piretroizi. Pe baza lor tulpinile rezistente la producții de combatere și-au dezvoltat capacitatea de a detoxifica insecticidele prin oxidare.

Celălalt mecanism al rezistenței poate fi explicat prin mutațiile punctiforme produse la nivelul genei, care controlează canalele sodiului. Canalele sodiului caracterizate de un potențial electric sunt constituite integral din proteine transmembranare și sunt responsabile de faza de creștere rapidă a potențialului de acțiune al celulei care face parte din categoria celor cu excitabilitate ridicată. Insecticidele piretroide au efect de reducere a cineticii activării și dezactivării canalului sodiului. Consecința directă este deschiderea prelungită a canalelor individuale, ceea ce conduce la paralizia și în final moartea insectelor ce vin în contact cu acești compuși (Wang, R. și col., 2002; Wang, R. și col., 2003; Wang, R. și col., 2003).

Multe dintre insectele ce prezintă rezistență la piretroizi au suferit mutații punctiforme la nivelul genei canalului sodiului.

Teste efectuate asupra oocitelor de *Xenopus* ce au exprimate canalele sodiului, au demonstrat că aceste mutații reduc sensibilitatea acestor canale la piretroizi, ceea ce confirmă faptul că acesta reprezintă mecanismul major de rezistență la piretroizi la diverse specii de insecte (Soderlund, D.M. și col., 2003).

Studii efectuate asupra a 12 specii de insecte (Soderlund, D.M. și col., 2003; Soderlund, D.M., 2008) au evidențiat o mutație la nivelul genei IIS6 ce determină rezistența acestor populații de insecte la piretroizi.

Wang, R și col. (2003) au reușit să evidențieze gena pentru canalul sodiului de la arahnide – gena *VmNa* și la *Varroa destructor* O.

Izolarea integrală a genei VmNa a reprezentat un moment important pentru caracterizarea completă a modului de funcționare a acestui mecanism de rezistență la produse pe bază de piretroizi.

În cazul fluvalinatului, rezultatele experimentale au condus la concluzia că în vederea combaterii parazitului în condițiile dezvoltării rezistenței la piretroizi, cea mai bună strategie ar fi utilizarea compusului activ utilizat în tratamente (τ – fluvalinatul) în alternanță cu alte tipuri de compuși activi, pentru ca acesta să-și păstreze eficiența (Milani, N. și col., 2002; Elzen, Patti și col., 2004).

Constatări similare au fost enunțate și de alți cercetători, pe toate continentele (Huang, Y. G. și col., 2001, în China; Martin, S.J., 2004, în UK; Sammataro, Diana și col., 2005 etc.).

Printre soluțiile eficiente, pentru folosirea în alternanță, se numără substanțele: timolul, acidului formic sau acidului oxalic.

În urma unor experimente realizate la scară pilot, cercetătorii americani (USDA, 2006) au evidențiat posibilitatea utilizării 2 – heptatonei (secretată chiar de albine) în combaterea parazitului.

Producerea sintetică a substanței și administrarea ei ca insecticid ar putea constitui o soluție valoroasă, atât datorită eficienței cât și a faptului că este biodegradabilă și nu afectează calitatea produselor stupului.

1.2.3. *Tropilaelaps clareae*

Este un parazit de dimensiuni medii, lungimea 1,03 mm lățimea 0,55 mm, ușor, de culoare maro-roșcată. *Apis dorsata* este gazda sa inițială, iar parazitul se găsește doar în Asia, fiind mai rar. Când parazitează și *Apis mellifera* efectele asupra acesteia sunt mai dezastruoase decât cele produse de *Varroa destructor (jacobsoni)*, albinele infestate prezentând pete de culoare închisă în principal pe extremități (Burgett și Akatanakul, 1985).

Datorită chelicerelor primitive, nespecializate *Tropilaelaps clareae* nu este capabil să străpungă membranele albinelor adulte pentru a-și procura hrana și din acest motiv se hrănește doar cu hemolimfa puietului, fiind foretice pe cele adulte (Griffiths, 1988). Ciclul său de viață este similar cu cel al *Varroa destructor (jacobsoni)*.

Tropilaelaps clareae este mult mai virulent în regiunile cu climă tropicală și subtropicală, fiind mai ușor de controlat în zonele cu climă temperată.



Multitudinea bolilor (peste 30) induse atât de viruși și bacterii, cât și de protozoare, ciuperci și mucegaiuri precum și a paraziților care infestază populațiile de albine din întreaga lume, a impus cercetătorilor din domeniu găsirea unor soluții suplimentare de combatere a efectului uneori dezastruos produs de acestea. Astfel, tratamentul specific fiecărei maladii, bazat în speță pe antibiotice, pe lângă faptul că atrage după sine riscul contaminării produselor stupului cu reziduuri și implicit la excluderea acestora de pe piață, produc rezistență în populațiile infestante ceea ce are drept rezultat reducerea eficienței tratamentului.



CAPITOLUL II

BAZELE GENETICE ALE REZISTENȚEI ALBINELOR LA BOLI ȘI PARAZIȚI

O examinare atentă a diverselor colonii de albine relevă nu numai faptul că acestea diferă între ele prin dimensiune, culoare, organizare, producție de miere și polen etc., dar și prin rezistența la boli sau la acțiunea diverșilor paraziți.

Examenele microscopice au scos în evidență și mai mult faptul că există o mare variabilitate în ceea ce privește încărcătura unei colonii cu paraziți sau agenți patogeni. Mare parte din această variabilitate este rezultatul expunerii accidentale a coloniei la acțiunea paraziților, patogenilor, sau a altor componente de mediu care contribuie la scăderea mecanismelor de apărare a coloniei împotriva acestui flagel.

Cu toate acestea, variabilitatea observată poate fi și consecința diferenței în ceea ce privește componența genetică a coloniilor.

Diferențele genetice individuale dintre lucrătoare precum și dintre colonii constituie materialul brut pentru creșterea albinelor bazată pe selecția speciilor rezistente la boli.

Deși eliminarea riscului apariției bolilor prin selecție nu este un obiectiv realist pentru crescători, prin aplicarea selecției se ajunge la reducerea considerabilă a riscului la îmbolnăviri. Creșterea albinelor pe principiile selecției implică mai multe etape:

- I. Coloniile, sau indivizii (lucrătoarele, trântorii, mătcile) sunt evaluate în cadrul populației de bază din care este selectat efectivul luat în studiu
- II. Mătcile coloniilor care prezintă caracteristicile dorite sunt selectate pentru a asigura perpetuarea caracteristicilor dorite la generațiile viitoare
- III. Se practică înmulțirea controlată între mătcile și trântorii aparținând efectivului selectat
- IV. Descendenții noilor mătcii sunt evaluați atât individual, cât și pe întreaga colonie.

Dacă o proporție suficient de mare a variației însușirilor observate în populația parentală este datorată diferențelor genetice dintre indivizi, descendenții lor vor semăna cu părinții și astfel se va obține ameliorarea prin selecție.

La albine, variabilitatea genetică a fost demonstrată ca fiind cauza a trei mecanisme generale de rezistență la boli: fiziologic, comportamental și anatomic. Aceste mecanisme pot acționa simultan asupra aceluiași agent patogen sau parazit. De asemenea, un singur mecanism poate acționa asupra mai multor patogeni, paraziți, sau asupra ambelor clase.

2.1. MECANISME FIZIOLOGICE

Într-un fel sau altul, larva ori chiar albina adultă sunt sursa unui produs care împiedică creșterea, dezvoltarea sau reproducerea agentului patogen ori a parazitului. Variabilitatea genetică întâlnită în cazul acestui tip de rezistență a fost demonstrată în cazul rezistenței larvelor la loca americană și are implicații în dezvoltarea speciilor rezistente la agentul viral al paraliziei albinelor.

Studii efectuate pe diverse populații de albine au demonstrat faptul că în coloniile de albine în care diversitatea genetică este mare, incidența bolilor este redusă, comparativ cu coloniile în care există diversitate scăzută. Astfel, în coloniile de *Bombus terrestris* L. Baer și Schmidt-Hempel (2001, citați de Tarpy, D., 2003) s-a observat o intensitate a infestării cu paraziți și o prevalență mai scăzută a acestora în coloniile ce prezentau diversitate genetică mare. La baza **diversității genetice crescute** stă **poliandria** mătcilor (capacitatea femelei de a se împerechea cu mai mult decât un mascul; albinele, se împerechează în medie cu 12 masculi - Strassmann, 2001, citat de Tarpy, D., 2003 -).

S-a înregistrat variație genotipică în rezistența la multe dacă nu chiar la toate bolile ce infestază coloniile de albine. La genotipuri diferite s-au obținut grade diferite de infestare cu *Varroa destructor*, *Acarapis woodi*, *Nosema apis* (Guzman și col., 1996, 1998, Woyciechowski și col., 1994 citați de Tarpy, D.R., 2003).

Cercetările realizate de Tarpy, D.R. (2003) pe populații de albine înșămânțate artificial au avut drept rezultat creșterea diversității genetice cu efecte pozitive asupra viabilității puietului și a comportamentului igienic. În conformitate cu predicțiile modelului parazit și patogen (Sherman și col., 1988, Schmid-Hempel și Croizer, 1999 citați de Tarpy, D.R., 2003), în coloniile cu diversitate genetică mare prevalența bolilor a fost mai scăzută decât în coloniile cu diversitate scăzută. Astfel, s-a constatat o incidență mai scăzută a puietului văros la coloniile cu diversitate genetică mai mare.

Rămâne însă neclar dacă poliandria a evoluat la albine ca răspuns la atacul paraziților și bolilor (Hamilton, 1987; Sherman și col., 1988; Hamilton și col., 1990; Shykoff și col., 1991 a, b, citați de Neumann și col., 1999), sau dacă reducerea prevalenței bolilor este rezultatul inevitabil al împerecherilor multiple.

Gradul de dezvoltare larvară ar putea constitui alt posibil mecanism fiziologic al rezistenței larvelor la loca americană. Sutter și col., 1968, citat de Page, R.E. și col., 1997 (în *Honey Bee Pests, Predators, and Diseases*, 475, Morse, R.A. & Flottum, K. Eds., 1997) au demonstrat faptul că larvele rezistente la agentul viral al paraliziei au dimensiuni mai mari decât cele nerezistente pe tot parcursul

perioadei larvare timpurii, aceasta făcându-le probabil mai puțin susceptibile la infecția cu spori proveniți de la *Bacillus larvae*.

De asemenea, coloniile cu o dezvoltare mai rapidă în adulți (un stadiu post-căpăcire mai scurt) sunt mai rezistente la *Varroa* decât cele cu stadii post-căpăcire mai îndelungate.

Acest tip de rezistență poate fi considerat drept consecință a timpului scurt pe care îl are parazitul de a se dezvolta până la stadiul adult datorită perioadelor post-căpăcire prea scurte (Moritz și Hanel, 1984, în Honey Bee Pests, Predators, and Diseases, 476, Morse, R.A. & Flottum, K. Eds., 1997).

2.2. MECANISME COMPORTAMENTALE

Cel mai cunoscut mecanism comportamental de rezistență la boli și paraziți, în cazul albinelor, este **comportamentul igienic**, descris inițial de Park, O.W. (1937), citat de Morse, R.A. & Flottum, K. Eds., 1997. Practic, este vorba despre două activități deosebite realizate în două etape succesive (Lapidge, K.L. și col., 2002), prima implicând descăpăcirea, iar a doua eliminarea propriu-zisă a corpului existent în celulă. Rothenbuhler (1964a,b), citat de Morse, R.A. & Flottum, K. Eds. (1997), a presupus faptul că aceste două activități sunt controlate de două mecanisme genetice diferite. El a presupus că fiecare dintre aceste două activități este controlată de către o genă cu două alele (fig. 6).

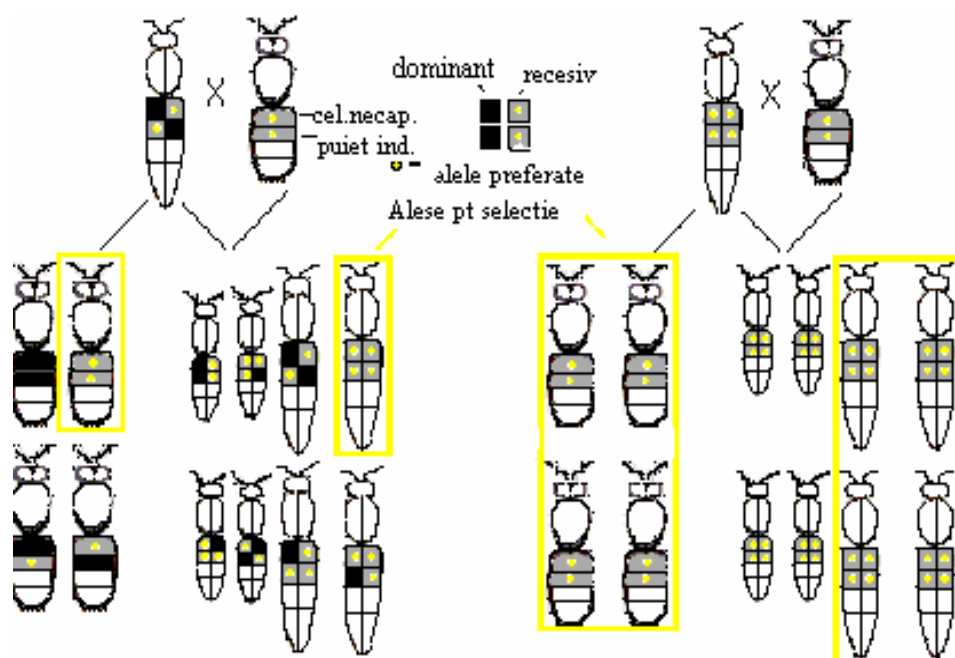


Figura 6. Transmiterea comportamentului igienic la *Apis mellifera* L.
 (<http://members.aol.com/queenb95/genetics.html>)

Analiza genetică a comportamentului la insecte a început să se dezvolte încă din anii 60, dar inițial s-a limitat în a stabili dacă o însușire comportamentală este eritabilă sau nu și determinând dacă modul său de transmitere este dominant sau recesiv (Hoy, M.A., 1994).

Dacă inițial analiza genetică tradițională a comportamentului la insecte implica doar experimente de încrucișare și selecție, în zilele noastre se face uz de tehnicile geneticii moleculare ce utilizează markeri genetici.

La *Apis mellifera* L., termenul de comportament igienic este utilizat pentru a descrie un proces în două etape realizat de albinele lucrătoare după detectarea larvelor sau pupelor moarte. Inițial, procesul implică descăpăcirea (îndepărtarea cerii ce acoperă celula), iar apoi îndepărtarea larvelor sau pupelor moarte aflate în celulă. Rothenbuhler (1964) a fost cel care a efectuat un experiment de retroîncrucișare. Iniția a încrucișat o linie cu un pronunțat comportament igienic cu o linie ce nu a prezentat comportament igienic. Coloniile hibride F1 au prezentat comportament neigienic.

Indivizii acestei linii au fost apoi retroîncrucișați cu indivizi aparținând liniilor igienice. Coloniile rezultate în urma retroîncrucișării au segregat în patru fenotipuri comportamentale conform celei de a doua legi mendeleene. Aceste date l-au determinat pe Rothenbuhler (1964) să presupună că cele două componente ale comportamentului igienic (descăpăcirea și respectiv îndepărtarea larvelor moarte) sunt controlate fiecare de către un locus independent. Lucrătoarele homozigote recesive (*uu*) la locusul „descăpăcirii” descăpăcesc celulele ce conțin pupe moarte, în timp ce lucrătoarele *Uu* sau *UU* nu decăpăcesc celulele cu larve moarte.

Lucrătoarele *rr* la locusul „îndepărtării” îndepărtează pupele moarte din celulele descăpăcite, în timp ce lucrătoarele *Rr* și *RR* nu îndepărtează larvele moarte. În consecință, Rothenbuhler (1964) a concluzionat că exprimarea comportamentului igienic necesită ca lucrătoarele să fie homozigote recesive la nivelul ambilor loci (*rruu*).

Mai târziu, reanalizând datele obținute de Rothenbuhler, Moritz (1988) a concluzionat că de fapt cel puțin trei gene sunt implicate în comportamentul

igienic al albinelor. Recent, Lapidge și col. (2002) au demonstrat cu ajutorul tehnicilor moleculare și a cartării linkage-ului locilor însușirilor cantitative (QTL – quantitative trait loci) faptul că mecanisme mult mai complexe decât s-a crezut stau la baza genetică a comportamentului igienic și se pare că un număr mai mare de gene ar fi implicate în manifestarea acestui caracter. În experimentul efectuat de ei au fost identificați șapte loci ai însușirilor cantitative asociați cu comportamentul igienic.

Acest comportament are o importanță extrem de mare în mecanismul comportamental de rezistență la boli (boala puietului văros, loca americană, loca europeană, la infestările cu *Varroa destructor*, sau *Acarapis woodi* – fig. 5 – etc.).

De asemenea, este demnă de subliniat și importanța economică a acestui mecanism comportamental de rezistență la boli și paraziți, care conduce la reducerea costurilor întreținerii familiilor de albine, necesitând o frecvență mai redusă a tratamentelor în comparație cu liniile ce nu prezintă comportament igienic. În același timp se va face mai puțin uz de pesticide ceea ce atrage după sine costuri mai scăzute ale întreținerii familiilor de albine, precum și diminuarea riscului de contaminare a mierii și a celorlalte produse ale albinelor (Spivak, Marla și col., 2001).

Metode eficiente de evidențiere a comportamentului igienic al albinelor au fost elaborate abia la sfârșitul anilor '90 (Spivak, Marla, 1998). Studiile privitoare la mecanismele implicate în comportamentul igienic al albinelor, au sugerat că acest tip de comportament constituie o însușire recesivă (Rothenbuhler, 1964 citat de Spivak, Marla, 1998).

Cercetări efectuate la Universitatea Minnesota (Spivak, Marla și col., 2001) utilizând măci aparținând unor linii cu comportament igienic împerecheate pe cale naturală au demonstrat faptul că s-au obținut grade mai reduse de infestare cu *Varroa* și apariția puietului văros la lucrătoarele adulte, pe parcursul unui an, în comparație cu coloniile care nu au acest comportament, rămânând încă deschisă problematica legată de posibilitatea rezistenței sporite la infestare cu paraziți și boli a albinelor rezultate în urma împerecherii mătcilor aparținând liniilor cu comportament igienic cu trântori aparținând aceleiași tip de linii.

A fost studiat efectul compoziției genotipice a coloniilor de albine asupra comportamentului igienic, în experimente conduse cu ajutorul unor colonii alcătuite din albine aparținând atât unor linii cu comportament igienic, cât și unor linii care nu manifestă acest tip de comportament în condițiile unui atac cu *Varroa destructor* (*jacobsoni*).

Rezultatele experimentelor au demonstrat faptul că performanțele igienice au fost mai ridicate în coloniile în care au predominat albine aparținând liniilor igienice, ceea ce a condus la presupunerea că o influență majoră asupra performanțelor comportamentului igienic o are compoziția genotipică a coloniei.

Vârsta la care albinele au comportament igienic variază în funcție de compoziția coloniei și genotip. Cel mai frecvent albinele au un comportament igienic cu randament maxim înainte de a atinge vârsta mijlocie (17 – 19 zile), iar vârsta maximă până la care s-a observat manifestarea acestui comportament a fost de 56 de zile (Arathi, H.S. și col., 2001).

Studii efectuate asupra comportamentului igienic la *Apis mellifera iberica* prin infestare artificială cu *Varroa* au demonstrat existența unor corelații pozitive în ceea ce privește comportamentul igienic față de celulele infestate artificial cu 2 sau 3 paraziți (Flores, J.M. și col., 2001).

Cercetările efectuate de Boecking, O. și col. (2000) asupra comportamentului igienic la albine, au demonstrat existența unui determinism genetic în ceea ce privește rezistența la loca americană, la boala puietului văros și la infestarea cu *Varroa destructor (jacobsoni)*. Au fost obținute valori ale heritabilității pentru comportamentului igienic egale cu $h^2 = 0,18 \pm 0,27$, corelația genetică dintre răspunsul comportamentului igienic la infestarea cu agenții patogeni a avut valoarea $r_g = 0,61 \pm 0,51$, în timp ce corelația fenotipică a fost $r_f = 0,11 \pm 0,28$. Aceste valori au indicat potențialul aplicării selecției la coloniile de albine în scopul obținerii unor familii cu rezistență crescută la boli și praziți.

De asemenea, în ultima vreme se bucură de un deosebit interes studiul efectelor comportamentului de curățare întâlnit la albinele din colonii cu nivel ridicat de infestare cu *Varroa*. Peng și col., 1987a,b (Moritz și Hanel, 1984, citați de Morse, R.A. & Flottum, K. Eds., 1997) au arătat că lucrătoarele aparținând speciei *A.cerana* își curăță paraziții de pe corp și îi omoară zdrobindu-i între mandibule.

În exprimarea omportamentului igienic, un loc central îl ocupă sistemul imunitar al albinei.

Sistemul imunitar al insectelor este mult mai simplu decât cel uman, al cărui mecanism nu este încă pe deplin elucidat, în ciuda progreselor științifice realizate în ultimele decade (R o i t t și col., 1989, citat de D e n h o l m , C.H., 1999).

O diferență importantă între sistemul imunitar al omului și cel al insectelor este acela că organismul uman își „amintește” infecțiile la care a mai fost supus și în felul acesta poate combate o eventuală infecție ulterioară produsă de aceeași agenți patogeni, sau paraziți. Imunitatea implică producerea de anticorpi specifici constituenților agenților patogeni sau paraziților, astfel că o serie de mecanisme sunt induse în vederea prevenirii infecțiilor.

Acest tip de imunitate poate fi exploatat prin expunerea organismului uman la agenți patogeni inactivați ceea ce are drept rezultat protecția față de infecție ca urmare a prezenței naturale a parazitului sau a agentului patogen, fenomen cunoscut sub numele de vaccinare.

Spre deosebire de organismul uman, insectele printre care se numără și albinele, nu produc anticorpi. Astfel, nu este posibilă o abordare profilactică a bolilor și paraziților ce pot constitui o amenințare pentru sănătatea acestora.

Din punct de vedere filogenetic, explicația existenței unui sistem imunitar mai puțin evoluat la insecte în comparație cu mamiferele, se datorează faptului că acestea au o viață relativ scurtă, iar la majoritatea indivizilor reproducerea se realizează în primul an de viață, în timp ce mamiferele sunt nevoite să supraviețuiască într-un mediu mai mult sau mai puțin ostil pentru o perioadă mult mai îndelungată în vederea asigurării perpetuării speciei.

Cu toate acestea, odată ce Bailey și col., 1963 (citată de Denholm, C.H., 1999) au demonstrat că în ciuda infestării virale, albinele pot trăi fără a manifesta semne evidente ale îmbolnăvirii, s-a emis fie ipoteza existenței unei anumite imunități antivirale, fie cea conform căreia virusii se replică în așa fel încât în final nu se instalează infecții evidente.

Un rol important în elucidarea acțiunii agenților patogeni și implicit prevenirea bolilor îl au studiile privitoare la genele care codifică peptidele antimicrobiene.

Astfel, la *Apis mellifera* L. a fost pus în evidență bagajul imunitar ce constă din patru polipeptide care sunt induse de infecțiile cu patogeni și care produc un spectru larg de mecanisme de apărare antibacteriană (Castells-Johnson, K. și col., 1994).

Poliptide antimicrobiene (Bulet, P. și col., 1999) prezente la *Apis mellifera* L. sunt :

- Polipeptide bogate în cistină – **defensinele** (fig. 7), respectiv royalizina izolată din lăptișorul de matcă și defensina izolată din hemolimfa albinelor infectate cu bacterii, ambele fiind codificate de aceea genă polimorfică, **defensina 1**. Recent a fost pusă în evidență o altă genă ce codifică o altă defensină la *Apis mellifera* L., desemnată sub numele de **defensina 2** (Klaundry, J. și col., 2005).

VT **C** DLLSFKGQVNSA **C** AAN **C** LSLGKAGGHCEKGV **C**
ICRKTSFKDLWDKRF

Figura 7. Structura defensinei la *Apis mellifera* L. (AA) cu evidențierea reziduurilor de cisteină cu grad înalt de conservare

- polipeptide ce conțin prolină – **apidecinele Ia, Ib, II, III; abaecina** (fig. 8). O supraproducție de apidecine este înregistrată ca urmare a acțiunii
- unice a unui mecanism de amplificare codificat genetic (Casteels-Johnson, K. și col., 1994);
- și polipeptide bogate în glicină (**himenoptecinele**).

Apidecina Ia	G	N	NRPVYIP	Q	PRPP	HPR	I
Apidecina Ib	G	N	NRPVYIP	Q	PRPP	HPR	L
Apidecina II	G	N	NRPVYIP	Q	PRPP	HPR	L
Apidecina III	G	N	NRPVYIP	Q	PRPP	HPR	I

Abaecina YVPLPNVPQPG **R** RPFP **T** FPGQ G **PFNP** K IKW **P** Q **G** **Y**

Figura 8. Structura apidecinelor și abaecinei la *Apis mellifera* L. (AA) cu evidențierea reziduurilor cu grad înalt de conservare

Studii efectuate asupra acestora au condus la izolarea și identificarea structurii lor (Cornet, B. și col., 1995) făcând astfel posibilă caracterizarea acestora (Rees, J.A. și col., 1997; Mardones, G. și col., 2000), precum și evidențierea precursorilor acestora (Casteels-Johnson, K. și col., 1994).

De asemenea, studii recente au condus și la evidențierea modului de acțiune intracelulară a activității polipeptidelor cu acțiune antimicrobiană (Brogden, K.A., 2005), exemplificându-se acest mecanism pentru situația în care microorganismul gazdă este *E.coli* (fig. 9).

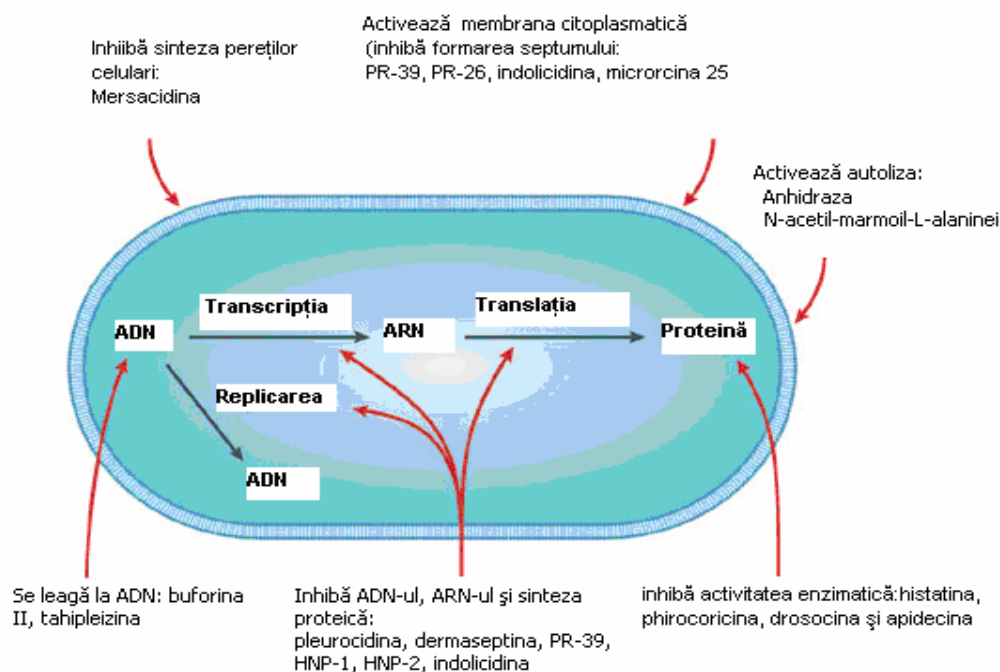


Figura 9. Modul de acțiune intracelulară a polipeptidelor antimicrobiene (după Brogden, K.A., 2005),

Studii efectuate asupra răspunsului imun al larvelor albinelor în condițiile infestării cu *Paenibacillus larvae* (Evans, J.D., 2004) au demonstrat existența transcriptelor acestora pe toată perioada experimentală, constatându-se și o intensificare de 24 de ori a suprareglării **aebacinei** când s-a efectuat inocularea orală experimentală cu *P. larvae*, mai exact în momentul în care bacteria traversează epiteliul intestinal al albinelor.

S-a constatat că expresia ambelor peptide antimicrobiene prezintă circa 1000 variații în diferitele familii de albine, ceea ce a dus la ipoteza existenței unei componente alelice a expresiei lor.

De asemenea, s-a emis ipoteza conform căreia diferențele înregistrate în răspunsul imun al albinelor la infestarea cu această bacterie s-ar datora variabilității genetice dintre colonii (B a c h a n o v a , K. și col., 2002)

Cercetările efectuate în domeniul imunologiei insectelor s-au intensificat datorită presupunerii că molecule implicate în mecanismele de apărare ale acestora ar putea conduce la producerea unei noi clase de antibiotice (C a s t e e l s , 1990).

Introducerea markerilor moleculari la albine și a tehnicilor adecvate utilizării lor a condus la elucidarea a o serie de mecanisme ce stau la baza comportamentelor complexe, dar și a unor aspecte legate de evoluția speciei în timp.

Este bine cunoscut faptul că la utilizarea markerilor moleculari în entomologie se recurge fie pentru a transforma un organism cu efecte benefice într-unul cu performanțe și mai bune, fie pentru a transforma un organism cu efecte nocive, într-unul cu efecte negative atenuate (A l v a r e z , J.M., 1998).

Prima parte a acestei aserțiuni își găsește ilustrarea la *Apis mellifera* L., în programele MAS puse în practică atât cu scopul obținerii unor produse apicole superioare, cât și cu cel al obținerii unor familii mai puternice cu o stare de sănătate superioară.

La noi în țară au fost efectuate experimente cu scopul identificării acestui comportament la specia de albine autohtone (Odagiu, Antonia și col., 2006, 2007).

Au fost efectuate cercetări privitoare la rezistența la boli în general și la *Varroa destructor* O. în particular, pe populații de albine din stupine situate în cele 10 județe din Transilvania, Alba, Bistrița-Năsăud, Brașov, Cluj, Covasna, Harghita, Hunedoara, Mureș, Sălaj și Sibiu (fig. 10).

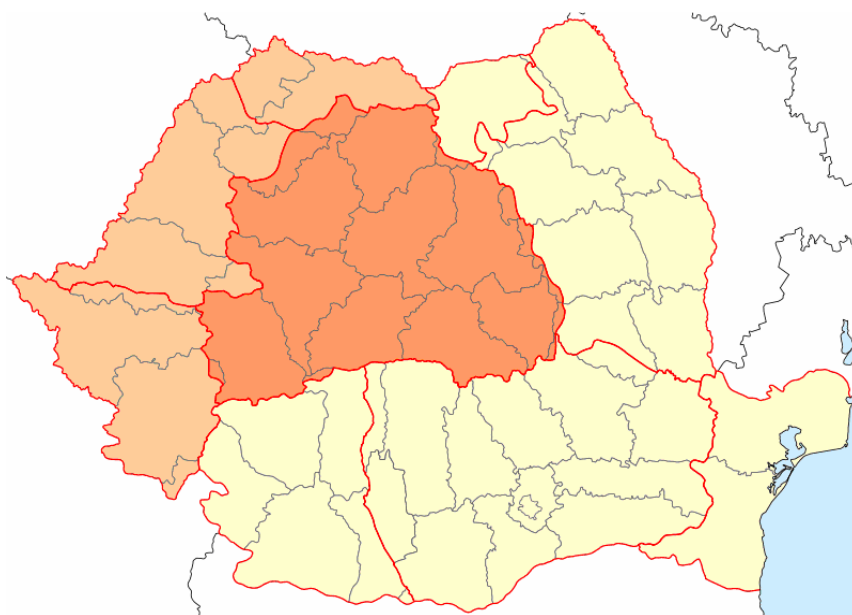


Figura 10. Localizarea zonelor de prelevare a probelor și testare a stării de sănătate a albinelor

2.3. EVIDENȚIEREA COMPORTAMENTULUI IGIENIC LA *APIS MELLIFERA* L. ÎN STUPINE DIN TRANSILVANIA

2.3.1. Metode

Pentru a se obține un tablou general privitor la rezistența la boli în general și la acțiunea parazitului *Varroa* în particular, în stupinele din județele Transilvaniei s-a optat pentru aplicarea metodei chestionarului.

Acesta a fost elaborat de așa manieră încât să ofere informații utile și ușor de prelucrat privitoare la tipul de apicultură practică de către apicultor, experiența acestuia, gradul de atac al patogenilor și dăunătorilor, precum și numărul de intervenții practicate de apicultor pe parcursul unui an.

Chestionarul a fost individualizat și completat de 100 apicultori în județul Alba, 50 în județul Bistrița-Năsăud, 78 în județul Brașov, 213 în județul Cluj, 50 în județul Covasna, 115 în județul Harghita, 45 în județul Hunedoara, 67 în județul Mureș, 40 în județul Sălaj și 91 în județul Sibiu.

Colectarea chestionarelor s-a realizat pentru fiecare județ.

Au fost selectate stupine în care s-a testat comportamentul igienic al populațiilor de albine. Aceasta s-a realizat cu ajutorul metodei de înțepare a celulelor căpăcite cu acul de gămălie (Spivac, Marla, 1998).

CHESTIONAR APICOL

Nr.	Întrebarea
1.	De când practicați apicultura ? mai puțin de 1 an 11- 15 ani 2 – 5 ani 16 – 20 ani 6 – 10 ani peste 20 ani
2.	Ce fel de sistem de apicultură practicați? Pastoral Staționar Mixt
3.	Câte intervenții sanitare efectuați pe an ? 0 2 – 5 intervenții 1 intervenție peste 5 intervenții
4.	Faceți tratamente profilactice împotriva parazitului Varroa ? Da Nu

Capacele celulelor proaspăt acoperite au fost înțepate cu un ac fin. Un procent de descăpăcire și curățare a celulelor de 90% indică prezența comportamentului igienic la populațiile studiate. În fiecare stupină, s-a ales randomizat un stup și de pe o ramă cu puiet au fost înțepate câte 40 de celule. După 24 de ore, au fost numărate celulele descăpăcite și curățate, rezultatul fiind exprimat procentual.

Datele colectate au fost prelucrate statistic cu programul STATISTICA v. 7.0, 1994 – 2008. Au fost calculați următorii parametri statistici: media, eroarea standard

a mediei, deviația standard și coeficientul de variabilitate (Coșier Viorica și A. Vlaic, 2007; Vlaic A. și col., 2004)

Pentru a mări gradul de încredere a interpretării, calculul statistic a vizat și parametrul asimetriei.

Pentru fiecare reprezentare grafică s-au calculat atât abaterea cât și gradul de asimetrie, în funcție de a căror valori a fost apreciat gradul de reprezentativitate a mediei (Merce E. și col., 2009).

2.3.2. Rezultate

Rezultatele chestionarului privitoare la **experiența crescătorilor de albine** demonstrează faptul că în majoritatea județelor predomină crescătorii de albine cu experiență de 2 – 5 ani, respectiv 37,70% apicultori în județul Alba, 25% în județul Bistrița - Năsăud, 42,85% în județul Brașov, 45% în județul Cluj, 57,14% în județul Covasna, 39,21% în județul Hunedoara, 67 în județul Mureș, și 44,25% în județul Sibiu, în timp ce 34,29% în județul Harghita și 44,41% în județul Sălaj au reprezentat crescătorii cu experiență mai mare de 20 de ani (fig.11).

În ceea ce privește **tipul de apicultură practicat** (fig. 12), apicultorii preferă sistemul pastoral în 37,98% apicultori în județul Alba, 37,50% în județul Bistrița-Năsăud, 85,72% în județul Brașov, 57,14% în județul Covasna, 82,16% în județul Harghita, 51,23% în județul Hunedoara, 74,12 în județul Mureș, 64,15% în

județul Sălaj și 71,22% în județul Sibiu, în timp ce în județul Cluj predomină cei care practică sistemul mixt, respectiv 55%.

În ceea ce privește **numărul de intervenții pe an**, se înregistrează o proporție mare de apicultori care nu le efectuează. Cele mai reprezentative valori, în acest sens, au fost: 41,66 % în județul Bistrița-Năsăud, 42,15 % în județul Hunedoara și 44,12% în județul Sălaj.

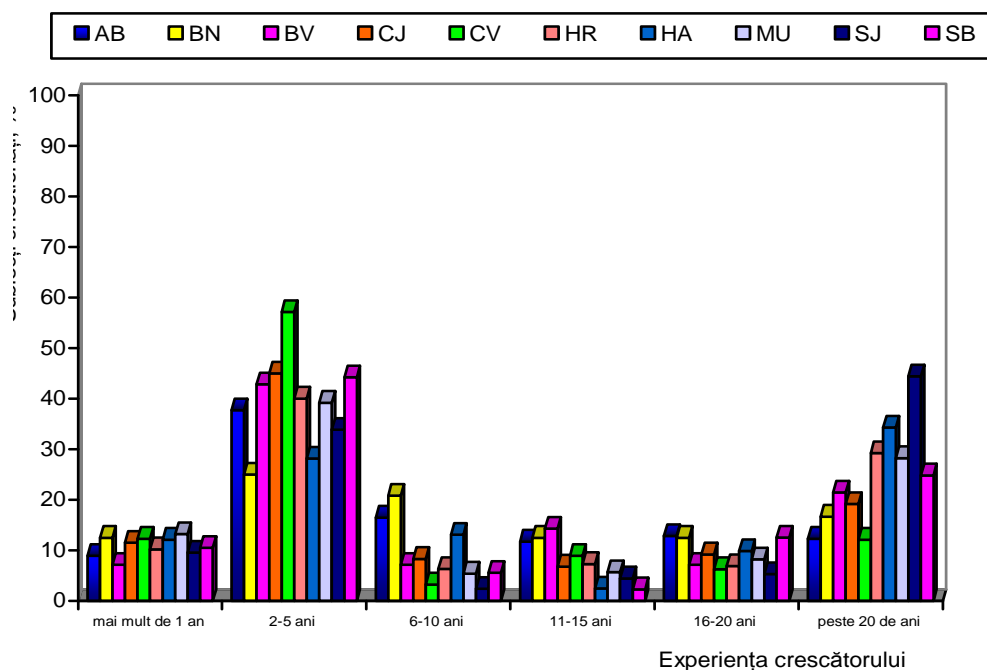


Figura 11. Experiența crescătorilor de albine prezentată comparativ pe județele studiate (% din total apicultori chestionați)

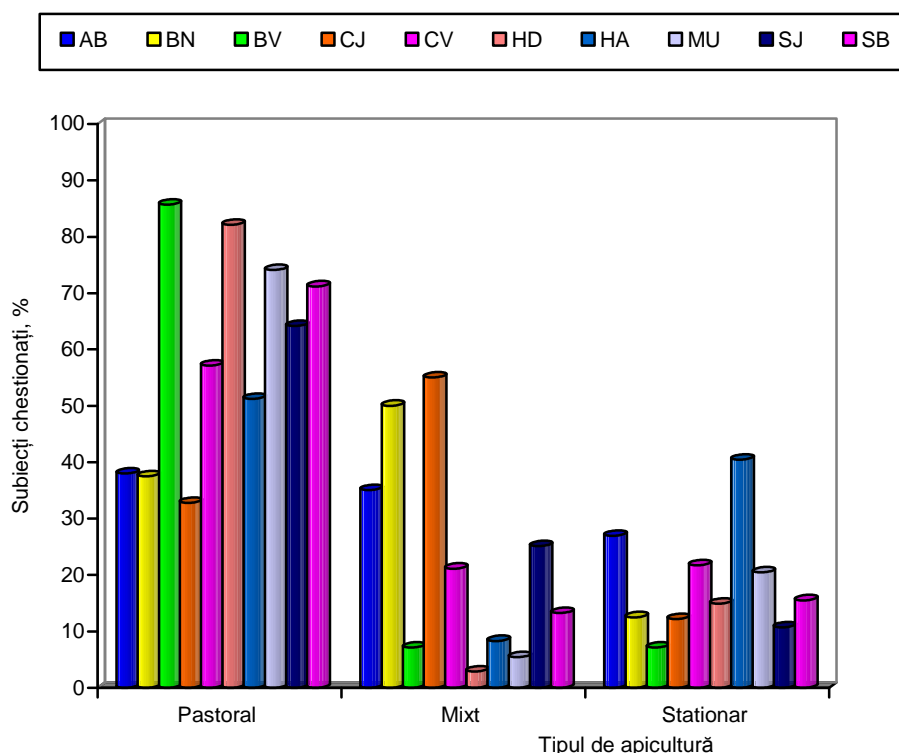


Figura 12. Tipul de apicultură practicat, prezentat comparativ pe județele studiate (% din total apicultori chestionați)

Cea mai mare proporție însă o ocupă în toate județele apicultorii care efectuează între 2 și 5 intervenții pe an, respectiv 49,51% în județul Alba, 44,23 % în județul Bistrița-Năsăud, 62,12% în județul Brașov, 54,33% în județul Cluj, 52% în județul Covasna, 44,98% în județul Harghita, 45 % în județul Hunedoara, 58,14% în județul Mureș, 58,14% în județul Sălaj și 62,14% în județul Sibiu (fig.13).

Privitor la tratamentul împotriva varoozei, acesta a fost practicat în proporție de 100% de către toți apicultorii din toate județele în care a fost distribuit chestionarul (fig.14).

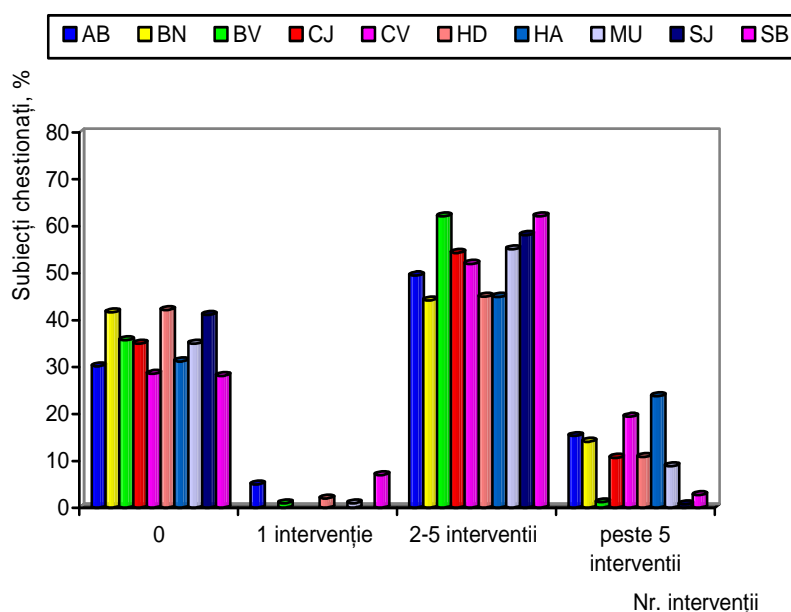


Figura 13. Numărul de intervenții practicate, prezentat comparativ pe județele studiate (% din total apicultori chestionați)

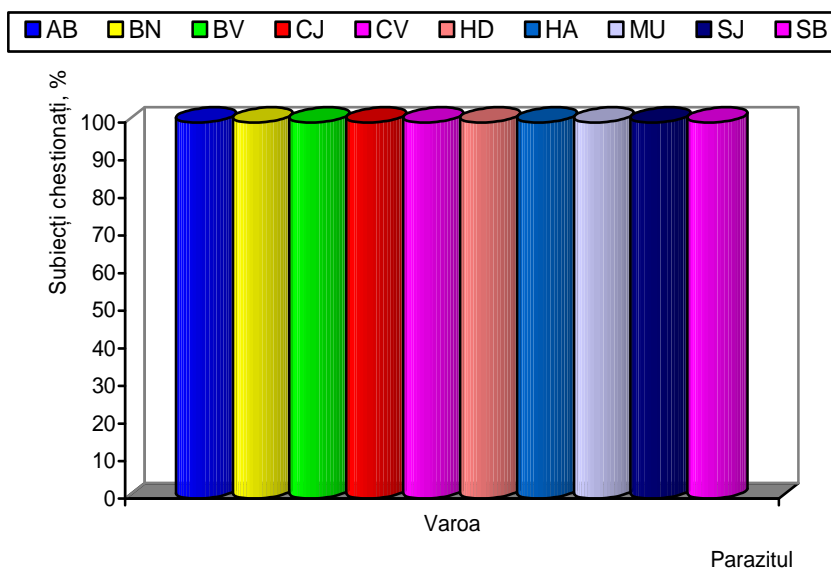


Figura 14. Tratamentele practicate împotriva Varroa, prezentate comparativ pe județele studiate (% din total apicultori chestionați)

Rezultatele experimentelor desfășurate în cele 10 județe din Transilvania în ceea ce privește comportamentul igienic al albinelor din stupinele analizate (fig. 15 - 24) au condus la înregistrarea unor valori medii ale procentului de descăpăcire cuprinse în intervalul 67 – 78%, cu valoarea medie minimă de 67,54% înregistrată în județul Harghita și maximă de 78,72% în județul Cluj.

Variabilitatea observată a fost redusă, coeficienții de variabilitate având valoarea minimă de 1,74% în județul Brașov și maximă de 4,26% în județul Hunedoara (tabelul 1).



Figura 15. Celule descăpăcite, județul Alba

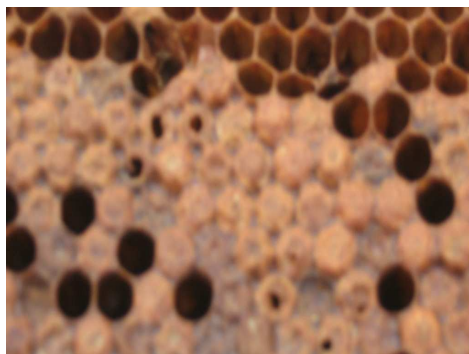


Figura 16. Celule descăpăcite, județul Bistrița - Năsăud



Figura 17. Celule descăpăcite, județul Cluj

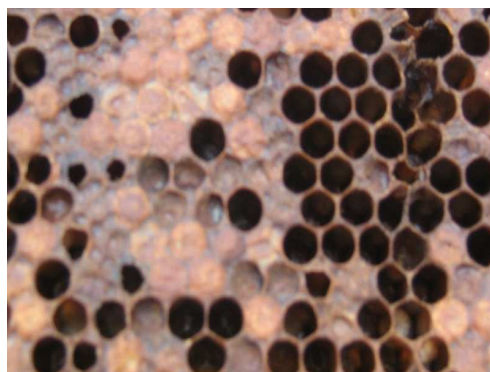


Figura 18. Celule descăpăcite, județul Covasna

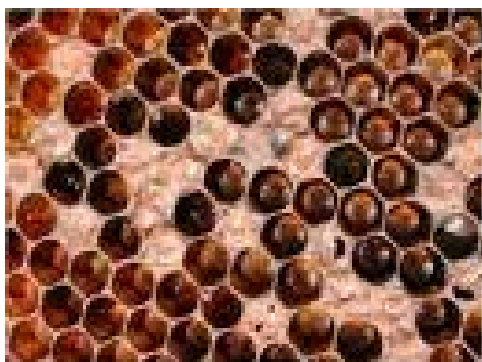


Figura 19. Celule descăpăcite, județul Harghita



Figura 20. Celule descăpăcite, județul Hunedoara

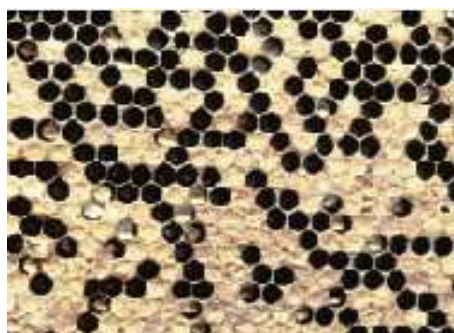


Figura 21. Celule descăpăcite, județul Mureș

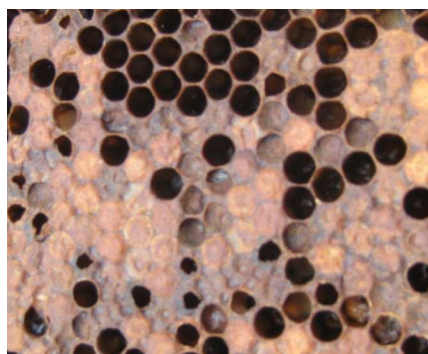


Figura 22. Celule descăpăcite, județul Satu-Mare

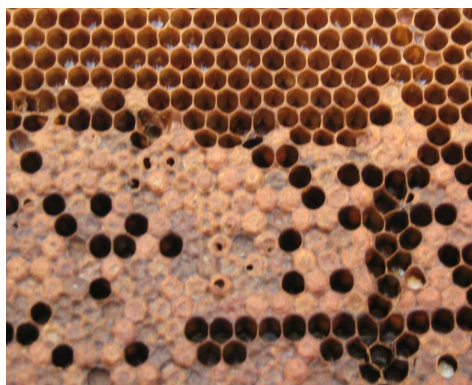


Figura 23. Celule descăpăcite, județul Sălaj



Figura 24. Celule descăpăcite, județul Sibiu

Tabelul 1. Valorile medii și indicii dispersiei pentru procentul de celule descăpăcite în cadrul experimentului de testare a comportamentului igienic la albinele din stupinele studiate în județele din Transilvania

Județul	Numărul de celule testate	\bar{X}	\pm	$s_{\bar{X}}$	s	V%
Alba	400	71,375	\pm	0,231	1,462	2,049
Bistrița - Năsăud	400	69,625	\pm	0,322	2,034	2,922
Brașov	400	69,625	\pm	0,192	1,213	1,742
Cluj	400	78,725	\pm	0,343	2,172	2,759
Covasna	400	71,400	\pm	0,306	1,932	2,706
Harghita	400	67,548	\pm	0,257	1,628	2,411
Hunedoara	400	70,225	\pm	0,473	2,991	4,260
Mureș	400	69,100	\pm	0,284	1,795	2,597
Sălaj	400	70,350	\pm	0,331	2,095	2,977
Sibiu	400	77,825	\pm	0,275	1,738	2,233
TOTAL	4000	71,58	\pm	0,298	1,873	2,349

Distribuția procentului de descăpăcire a celulelor în funcție de frecvența rezultatelor conduce la o histogramă asimetrică, aserțiune confirmată și de valoarea coeficientului de asimetrie a lui Pearson $\alpha = 0,38$. Valoarea pozitivă calculată pentru acesta, indică asimetria de dreapta.

În ciuda discontinuității (nu s-au înregistrat valori ale procentului de descăpăcire în intervalul 72 – 76%), datorită gradului moderat asimetric ($\alpha = 0,38$), se poate aprecia că valoarea medie (71,58%) pe ansamblul județelor studiate are o reprezentativitate corespunzătoare. Proporția de descăpăcire situată în intervalul 70 – 72 % este cea mai frecventă (fig. 25).

Distribuția procentului de descăpăcire a celulelor în funcție de frecvența rezultatelor conduce la o histogramă asimetrică, aserțiune confirmată și de valoarea coeficientului de asimetrie a lui Pearson $\alpha = 0,38$. Valoarea pozitivă calculată pentru acesta, indică asimetria de dreapta.

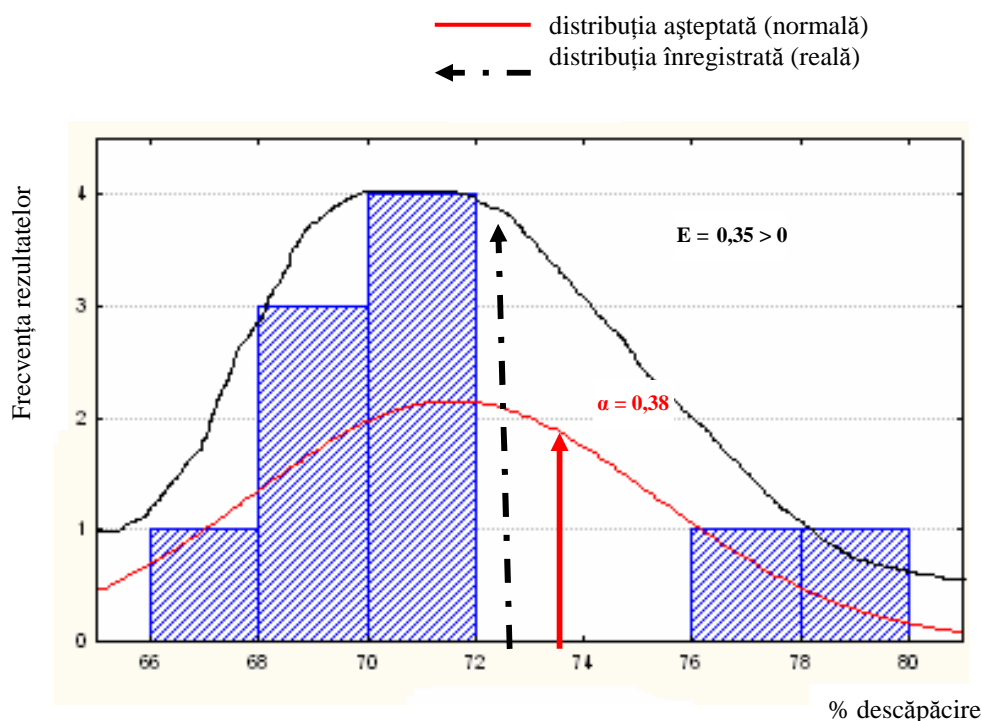


Figura 25. Distribuția valorilor medii ale procentului de celule descăpăcite

În ciuda discontinuității (nu s-au înregistrat valori ale procentului de descăpăcire în intervalul 72 – 76%), datorită gradului moderat asimetric ($\alpha = 0,38$), se poate aprecia că valoarea medie (71,58%) pe ansamblul județelor studiate are o reprezentativitate corespunzătoare. Proporția de descăpăcire situată în intervalul 70 – 72 % este cea mai frecventă (fig. 25).

Valoarea kurtosisului ($E = 0,35 > 0$) ne indică o repartiție leptokurtică, care vine să confirme rezultatul analizei parametrului asimetriei, conform căreia valoarea medie a procentului de descăpăcire (71,58%) pe ansamblul județelor studiate are o reprezentativitate corespunzătoare (fig. 25).

Rezultatele obținute demonstrează că în nici una dintre stupinele studiate, familiile de albine analizate nu au manifestat comportament igienic.

Procentul mediu de descăpăcire a înregistrat valoarea maximă în județul Cluj, maximumul înregistrat fiind de 78,72%, situat mult sub limita de 91% de la care familiile de albine se consideră că manifestă rezistență naturală la boli și paraziți ca urmare a comportamentului igienic.

Cea mai mică medie pentru procentul de descăpăcire a fost înregistrată în județul Harghita, 67,54%.

2.4. MECANISME ANATOMICE

Sturtevant și Revell, 1953 (citați de Morse, R.A. & Flottum, K. Eds., 1997) au arătat că speciile de albine diferă între ele în ceea ce privește capacitatea lor de a reduce numărul de spori aparținând *B.larvae* din mierea depozitată produsă din siropul de zahăr contaminat.

Ei au sugerat că la baza acestui fenomen ar sta mecanismul de filtrare a sporilor prin valva proventriculară. Ipoteza acestor cercetători a fost confirmată și de rezultatele cercetărilor realizate de Plurad și Hartmen, 1965 (Moritz și Hanel, 1984, în Honey Bee Pests, Predators, and Diseases, Morse, R.A. & Flottum, K. Eds., 1997), dar cu toate că aceste studii au demonstrat implicațiile

variabilității genetice în procesul de îndepărtare a sporilor, nu au reușit să conducă la concluzii care explică mecanismul propriu-zis.

Ei au mai sugerat și faptul că pe lângă acțiunea de stopare a invaziei sporilor exercitată de **valva proventriculară**, în reducerea numărului acestora ar mai putea fi implicate și mecanisme bacteriostatice sau bactericide.



Rezultate promițătoare în obținerea unor familii de albine cu rezistență crescută la boli au fost înregistrate odată cu identificarea genelor responsabile de sinteza polipeptidelor microbiene, ce alcătuiesc echipamentul imunitar al organismului acestora (defensinele, apidecinele, abaecina și himenoptecina) utilizat contra atacului agenților patogeni, aspect cu importanță crescută odată cu apariția ipotezei conform căreia cunoașterea aprofundată a precursorilor și mecanismelor lor de acțiune ar putea conduce la producerea unei noi clase de antibiotice. Markerii moleculari utilizați în selecția efectuată în acest scop au devenit deja disponibili și au început să fie utilizați în practică.



Progresul înregistrat în ultimele decenii în domeniul geneticii moleculare a pus la dispoziția cercetătorilor mijloacele suplimentare ce pot fi utilizate cu succes în combaterea bolilor și a dăunătorilor albinelor. Luând în considerare mecanismele genetice (fiziologice, anatomice, dar mai ales comportamentale) putativ implicate în rezistența la boli și dăunători, cercetările au fost îndreptate în direcția găsirii unor markeri moleculari specifici cu ajutorul cărora să se identifice populații de albine ce prezintă rezistență naturală, iar pe baza acestora să se întocmească programe de selecție în vederea înmulțirii coloniilor ce prezintă aceste caractere.



Pe baze experimentale s-a demonstrat faptul că albinele prezintă comportament igienic (parte a mecanismelor genetice comportamentale identificate la albine) iar acesta se presupune că ar constitui baza rezistenței la paraziți și boli. O determinare exactă a numărului, poziției în genom și a nivelului relativ de influență a locilor ce influențează direct comportamentul igienic la *Apis mellifera* L. se poate realiza cu ajutorul markerilor ADN asociați cu genotipurile igienice.



CAPITOLUL III

MARKERI MOLECULARI ASOCIAȚI CU REZISTENȚA LA PARAZIȚI ȘI BOLI LA ALBINE

Genetica hymenopterelor are un istoric de peste 150 de ani (Page Jr., R.E. și col., 2002), perioadă de-a lungul căreia și-a adus contribuția la elucidarea mecanismelor ce stau la baza determinării genetice a sexului, a evoluției genomului și însușirilor adaptative, precum și la determinarea genetică a comportamentului.

În ultimele decade, ca urmare a evoluției rapide a tehnicilor de biologie moleculară și acumulării de date privitoare la mecanismele rezistenței la boli și paraziți s-au înregistrat progrese din ce în ce mai mari în procesele de selecție a albinelor rezistente la agenții patogeni. Tehnicile specifice biologiei moleculare fac posibilă localizarea și vizualizarea directă la nivel molecular a markerilor moleculari, precum și a genelor de interes.

Markerii moleculari joacă un rol esențial în toate procesele de identificare a rezistenței la boli și paraziți la insecte în general și albine în particular.

Markerii moleculari pot fi definiți ca fragmente de ADN noninformaționale (regiuni hipervariabile de ADN sau introni), sau uneori chiar gene informaționale (gene funcționale) utilizate pentru detectarea segmentelor cromozomiale implicate în manifestarea unui caracter precum și a genelor care stau la baza manifestării acestora.

Markerii moleculari ideali sunt cei cu polimorfism ridicat, caracterizat prin posesia a două sau mai multe alele diferențiabile, codominante și care pot fi diferențiate cu mare ușurință. Cu toate acestea, nu toți markerii se pretează la orice studiu. Potențialele lor aplicații sunt strâns legate de specificul studiului realizat.

În vederea obținerii unor rezultate optime prin utilizarea tehnicilor moleculare efectuate în vederea efectuării studiilor filogenetice, ecologie, evolutive, sau a comportamentelor complexe, markerii moleculari ideali (Cruickshank, R.H., 2002), indiferent de specie, ar trebui să corespundă unor caracteristici comune:

1. Să fie prezenți într-o singură copie (sau copii omogene multiple)

În genoamele haploide, un marker molecular ideal ar trebui să fie prezent într-o singură copie, deși nu este întotdeauna ușor de identificat care marker este cel prezent într-o singură copie, iar amplificarea unei singure copii este deseori greu de realizat.

Copiile multiple corespund de asemenea unui marker ideal, dacă toate copiile prezintă aceeași secvență, astfel încât rezultatul să fie identic indiferent de copia secvențată. Acestea sunt ușor de amplificat și produc benzi consistente, ușor de vizualizat.

Există două tipuri de gene care se încadrează în această categorie:

- **genele mitocondriale** și
- **genele ribozomale nucleare.**

2. Să fie ușor de aliniat

Datorită delețiilor și duplicării unor regiuni mici de ADN, lungimea unei gene poate varia mult între specii, sau chiar între rase, motiv pentru care secvențele ar trebui aliniate anterior analizei genetice.

Aceasta este ușor de realizat pentru genele ce codifică proteinele, datorită breșelor produse în mod obișnuit în grupuri de câte trei, corespunzând codonilor. La genele ribozomale, care nu sunt traduse în proteine și nu au această structură de codon cu trei perechi de baze, alinierea poate să se dovedească mai greu de realizat.

Incertitudinea alinierii va conduce la rezultate incerte ale analizei. În aceste cazuri, fie se vor îndepărta regiunile cu alinieri incerte, fie se va utiliza o structură informativă secundară în vederea obținerii unei alinieri cunoscute (Gates y și col., 1993, Kjer, 1995, citați de Cruickshank, R.H., 2002).

3. Toate situs-urile să poată varia în aceeași măsură

Datorită structurii de codon a genelor ce codifică proteinele, doar o treime din situs-uri pot varia liber fără a se altera secvența proteică. Este foarte probabil ca mutațiile care alterează structura proteică să aibă un efect de deleție asupra funcției sale, astfel că aceste modificări, numite substituții nesinonime, sunt nedorite. Din acest motiv doar o treime din situs-urile secvențate se presupune că ar avea valoare informativă.

4. Rata de substituție să fie suficient de ridicată pentru a furniza un număr suficient de situs-uri

Markerii diferiți evoluează la niveluri diferite, astfel că este foarte important să se aleagă un marker cu o rată de substituție adecvată scopului în care este utilizat. Spre exemplu, în cazul unor specii înrudite, o genă cu un grad înalt de substituție va trebui să acumuleze un număr suficient de mutații în timpul scurt al evoluției speciilor respective.

5. Rata de substituție să fie suficient de scăzută pentru a evita un număr excesiv de substituții multiple

Dacă se utilizează o genă neadecvată, vor exista situs-uri în care s-au produs două sau mai multe substituții. Astfel, substituțiile ulterioare le vor masca pe cele anterioare. Acest fenomen poartă numele de saturație.

Situația poate fi exacerbată de echilibrul compoziției bazelor, care face foarte probabilă ca producerea celei de a doua mutații la un anumit situs să fie reversul stării inițiale (ex. $A \rightarrow T$, urmată de $T \rightarrow A$). La genele ce codifică proteinele se

poate produce o rată foarte mare a substituțiilor sinonime deși inițial s-au produs puține substituții nesinonime.

6. Compoziții ale bazelor sensibil diferite

Dacă compoziția bazelor este echilibrată, vor crește șansele ca aceeași mutație să se producă de mai multe ori. Aceasta va conduce la creșterea homoplaziei, ceea ce poate fi o problemă în cazul genelor mitocondriale, ce au tendința de a fi mai bogate în AT.

7. Compoziție constantă bazelor în cadrul aceleași specii

Variațiile în cadrul compoziției bazelor în cadrul aceleași specii poate conduce la probleme în analizele moleculare ale comportamentelor complexe și de filogenie.

8. Existența unor primeri universali

Din motive practice, este mult mai ușor să se utilizeze aceeași primeri pentru diverse tipuri de analize. Primerii cu aplicabilitate largă au șanse mai mari de conservare, reducându-se astfel posibilitatea producerii mutațiilor la nivelul situsului primer-ului. Cu toate acestea, trebuie evitată utilizarea primeri-lor cu un grad foarte larg de utilizare, pentru că în acest fel se poate ajunge la amplificarea unor secvențe nedorite (simbionți, paraziți, contaminanți din mediu etc.).

Astfel, în cazul studiile efectuate pe albine, este preferabilă utilizarea primeri-lor specifici hymenopterelor.

9. Să fie utilizabili pe scară largă pentru a permite integrarea rezultatelor

Utilizarea unor gene care sunt implicate în studii multiple (ecologice, comportamente complexe, filogenie etc.) se dovedește foarte valoroasă pentru că se pretează coroborării cu rezultatele altor studii conducând la rezultate fundamentate, cu un grad de siguranță superior.

Imposibilitatea ca un singur marker molecular de a satisface toate cerințele unui marker ideal este ușor de înțeles. Astfel, la nivelul markerilor situați pe genele ribozomale alinierea se poate realiza cu dificultate, dar la nivelul acestor gene se găsesc mai multe situs-uri informative decât la nivelul genelor care codifică proteinele. Chiar dacă regiunile ce nu pot fi aliniare sunt îndepărtate, rămân mai multe situs-uri informative decât cele existente la nivelul genelor de aceeași dimensiune ce au rolul de a codifica proteinele.

Deși începând cu anii '60 principalii markeri moleculari utilizați la insecte au fost alozimele, locul lor fost preluat în ultimii ani de markerii ADN. Aceasta se datorează faptului că deși tehnicile ce utilizează acești markeri sunt relativ ușor realizabile, ele nu dau informații decât despre cel mai conservat tip de ADN (ADN-ul codificator).

Tehnicile ce utilizează alozime nu sunt capabile să furnizeze date despre variația genetică existentă la nivelul ADN-ului necodificator. La insecte, însă, acest tip de ADN prezintă importanță datorită faptului că poate constitui de la 30% până la 90% din genom.

ADN-ul necodificator a primit denumirea de ”junk”, ”selfish”, sau ”parasitic” ADN. Este alcătuit din segmente nefuncționale replicate de-a lungul regiunilor cromozomiale cu funcțiuni vitale.

Pseudogenele, secvențele de ADN repetate în tandem și secvențele de ADN dispersat repetitive ce par să nu aibă funcții, dar care totuși se acumulează ca urmare a crossing-over-ului inegal, constituie exemple de ”junk – ADN” (King, R.K. și W.D. Stansfield, 2002).

Dacă se încearcă o clasificare a markerilor, aceștia ar putea fi încadrați în două categorii: **markeri proteici** și **markeri ADN** (fig. 26).

Atât markerii ADN cât și cei proteici au revoluționat științele biologice, lărgindu-le cu mult domeniile de studiu atât în domeniul biologiei aplicate cât și a celei pure, găsindu-și utilitatea chiar și în studiile de dinamică a populațiilor și filogenie.

Tehnicile de biologie moleculară bazate pe markeri genetici au condus la obținerea datelor de interes ce permit combinarea analizelor de linkage cu datele obținute cu ajutorul tehnicilor statistice de ultimă oră, ceea ce conduce la identificarea tuturor regiunilor de ADN asociate cu fenotipurile complexe, categorie din care face parte și comportamentul igienic.

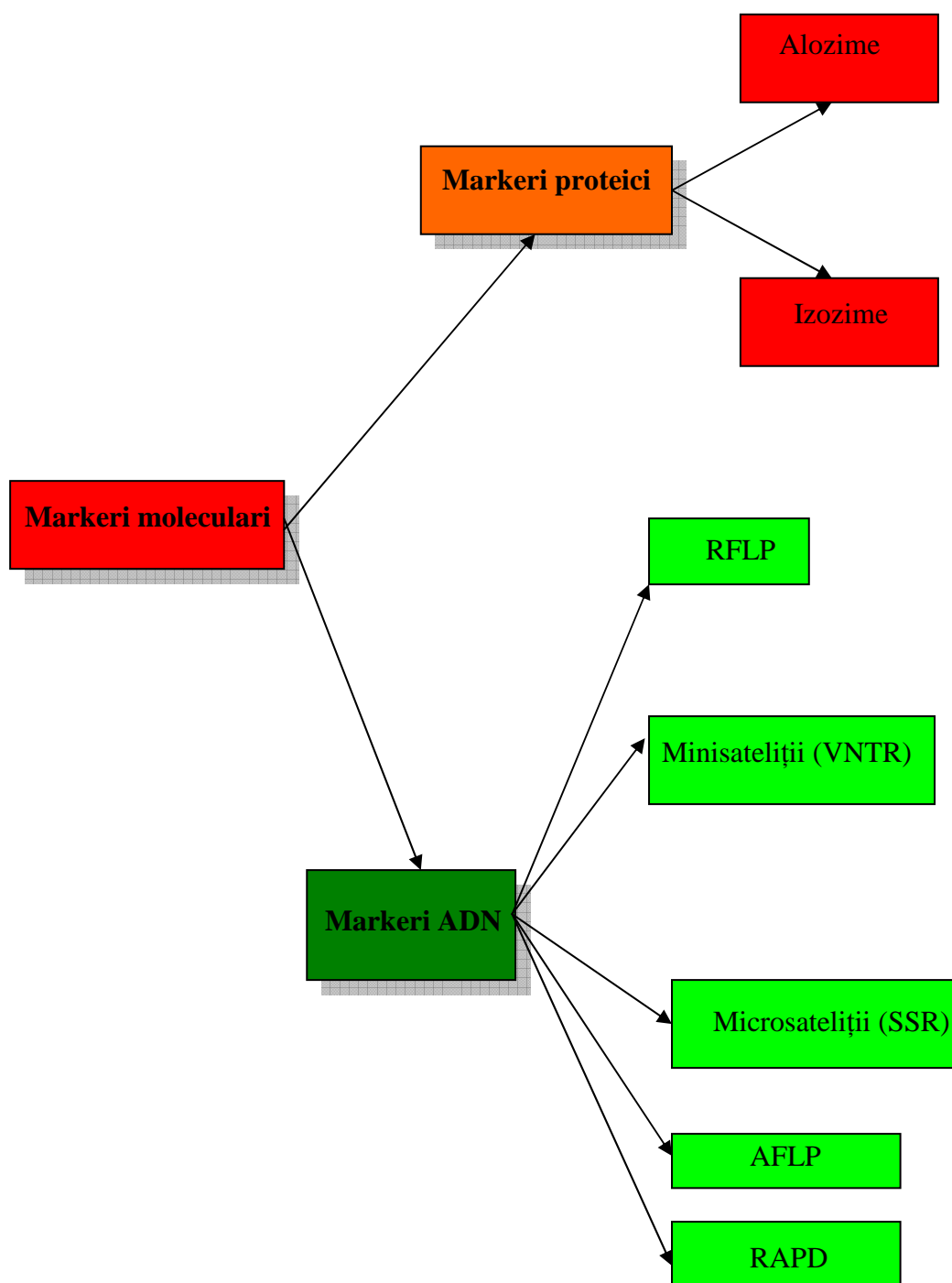


Figura 26. Clasificarea markerilor moleculari utilizați în studiile de biologie moleculară aplicate la insecte

Pe lângă tehnicile clasice, au fost dezvoltate și o serie de alte tehnici. Astfel, la albine a fost pusă la punct o metodă de generare a markerilor variabili în regiuni ale genomului adiacente secvențelor markerilor stabiliți cu ajutorul unei tehnici PCR bazate pe tehnica "walking chromosome", urmată de o analiza de restricție arbitrară. Aceasta a fost denumită ECAPS (extended cleaved amplified polymorphic site – situl polimorfic cu clivaj extins amplificat).

Pentru a putea pune în aplicare această tehnică, este însă necesară cunoașterea în prealabil a unor informații referitoare la secvența de interes (Beye, M. și col. 2001). În procesele de selecție a albinelor pentru rezistența la boli și paraziți, un rol determinant îl au atât diversitatea genetică existentă în cadrul coloniilor cât și comportamentul igienic al acestora.

Tehnologia ADN-ului recombinat și tehnicile moleculare bazate pe Reacția în Lanț a Polimerazei au revoluționat studiul geneticii comportamentale, ceea ce a avut o deosebită importanță asupra identificării locilor direct implicați în influențarea comportamentului igienic la albine și a mecanismelor prin care aceștia îl influențează (Wilkes, K. și col., 2002).

Încercările de elucidare a mecanismelor implicate în rezistența la boli a albinelor fac uz de tehnicile moleculare ce facilitează identificarea și localizarea în genomul albinelor a locilor înșușirilor cantitative (Quantitative Trait Loci – QTL). Identificarea QTL necesită alcătuirea unei hărți de linkage a genomului pe baza locilor markerilor cu polimorfism ridicat. Cartarea locilor care sunt responsabili pentru înșușirile cantitative este dificil de realizat cu ajutorul markerilor moleculari tradiționali (în speță alozimele) datorită faptului că au nivel scăzut de polimorfism și nu se găsesc în cantități suficiente în genom.

Din acest motiv sunt preferați markerii ADN, datorită polimorfismului lor ridicat și abundenței acestora în genom. De asemenea, ei prezintă avantajul că sunt neutrii din punct de vedere fenotipic, nu prezintă efecte de epistazie și sunt codominanți (Wilkes, K. și col., 2002).

Tehnicile uzuale implicate în cercetările mai sus menționate (RAPD, tehnica microsateliților, AFLP etc.) se bazează pe identificarea markerilor moleculari legați de regiunile ce controlează domeniile de interes în demersul științific condus pentru elucidarea mecanismelor de rezistență la boli și paraziți la albine.

Acestea nu sunt altceva decât variante modificate ale reacției în lanț a polimerazei - PCR. Utilizarea lor conduce la obținerea mai rapidă a hărților de linkage, precum și a unei acurateți mai mari în determinarea numărului și localizării în genom a locilor de interes (QTL) studiați în acest tip de investigații științifice.

3.1. MARKERI PROTEICI

Markerii proteici utilizați în entomologie, atât în studiul biologiei paraziților și agenților patogeni, cât și a insectelor asupra cărora aceștia acționează sunt reprezentați de **izozime** și **alozime**. Acești markeri au fost utilizați cu precădere până în momentul apariției markerilor ADN care au permis atingerea unei acurateți superioare în determinări.

3.1.1. Izozimele

Izoenzimele sau izozimele sunt proteine complexe formate din subunități de perechi polipeptidice ce catalizează importante căi metabolice (King, R.C. și Stansfield, W.D., 2002). Ele pot fi definite ca enzime cu funcții similare produse la loci diferiți, sau mai simplu, forme multiple ale unei singure enzime. Deși izoenzimele unei anumite enzime catalizează aceeași reacție, ele pot prezenta proprietăți diferite (ex. pH-ul sau concentrația la care au activitatea maximă poate fi diferit pentru izoenzimele aceleași enzime).

3.1.2. Alozimele

Alozimele sunt markerii proteici cu cea mai largă utilizare. Alozimele unei anumite enzime sunt produșii diferitelor alele la un locus specific, sau altfel exprimat, sunt proteine produse de forme alelice la același locus. Organismele diploide ($2n$) pot fi homozigote pe un anumit locus al unei enzime având două copii ale aceleași alele, sau heterozigote având alele diferite ce codifică variantele aceleași enzime. De aici provine denumirea de alozime.

Atât alozimele cât și izozimele au puncte izoelectrice diferite, motiv pentru care pot fi separate electroforetic în gel de amidon, poliacrilamidă sau acetat de celuloză utilizând amestecuri de reacție specifice enzimelor.

Acest proces de separare, după cum se va vedea în continuare, include patru etape (Loxdale, H.D. și G. Lushai, 1998):

- **Extracția.** Cea mai mare parte a enzimelor separate prin electroforeză sunt solubile, deci o rupere simplă a pereților celulari este suficientă pentru a le obține în soluție.
- **Separarea.** Proteinele sunt molecule cu sarcină electrică ce migrează în câmp electric, în consecință, proteinele cu masa diferită și proprietăți conformaționale diferite vor migra diferit. Un mediu de migrare solid, cum este amidonul sau acrilamida este necesar pentru ca separarea să se mențină după ce a fost îndepărtat câmpul electric. Acest mediu este utilizat pentru separarea moleculelor după dimensiune și formă.
- **Colorarea.** Enzimele pot fi detectate fie prin încorporarea unui colorant în produsul final, fie pot fi vizualizate direct în lumină UV dacă pe parcursul reacției apar modificări ale fluorescenței.
- **Interpretarea.** Benzile obținute pe gel sunt utilizate pentru a stabili bazele genetice ale fenotipurilor analizate și observate. Alelele separate prin electroforeză sunt identificate prin măsurarea distanței benzii de la punctul de aplicare (în cazul gelurilor din acetat de celuloză) sau de la partea superioară a gelului (pentru gelurile din poliacrilamidă) și compararea lor cu un standard de referință.

Acești markeri au diverse aplicații fiind implicați și în studiile privitoare la rezistența la insecticide a dăunătorilor (Maa & Terriere, 1983, citați de Loxdale, H.D. și G. Lushai, 1998), precum și în evidențierea paraziților himenopterelor (Walton et al., 1990ab, citați de Loxdale, H.D. și G. Lushai, 1998).

3.2. MARKERI ADN

Utilizarea markerilor ADN a permis mari progrese prin furnizarea unor date imposibil de obținut cu ajutorul markerilor proteici (ex. detalii referitoare la secvențele nucleotidice). Astfel, prin examinarea directă a ADN-ului au putut fi identificate gradele înalte de polimorfism, precum și mutațiile, inserțiile și delețiile, ceea ce nu este posibil cu ajutorul markerilor proteici.

Analizele ce utilizează markeri ADN presupun următoarele etape:

- **Extracția.** ADN-ul total este extras din celule prin liză cu ajutorul unei proteaze și separat prin precipitare cu soluție sărată de etanol 100%, sau printr-un procedeu simplificat cu Chelex (un agent de chelare polivalent de natură rezinică). Dacă extracția s-a efectuat corect, molecula de ADN nu este degradată și este compusă din fragmente de dimensiuni mari, 29 – 100 kb.
- **Clivarea.** ADN-ul extras poate fi tăiat de o manieră previzibilă și reproductibilă cu ajutorul enzimelor de restricție (endonucleaze). Acestea recunosc secvențe specifice de 4 – 6 pb lungime și clivează ADN-ul de câte ori întâlnesc secvențele respective. În cazul secvențelor întâmplătoare, enzima de restricție care recunoaște fragmente de 4 – 6 pb lungime taie molecula la de ADN la 256 pb în medie. O enzimă ce recunoaște fragmente de 6 pb lungime va efectua clivajul la fiecare 4096 pb.

- **Separarea și vizualizarea segmentelor de ADN.** De obicei, separarea prin electroforeza se efectuează în gel de agaroză. ADN-ul poate fi vizualizat în UV după colorare cu bromură de etidiu. ADN-ul genomic clivat parțial cu enzime de restricție va apărea ca o pată în gelul colorat cu bromură de etidiu datorită faptului că există foarte multe fragmente de mărimi diferite.

Pentru a putea fi utilizați, markerii ADN trebuie să posede cel puțin două alele. Doar trei tipuri de secvențe de ADN îndeplinesc această cerință: **Polimorfismele Lungimii Fragmentelor de Restricție** (RFLPs – Restriction Fragment Length Polymorphisms), **Polimorfismele Lungimii Secvențelor Simple** (SSLPs – Simple Sequence Length Polymorphisms) și **Polimorfismele unei singure Nucleotide** (SNPs – Single Nucleotide Polymorphisms). Markerii ADN cel mai frecvent utilizați pentru identificarea la populațiile de albine a unor markeri moleculari asociați cu rezistența la paraziți și boli sunt: RFLP, SSLP (minisateliții și microsateleții), RAPD și AFLP.

3.2.1. Polimorfismele lungimii fragmentelor de restricție (RFLP)

Enzimele de restricție taie moleculele de ADN la nivelul secvențelor specifice de recunoaștere. Aceasta înseamnă că la tratarea unui fragment de ADN cu o anumită enzimă de restricție va rezulta întotdeauna același set de fragmente. Cu toate acestea, nu întotdeauna se întâmplă așa în cazul moleculelor de ADN genomic, datorită faptului că situs-urile de restricție prezintă polimorfism, existând sub forma a două alele.

Una dintre acestea prezintă secvența corectă pentru situs-ul de restricție și va fi tăiată atunci când molecula de ADN va fi tratată cu enzima respectivă, iar cealaltă alelă având secvența modificată enzima nu va mai recunoaște situs-ul de restricție. Rezultatul acestei modificări a secvenței constă în aceea că cele două fragmente de restricție adiacente rămân împreună după tratarea cu enzima de restricție rezultând un polimorfism al lungimii. Acesta este un **Polimorfism al Lungimii Fragmentelor de Restricție (RFLP)** și poziția sa în genom poate fi determinată prin urmărirea transmiterii alelelor sale.

Fragmentele rezultate sunt inserate randomizat în plasmide ce sunt apoi clonate în colonii bacteriene. Fragmente analoge (probe de ADN utilizate în studii desfășurate în paralel) provenite de la alte organisme sunt apoi utilizate pentru a evidenția ADN-ul clonat. Odată ce ADN-ul omolog clonat (insertul de ADN care leagă probele analoge) este găsit, poate fi utilizat ca probă specifică pentru o specie, după o prealabilă izolare și purificare.

Ca urmare a capacității de detecție a ADN-ului analog pe ambele perechi de cromozomi omologi, tehnicile bazate pe RFLP produc markeri mendeleeni codominanți non-epistatici care au o puternică rezoluție genetică datorită numărului mare de combinații enzimă de restricție – probă existente.

Se preconizează utilizarea markerilor RFLP atât în vederea evidențierii rezistenței albinelor la infestările cu *Nosema apis* în studiile efectuate de R.N. Rice (2001) la coloniile de *Apis mellifera* L. din Australia. De asemenea, utilizarea acestor markeri se consideră utilă pentru secvențierea anumitor regiuni ale genomului de la *Nosema apis* în vederea diferențierii tulpinilor virulente de cele inofensive (Rice, R.N. 2001).

Deși punerea în evidență la *Apis mellifera* L. a unor markeri RFLP ce ar putea fi utilizați în vederea identificării rezistenței la boli și paraziți nu a dat încă rezultate, este utilă menționarea utilizării acestora în cazul unor microorganisme ce produc îmbolnăviri.

Astfel, Djordjevic S.P. și col. (2000) au evidențiat infestarea cu *Paenibacillus alvei* (bacterie ce constituie agentul patogen al paratifozei) atât a unor probe de miere, cât și a larvelor de *Apis mellifera* L. din Australia cu ajutorul markerilor RFLP. Această bacterie produce o toxină tiol – activată, **alveolizina**, iar identificarea genei acestei toxine cu ajutorul markerilor RFLP confirmă prezența *Paenibacillus alvei* în coloniile de albine infestate. Cercetările efectuate pe coloniile de albine din estul Australiei la care s-au înregistrat multe cazuri de paratifoza au făcut uz de Analiza de Restricție a ADN-ului Ribozomal Amplificat (ARDRA) al genei alveolizinei (Djordjevic S.P. și col. 2000).

Din izolatele de *Paenibacillus alvei* au fost amplificate fragmentele genei alveolizinei - 16S rRNA (1.555 pb) -, iar RFLP au fost detectate cu enzimele *CfoI*, *Sau3AI* și *RsaI*. Primerii alveozin specifici utilizați pentru amplificarea ADN-ului în vederea evidențierii markerilor RFLP au fost ALV100, respectiv 5' TAAAAAGGGGATGACTGTAT 3' pozițiile 1 – 20 și ALV 101 5' AATGAGGAGATGTTTCATACA 3', respectiv pozițiile 1555 – 1536. Pentru confirmarea identificarea ampliconului de 1.555 pb separat prin electroforeză s-a utilizat PCR semicuibărită cu primerii ALV 102 5' CTTGAAAGGAAGGAAAGTAC 3', pozițiile 39 – 58 și ALV 101. Endonucleazele de restricție *DraI* și *HinfI* au produs RFLP-uri identice cu cele prezise de soft-ul utilizat, în timp ce profilurile RFLP produse cu ajutorul endonucleazelor de restricție *CfoI*, *RsaI* și *AluI* nu au corespuns cu cele prezise de

program. Prezența unui număr mare de RFLP-uri în probele analizate a sugerat faptul că *Paenibacillus alvei* este o specie genetic eterogenă. Utilizarea enzimelor de restricție *Dra*I și *Hin*fI pentru analiza RFLP-urilor utilizate ca markeri moleculari în vederea identificării genei 16S rRNA a condus la identificarea cu precizie a prezenței *Paenibacillus alvei* în probele analizate, asigurând totodată diferențierea acestei specii de speciile înrudite.

3.2.2. Polimorfismele lungimii secvențelor simple (SSLPs)

Polimorfismele Lungimii Secvențelor Simple sunt profiluri de secvențe repetate care prezintă variații ale lungimii, alele diferite conțin numere diferite de unități repetitive. SSLPs pot fi multialelelice, astfel fiecare SSLP poate avea un număr de variante de lungimi diferite. Există două tipuri de SSLP: minisateliții și microsateliții.

Minisateliții

Minisateliții, cunoscuți și sub denumirea de Număr Variabil al Repetițiilor în Tandem (VNTRs – Variable Number of Tandem Repeats) sunt formațiuni în care unitatea repetitivă are o lungime mai mare de 25 pb. Aceștia nu sunt răspândiți în tot genomul, ci se găsesc în zona telomerică de la capătul cromozomilor.

Cele mai multe alele ale minisateliților au dimensiuni mai mari de 300 pb pentru că unitățile repetitive sunt relativ mari și tind să se adune mai multe într-o singură formațiune.

Conform unor cercetări de dată recentă realizate în Australia (Rice, R.N., 2001), se pare că utilizarea minisateliților ca markeri moleculari la *Apis mellifera* L. în vederea identificării rezistenței la *Nosema apis* va conduce la obținerea unor informații mult mai complete decât cele obținute până la momentul de față.

Microsateliții

Datorită dificultăților tehnice întâmpinate de procedeele utilizate în biologia moleculară, folosirea microsateliților ca markeri moleculari în studiile efectuate asupra insectelor cu comportament social este de dată recentă (Estoup și col, 1993, 1994 citat de Rowe și col, 1997).

Microsateliții sau secvențele simple repetate (SSR – simple repeat sequence) sunt fragmente de ADN compuse din secvențe foarte scurte (2 – 6 pb) bazate pe repetiții în tandem. Aceștia pot fi homopolimeri ('... TTTTTTTT ...'), repetiție dinucleotidică ('... CACACACACACACA'), trinucleotidică ('... AGTAGTAGTAGTAGT...') etc. CACACACACA este secvența cel mai des întâlnită. Datorită acțiunii polimerazei, pe parcursul replicării ADN-ului există puține șanse ca aceste secvențe repetate să fie alterate. Se pot crea sau îndepărta copii ale unităților repetate.

Microsateliții au variabilități foarte mari, motiv pentru care există lungimi diferite ale aceluiași microsatelit în doi cromozomi diferiți. Microsateliții alcătuiesc cea mai mare parte a heterocromatinei din jurul centromerului.

Unicitatea lor constă în faptul că mulți dintre aceștia sunt asociați cu locii care conțin regiuni codificatoare.

Schimbările de baze în aceste repetiții se produc mult mai frecvent decât în regiunile codificatoare, iar variația polimorfismului lungimii poate fi înregistrată.

Exemple de microsateliți:

- (CA)_n – repetiție simplă
- (CAAAC)_n - repetiție simplă
- (CACTG)_n - repetiție simplă

O limitare majoră a SSR constă în timpul și costul necesare izolării și caracterizării fiecărui locus, atunci când nu există anterior o secvență de ADN disponibilă. Acest proces necesită construirea și evidențierea unei biblioteci genomice alcătuită din fragmente de ADN selectate în funcție de dimensiune cu probe specifice de SSR, urmată de secvențarea clonelor pozitive izolate, sinteza primerilor PCR și testarea (Edwards, K.J. și col., 1996 și Ostrander E.A. și col., 1992 citați de Hayden, M.J. și col., 2001).

Doar după aceasta poate fi determinat numărul de copii, informațiile pe care acestea le dau și poziția cromozomială a locilor SSR.

Economiile semnificative atât în ceea ce privește costul cât și timpul ce au putut fi realizate datorită renunțării la evidențierea bibliotecilor de gene, în același timp cu obținerea de informații pentru mai mult decât un locus SSR pentru fiecare clonă plasmidică. Au fost încercate o serie de îmbunătățiri ale tehnicii utilizării microsateliților ca markeri genetici.

Microsateliții s-au dovedit a fi instrumente deosebit de utile în analiza genetică a coloniilor de insecte sociale. Cu ajutorul lor, a fost determinată compoziția genotipică a coloniilor și a fost pusă în evidență variabilitatea acestora, ceea ce are implicații directe asupra stabilirii markerilor genetici implicați în rezistența la boli și paraziți.

Neumann și col. (1997) au evidențiat genotipul și variabilitatea acestuia la *Apis mellifera* L. utilizând 4 loci ai microsateliților ADN, respectiv A76, A43, A107 și B124.

Solignac, M. și col. (2004) au alcătuit o hartă de linkage la *Apis mellifera* L. tot pe baza microsateliților. În acest scop, au fost folosiți 552 markeri descriși anterior de Solignac și col., 2003 (citați de Solignac, M. și col. 2004) alcătuiți în principal din minisateliți.

Harta genetică obținută de aceștia are o lungime de 4061 cm, cu 18% mai mare decât cea obținută de Hunt și Page (1995).

Rezultatele ale cercetărilor structurii genetice la *Apis mellifera* L., varietatea specifică bazinului Mediteranean (insulele Baleare, Spania), realizate pe baza polimorfismului microsateliților au fost evidențiate pe probe provenite din 22 de

localități (de la Rúa, P. și col., 2003). La aceste probe au fost analizați opt microsateliți polimorfici: B124, A113, A7, A8, A35, A24, A28 și A88.

Analiza structurii genetice s-a efectuat cu ajutorul programului GENEPOP version 1.2 (R a y m o n d , M. și col., 1995, citați de de la Rúa, P. și col., 2003)., iar variația microsateliților în cadrul unei populații și între populații cu ajutorul programului FSTAT version 1.2 (Goudet, J., 1995, citat de de la Rúa, P. și col., 2003). Rezultatele cercetării efectuate cu ajutorul microsateliților au demonstrat că nu există diferențe notabile în cadrul populațiilor dintr-o insulă, dar între insule există diferențieri.

Acest tip de analize prezintă deosebită importanță în cartarea locilor implicați în rezistența la boli și paraziți la *Apis mellifera* L. cu ajutorul markerilor moleculari. Deși implicarea cercetărilor structurii genetice a albinelor și a filogeniei în studiile de genetică moleculară privitoare la rezistența la boli este indirectă, datele obținute în urma acestor studii contribuie la facilitarea stabilirii markerilor moleculari cu ajutorul cărora se vor alcătui hărțile de linkage și se vor stabili QTL cu rol în mecanismele de rezistență la boli și dăunători.

La populații de *Apis mellifera* din Costa Rica (S e g u r a , J.A.L., 2000) au fost puse în evidență niveluri ridicate de variabilitate genetică cu ajutorul a doi markeri genetici cu polimorfism înalt evidențiați în genom (microsatelitul A7 și regiunea intergenică COI - COII din ADNmt).

Pentru analiza regiuni intergenice mitocondriale COI - COII au fost utilizați primerii 5' TCTATACCACGACGTTATTC 3' și 5' GATCAATATCATTGATGACC 3' legați de pozițiile nucleotidice 3090 și 3940,

pe baza hărții mitocondriale realizată la *Apis mellifera* L. de Crozier și Crozier (1993).

Determinarea dimensiunii exacte a alelelor la nivelul microsatelitului A7 cu secvența miez (CT)₃(T)₇CCTTCG(CT)₂₄ (Estoup, A. și col., 1995) s-a dovedit dificilă. Aceasta s-a datorat faptului că secvența miez mai sus menționată include repetiții a câte două și a unei singure nucleotide.

Estoup, A. și col. (1993) au pus în evidență la albine (*Apis mellifera* L.) un set de microsateliți alcătuit din repetiții cu predominanță perfectă, 52 (CT)_n și 23 (GT)_n la distanțe de 15 kb și respectiv 34 kb. Așa cum era și de așteptat, autorii au identificat un nivel ridicat de polimorfism intrapopulațional în studiile referitoare la localizarea microsateliților la *Apis mellifera* L.

Acestea au o distribuție asociativă și regiunile care le flanchează sunt suficient de asemănătoare pentru a putea permite amplificarea PCR și al alte specii de albine și vor putea fi utilizați în evidențierea QTL implicați în comportamentul igienic al acestora.

Studiile efectuate de acest grup de cercetători (Estoup, A. și col., 1995) au fost continuate pe populații de albine aparținând la 3 subpopulații ale *Apis mellifera* L. cu scopul de a identifica variația microsateliților și implicațiile acesteia în structura genetică ierarhică a populațiilor. Dintre cei 75 de microsateliți cunoscuți la *Apis mellifera* L. (Estoup, A. și col., 1993) au fost utilizați 12 microsateliți, dintre care șapte au fost implicați în toate studiile (A7, A24, A28, A43, A88, A113, B124), iar patru doar în studiul unei singure subpopulații (A14, A35, A29, A76, și A107).

Analizele de linkage au arătat că dintre aceștia, 11 sunt independenți genetic. Pentru identificarea minisatelților au fost desemnate perechi de primeri specifici 5'- 3'. Structura genetică identificată a fost determinată cu ajutorul programului GENEPOP version 1.2. (Raymond și Rousset, 1994, citați de Estoup, A. și col., 1995).

Utilizarea acestor microsateliți în studiul de față a evidențiat faptul că acești markeri ADN pot fi utilizați cu succes în cercetările privitoare la identificarea variabilității în cadrul unei specii, dar și între specii.

De asemenea, folosirea microsateliților a confirmat existența și compoziția celor trei ramuri evolutive după care Ruttner și col. în 1978 (citați de Estoup, A. și col., 1995) au presupus pe baza analizelor morfometrice că ar fi evoluat subspeciile de albine (A – subspeciile africane, M – subspeciile din Vestul Europei și C – subspeciile asiatice și din Nordul Mediteranei), precum și posibilitatea de a diferenția subspeciile și populațiile din cadrul speciilor.

Cu ajutorul microsateliților și STMP (Hayden M.J. și col., 2001) Lapidge și col. (2002) au pus în evidență șapte QTL ce influențează comportamentul igienic la albine, stabilind un punctaj numeric al nivelului mediu al acestuia. Dintre aceștia, șase au prezentat un linkage sugestiv cu locii ce contribuie la exprimarea variației fenotipice a comportamentului igienic al albine, iar al șaptelea a prezentat un linkage puternic.

Cu toate acestea, în cadrul experimentului nu s-a identificat nici un QTL cu efect major asupra comportamentului igienic, însă se pare că acest comportament este moștenit de manieră cantitativă.

Cercetări efectuate în Australia de către Rowe și col. (1997) au descoperit la *Apis mellifera* șapte microsateliți (B7, ED-R, FE1, FE2, FM-F, GJ, HC) și o secvență putativă minisatelit (GH-F). Dintre aceștia cinci sunt repetiții GA (trei repetiții perfecte, două imperfecte și una perfectă întreruptă), unul constă în repetiții perfecte AT, iar cel de al șaptelea este o repetiție mononucleotidică T.

Pentru evidențierea microsateliților au fost utilizate 12 clone cu sonde (GA)₁₀ și o clonă GH pentru evidențierea secvenței putativ minisatelit. Utilizarea microsateliților în acest caz se datorează faptului că pot fi caracterizați și analizați cu ușurință. Pentru identificarea minisateliților și microsateliților au fost desemnate perechi de primeri specifici 5'-3' cu lungimi între 110 – 270 pb pentru microsateliți și 220 pb pentru secvența putativ minisatelit.

Pentru **microsateliți** au fost utilizate perechile de primeri cu denumirile: B7-f, B7-r; ED2-f, ED2-r; FE1-f, FE1-r; FE2-f, FE2-r; FM1-f, FM1-r GJ-f, GJ-r; HC-f, HC-r, iar pentru secvența putativă **minisatelit** GM-f și GM-r. Pentru secvențele minisatelit FE1, FE2 și HC primerii nu au fost testați încă. Acești microsateliți, precum și secvența putativă minisatelit își vor dovedi ulterior utilitatea la identificarea QTL implicați în mecanismele de identificare a rezistenței la boli.

STS (Sequence-Tagged Sites) sunt markeri moleculari adesea utilizați pentru a confirma identitatea grupelor de linkage dintre diferite hărți. Un STS reprezintă o regiune scurtă din genom (cu lungimea de 200 – 300 pb) a cărei secvență exactă nu se găsește în nici o altă porțiune din genom. Această unicitate a secvenței se stabilește prin demonstrarea faptului că poate fi amplificată prin PCR.

Secvența ADN a unui STS poate conține elemente repetitive, secvențe care mai apar și în alte regiuni ale genomului, însă atâta vreme cât secvențele situate la ambele capete ale sit-ului sunt unice, se pot sintetiza primeri ADN unici complementari acelor terminații, apoi se amplifică regiunea cu ajutorul PCR și astfel se demonstrează specificitatea reacției prin electroforeza în gel produsului amplificat (D o g g e t t, N.A., 1992).

Un exemplu de STS-uri polimorfice poate fi reprezentat de un locus variabil ce conține o secvență scurtă repetată cum este secvența dinucleotidică repetitivă (GT)_n, flancată de două secvențe unice (D o g g e t t, N.A., 1992). Aceste STS-uri sunt markeri moleculari cu un înalt grad de potențial informativ și cu aplicabilitate valoroasă în analizele de linkage.

Dimensiunea produsului amplificat pentru STS-ul reprezentat în exemplul nostru de (GT)_n va diferi în funcție de valoarea lui n la acel locus, motiv pentru care STS prezintă polimorfism. Fiecare individ este purtător a două copii ale marker-ului STS, câte una pe fiecare cromozom al unei perechi omologe și fiecare copie poate avea o valoare diferită pentru n, devenind astfel o alelă diferită a STS polimorfic (fig. 27).



Figura 27. Exemplu de STS (Sequence-tagged Site) polimorfic
 (după D o g g e t t, N., 1992)

Din cei 14 loci STS descriși de Hunt și Page (1998) la albine și testați în cadrul experimentului realizat de aceștia, doar 3 au prezentat polimorfism în cazul experimentului realizat de Wilkes K. și col. (2002) în vederea realizării hărților de linkage și a determinării QTL responsabili pentru comportamentul igienic la *Apis mellifera* L. (Wilkes K. și Oldroyd, B., 2002)

În experimentele realizate de Hunt și Page câțiva markeri RAPD au fost convertiți în markeri STS (Olson și col., 1989 citați de Hunt și Page 1995) prin clonarea fragmentelor ce prezentau polimorfism și desemnarea primerilor specifici situați pe secvența nucleotidică terminală a clonei.

Primerul utilizat pentru generarea acestor markeri bazați pe STS a fost stsQ16.58, 5'AGTGCAGCCAGCTACTGAGAG.

Subramanian, S. și col. (2002) au pus la punct un sistem de bază de date a microsateliților (MRD – microsatellite repeats database) care să permită accesul la informații referitoare la microsateliții din genoamele eucariotelor a căror secvențe informaționale sunt disponibile.

MRD stochează informații referitoare la secvențele simple repetate în tandem de k-ori, unde $k = 1 - 6$ (de la monomer până la hexamer). Astfel, este asigurat accesul la informații referitoare la distribuția microsateliților aflați în regiunile codificatoare precum și în cele necodificatoare ale genomului.

Se pare că cercetările efectuate în Australia cu scopul identificării de markeri moleculari implicați în mecanismele de rezistență a albinelor la *Nosema apis* au

condus la concluzia că utilizarea microsateliților în acest scop ar da rezultate pozitive, în majoritatea cazurilor.

Mai mult, se preconizează acești markeri au un potențial ridicat pentru a fi folosiți pentru a face distincție între speciile virulente și cele nevirulente ale *Nosema apis* ce infestază coloniile de *Apis mellifera* L. (Rice, R.N., 2001).

PCR este o tehnică ce s-a dovedit indispensabilă în evidențierea STS (sequence-tagged sites), markeri moleculari ce constau din secvențe scurte de ADN (200 – 500 pb) ce inițial au fost identificate în genomul uman și au proprietatea că se găsesc doar într-o anumită zonă a genomului și într-o singură copie. Ele provin din ADNc (www.hyperdictionary.com).

Ulterior, acești markeri au fost utilizați și la alte specii, la albine fiind implicați în studiile de identificare a comportamentului igienic (Lapidge, K.L. și col., 2002). Utilizarea STG facilitează identificarea QTL în genomul *Apis mellifera* L. și alcătuirea hărților de linkage (Hunt G.J., 1997 citat de Lapidge, K.L. și col., 2002).

Doggett, N. (1992) prezintă un exemplu a modului în care un locus variabil ce conține o secvență scurtă repetată, cum este dinucleotida (GT)_n flancată de două secvențe unice, poate deveni STS (fig. 27). Dimensiunea produsului amplificat pentru acest STS va diferi în funcție de valoarea lui *n* la locus-ul respectiv, deci STS este polimorfic. Fiecare individ este purtător a două copii ale marker-ului STS unul pe fiecare cromozom al unei perechi omoloage și fiecare copie poate avea o valoare diferită a lui *n* constituind astfel o alelă diferită a STS polimorfic.

STS este un marker polimorfic ce se transmite la descendenți (fig. 28). În gelul obținut în urma electroforezei sunt evidențiați produșii PCR pentru fiecare STS a fiecărui membru al familiei. Cele două alele ale tatălui sunt diferite de cele două alele purtate de mamă, iar descendenții moștenesc câte o alelă a STS de la fiecare părinte (fig. 28 și 29).

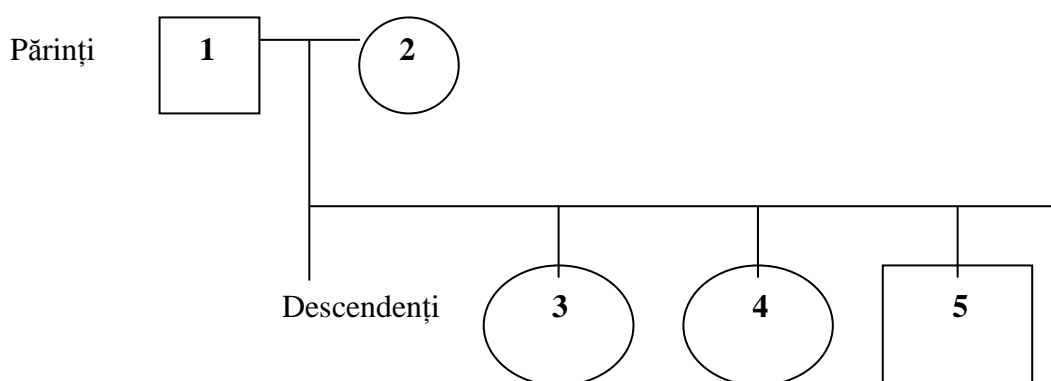


Figura 28. Transmiterea la descendenți a STS (după Doggett, N., 1992)

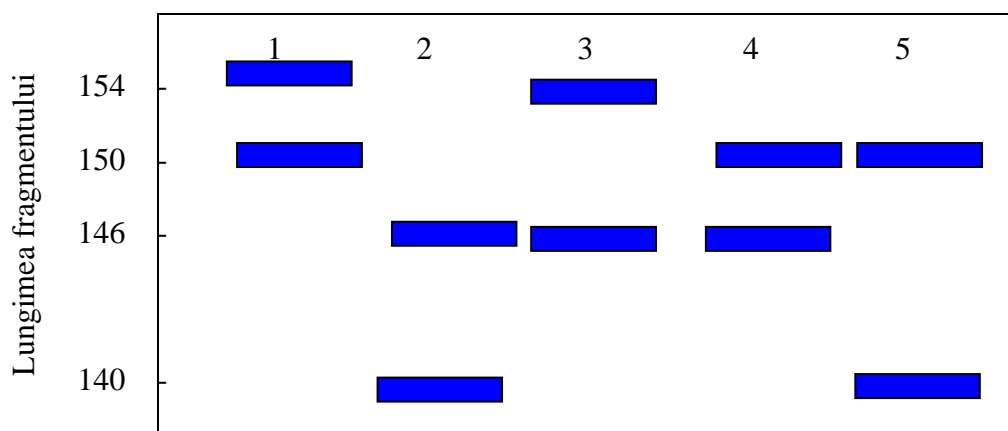


Figura 29. Gelul de electroforeză al produșilor PCR ai STS polimorfici (după Doggett, N., 1992)

3.3.3. Polimorfismul lungimii fragmentelor de ADN amplificate (AFLP)

Acest tip de markeri sunt de fapt forme modificate ale RFLP, în care este evidențiată prezența sau absența fragmentelor de restricție și nu diferențele dintre acestea în ceea ce privește lungimea lor.

Din acest motiv, nu este posibilă identificarea imediată a formei homo- sau heterozigoției unui locus din prezența sau absența unei benzi pe gelul de electroforeză. ADN-ul genomic este evidențiat prin utilizarea unui situs comun și rareori cu ajutorul unei enzime specifice care clivează situs-ul la un anumit locus.

Secvențele nucleotidice „adaptoare” sunt ligate în aceste fragmente de ADN. Aceste secvențe AFLP constau din două părți, o așa-zisă secvență miez și o secvență enzimatică specifică. Dacă aceste două situs-uri se găsesc la o distanță convenabilă pentru amplificare, în urma amplificării PCR se produc cantități discrete de ADN. Polimorfismele sunt amplificate și vizualizate în gel de poliacrilamidă utilizând autoradiografia.

Markerii AFLP sunt utilizați cu predilecție pentru a face distincție între organisme cu grad de înrudire foarte apropiat, inclusiv liniile izogene.

Diferențele dintre lungimile fragmentelor generate cu ajutorul tehnicii care implică markerii AFLP pot fi identificate pe baza modificării bazelor aflate la nivelul situs-ului de restricție, ori a inserțiilor sau delețiilor din fragmentul respectiv de ADN.

Markerii AFLP trebuie tratați de obicei ca markeri dominanți, pentru că identitatea homo- sau heterozigoților nu poate fi stabilită decât dacă studiile de pedigree sunt conduse în vederea determinării schemelor de transmitere a echipamentului genetic sau a unei anumite însușiri sau grupuri de caractere, de la părinți la descendenți, pe fiecare bandă obținută în gelul de electroforeză (A m a d o r , D.M., 2001).

Avantajele utilizării markerilor AFLP constau în faptul că permit vizualizarea seturilor de fragmente de restricție cu ajutorul PCR fără cunoașterea prealabilă a secvenței nucleotidice, precum și în aceea că prin utilizarea lor este posibilă co-amplificarea specifică a unui număr mare de fragmente de restricție, de obicei între 50 și 100.

În comparație cu alte tehnologii care utilizează markeri genetici, de exemplu RAPD, RFLP sau microsateliții, AFLP oferă aceeași performanță sau chiar una superioară în termenii reproductibilității, rezoluției și eficienței în timp.

Cu toate aceste însușiri, markerii AFLP au devenit un standard molecular cu un spectru larg de aplicabilitate pretându-se la investigații din domeniul sistematicii până la cele de genetica populațiilor, (V o s , P. și col., 1995, S a v e l k o u l , P.M.H. și col., 1999).

Identificarea AFLP la *Apis mellifera* L. prezintă particularități specifice speciei. Din acest motiv, protocolul de bază utilizat în vederea identificării acestui tip de polimorfism a fost simplificat și optimizat, efectuându-se o serie de modificări

atât în procesul de digestie a ADN-ului, cât și a enzimelor de restricție și a gelului în care se efectuează migrarea electroforetică.

De asemenea, vizualizarea s-a făcut cu bromură de etidiu și nu prin autoradiografierea primerilor marcați. În acest fel s-a obținut o reproductibilitate ridicată a benzilor obținute prin electroforeza produșilor PCR și o sensibilitate scăzută la condițiile de amplificare (Suazo, A. și col., 2004)

3.3.4. Polimorfismul ADN-ului amplificat la întâmplare (RAPD)

Polimorfismul ADN-ului amplificat la întâmplare (RAPD) reprezintă polimorfismul unei secvențe nucleotidice utilizând un test bazat pe amplificarea ADN-ului în care se face uz doar de o secvență nucleotidică aleasă arbitrar, uneori palindromică.

Această evidențiere a polimorfismului ADN-ului amplificat la întâmplare implică utilizarea unui primer scurt, alcătuit cel mai frecvent din 10 baze nucleotidice. Acesta se leagă de ADN-ul genomic în două sit-uri diferite pe catene opuse ale matriței de ADN, la o distanță de circa 3000 pb.

Daca aceste două situs-uri se găsesc la o distanță convenabilă pentru amplificare, în urma amplificării PCR se produc cantități discrete de ADN. Benzile sunt vizualizate cu bromură de etidiu (Williams și col., 1990).

Prezența fiecărui produs de amplificare conduce la identificarea completă sau parțială a omologiei secvenței nucleotidice dintre ADN-ul genomic și primerul oligonucleotidic la fiecare terminație a produsului de amplificare.

Fiecare primer va dirija amplificarea mai multor loci în genom, făcând din acest test o cale eficientă de evidențiere a polimorfismului secvențelor nucleotidice la diferiți indivizi.

În acest caz, un anumit fragment de ADN care este generat doar pentru un individ și care nu coincide cu cel generat pentru alt individ prezintă un polimorfism caracteristic al ADN-ului respectiv, putând fi astfel utilizat ca marker genetic. Acești markeri sunt transmiși la descendenți pe cale mendeleeană (T i n g e y și col., 1993).

Principalul avantaj al acestei tehnici constă în aceea că nu necesită cunoașterea detaliilor referitoare la secvența de ADN.

De asemenea, acești markeri prezintă și avantajul că utilizarea lor nu implică o tehnică sofisticată și nici costuri ridicate, conducând în același timp la obținerea unor date cu un grad de complexitate superior în comparație cu cele obținute cu ajutorul altor markeri (W e e d e n și col., 1993).

Hunt și Page (1995) au alcătuit o hartă de linkage la *Apis mellifera* L pe baza markerilor RAPD, ceea ce a condus la reale progrese în procesul de identificare de markeri moleculari asociați cu rezistența la boli și paraziți.

Harta a constatat în 26 grupuri de linkage și conține gena malatdehidrogenazei (Mdh-1), gena culorii negre corporale (blk) și locusul major al determinării sexului la albină (locusul X), fiind alcătuită pe baza segregării a 365 markeri RAPD utilizând descendența haploidă de sex masculin a unei singure măci.

Markeri RAPD au fost generați cu ajutorul PCR în conformitate cu metoda elaborată de Williams și col. (1990), cu aproximativ 2,8 loci cartăți la fiecare primer 10-nucleotidic utilizat în PCR.

În experimentul efectuat de către aceștia, a fost utilizat un mascul haploid (16 cromozomi) și o femelă diploidă (32 cromozomi), proveniți din stupine comerciale din California, în vederea obținerii unei măci F1.

Aceasta a fost apoi introdusă într-o colonie, iar 94 dintre descendenții ei masculi (haploizi) au fost utilizați în vederea analizelor de linkage. S-a preferat utilizarea populației haploide pentru a evita pierderile de informație cauzate de dominanța markerilor RAPD.

Au fost evidențiați 1000 primeri pentru cei doi părinți F cât și pentru matca F1. Markerii RAPD au fost denumiți după denumirea primer-ului urmată de o linie și dimensiunea aproximativă, exprimată în kilobaze.

Secvența primerilor utilizați pentru markerii RAPD a fost 5'-AGTTGACAGAGATTAC și 5'-GCAGCCAGAATATAAGACGCTGTT.

Analizele de linkage au fost efectuate cu ajutorul programului MAPMAKER software version 2.0. Rezultatele experimentale au demonstrat că markerii RAPD

pot furniza date demne de încredere în procesul de cartare a organismelor haploide în condițiile evidențierii și selecției corecte a primerilor.

Datele obținute sunt similare celor evidențiate de Dietrich și col. în 1992 (citați de Hunt și Page, 1995) care au reușit să realizeze o hartă de linkage la șoarece pe baza SSR.

De o deosebită importanță este asocierea dintre **markerii genetici** și **locii însoșirilor cantitative** (QTL).

QTL reprezintă regiuni ale genomului ce au un efect măsurabil asupra unei însoșiri investigate. Analizele QTL au scopul de a calcula statistic o asociere dintre expresia unei însoșiri de interes și un grup de markeri genetici.

Cartarea QTL necesită existența prealabilă a unei hărți de linkage a genomului alcătuită pe baza locilor markerilor polimorfici, precum și o variație măsurabilă a însoșirii studiate în cadrul sau între populații ori specii (Falconer și Mackay 1996 citați de Wilkes și Oldroyd, 2002).

Metodele de identificare a QTL au stat la baza studiului bazelor genetice ale schemelor comportamentale complexe, din care face parte și comportamentul igienic la *Apis mellifera* L.

În vederea identificării mecanismelor implicate în comportamentul igienic la *Apis mellifera* L., Wilkes și Oldroyd (2002) au realizat experimente în care cu ajutorul mai multor tipuri de markeri ADN, printre care și markeri RAPD, au încercat să evidențieze numărul de gene care influențează comportamentul igienic

la *Apis mellifera* L., nivelul relativ de influență al acestor gene, precum și localizarea lor în genom.

Harta de linkage a fost efectuată pe baza markerilor RAPD și microsateliților la 119 trântori. Markerii RAPD au ocupat 3110 cm în cadrul a 26 grupuri de linkage, cu distanța medie dintre markeri de 9,5 cm. în condițiile în care dimensiunea genomului a fost estimată la 3450 cm (Hunt și Page, 1995).

Deși o mare parte din markerii RAPD utilizați de Hunt și Page (1995) au fost utilizați și în acest experiment, a fost imposibilă identificarea grupurilor de linkage individuale comune celor două hărți.

Aceasta era și de așteptat ținând cont de faptul că locii markerilor produc benzi diferite și prezintă niveluri diferite de polimorfism în încrucișări diferite. Analizele de linkage au fost efectuate cu ajutorul programului MAPMARKER/EXP v3.0 software, PC version (Lander et al., 1987; Lincoln et al., 1992, citați de Wilkes K. și Oldroyd, B., 2002).

Generând markeri RAPD, alături de microsateliți și STS, Lapidge și col. (2002) au alcătuit o hartă de linkage a **locilor însușirilor cantitative** asociate cu comportamentul igienic la *Apis mellifera* L. Lapidge K.L. și Oldroyd B.P. (2002) au efectuat experimentul utilizat inițial de Rothenbuhler (1964) dar au făcut uz de însămânțarea artificială (Spivak și Gilliam, 1998).

Deși conform studiilor lui Rothenbuhler (1964) sau a celor realizate de Moriz (1988) s-ar fi așteptat să obțină 2 sau respectiv 3 markeri, autorii acestui studiu au reușit evidențierea existenței a 6 markeri ce au prezentat un linkage sugestiv

pentru locii care contribuie la variația fenotipică globală legată de comportamentul igienic și unul care a prezentat un linkage puternic și un LOD semnificativ cu valoarea de 3,37.

Existența acestor șapte markeri rămâne însă de confirmat prin cercetări ce urmează a fi efectuate în continuare. Astfel, utilizarea markerilor RAPD a confirmat faptul că baza genetică a comportamentului igienic la albine este mult mai complexă decât s-a crezut inițial și că mai multe gene sunt implicate în determinarea acestei însușiri.

Cercetări efectuate la Departamentul de creștere a albinelor de la Institutul de Cercetare a Animalelor Mici de la Gödöllő, Ungaria (Hidas, A. și col., 2004) în vederea studierii toleranței diferite a populațiilor de albine din Ungaria la infestarea cu *Varroa destructor*, au utilizat markeri RAPD.

Analiza moleculară a demonstrat existența unei variabilități reduse în cadrul unei colonii, ceea ce a permis utilizarea ca probă a unui număr redus de indivizi dintr-o colonie. Markerii RAPD s-au dovedit eficienți în evidențierea rezistenței familiilor de albine studiate la Varroa.

3.2. UTILITATEA IMPLEMENTĂRII MARKERILOR MOLECULARI ÎN STUDIUL REZISTENȚEI LA BOLI ȘI PARAZIȚI LA *APIS MELLIFERA* L.

Este bine cunoscut faptul că la baza **mecanismului genetic de rezistență a albinelor la boli și dăunători**, stă **comportamentul igienic** al acestor insecte (paragraful 2.2., pag. 47).

La insecte, majoritatea comportamentelor pot fi caracterizate făcând uz de instrumentele caracteristice însușirilor cantitative (ex. agresivitatea, inteligența etc.). La albine, în particular, **învățarea și inhibiția latentă, agresivitatea**, precum și **comportamentul igienic** se încadrează, de asemenea, în categoria acestor însușiri cantitative.

O însușire moștenită cantitativ este determinată de un număr de gene care acționează împreună. Însușirile cantitative prezintă o variație ce descrisă de curba gaussiană. Un **locus al unei însușiri cantitative (QTL)** poate fi definit ca o **zonă cromozomială despre care se crede că reglează fenotipul unui organism pentru respectiva însușire cantitativă**.

Pentru a realiza o analiză a însușirilor cantitative următoarele aspecte trebuie clarificate:

- numărul genelor care influențează exprimarea însușirii cantitative studiate;
- care este nivelul de influență al fiecărei gene asupra însușirii;
- unde sunt localizate genele pe cromozom;

- care este rolul fiecărei gene.

Sunt necesare două categorii de informații în vederea realizării unei analize QTL:

1. Hartă de linkage a genomului speciei studiate.
2. Utilizarea unei metode adecvate în vederea măsurării modului de variație a comportamentului la animalele studiate.

Este necesară și efectuarea unui experiment de împerechere a animalelor a căror comportament a fost măsurat și care au fost genotipizate, cu analiza aceluiași parametri și la descendenții acestora.

Pentru prezenta mecanismul de analiză QTL trebuie să se țină cont de faptul că la majoritatea animalelor cromozomii sunt în perechi. Într-o anumită zonă cromozomială, secvențele ADN ale markerilor utilizați variază între două copii ale cromozomului. Pe parcursul meiozei, se produce crossing-over-ul și segmentele cromozomiale se schimbă între ele, rezultând recombinația genetică.

Spre exemplu, dacă există doi markeri genetici diferiți în cromozom, sunt șanse mari ca recombinația să se producă dacă aceștia sunt situați la distanță mare unul de altul, șansele fiind mici dacă sunt apropiați.

Dacă genele care reglează comportamentul studiat sunt apropiate de marker ele vor sta legate de marker pe parcursul recombinării. Dacă sunt situate la distanțe mari, probabilitatea ca acestea să rămână legate de marker este scăzută.

Localizarea QTL poate contribui și la determinarea identității genei ce influențează comportamentul studiat. În acest caz, problema constă în faptul că

localizarea QTL nu este cunoscută cu exactitate. Progresele științifice înregistrate până la momentul de față oferă date care arată doar localizarea între doi markeri (C h a n d r a, S.B.C. și col., 2001).

Această problemă poate fi rezolvată prin secvențarea porțiunii de cromozom situată între cei doi markeri („în amonte” – upstream – dinspre unul și „în aval” – downstream – dinspre celălalt). Acest lucru este posibil tehnic, dacă distanța dintre cei doi markeri nu este prea mare.

Comparând secvențele de ADN cu secvențele genelor cunoscute se poate determina identitatea genelor dintre markeri. Astfel, se pot emite ipoteze privitoare la genele situate în zona QTL ce au efect asupra comportamentului.

Pentru a stabili existența corelațiilor dintre variabilitatea comportamentului studiat și markerii utilizați se folosesc programe special elaborate în acest scop (F l i n t, J., 2003, citat de B r e e d, M.D., 2003).

Dacă se urmărește o familie inclusă în experiment (femela, masculul și descendenții lor), iar nivelul de manifestare a comportamentului este întotdeauna ridicat atunci când este prezent un anumit marker și întotdeauna scăzut când este prezent alt marker, este foarte probabil ca gena ce controlează respectivul comportament să fie în apropierea aceluși marker, pe cromozom.

Dacă variația comportamentului este mai mult sau mai puțin întâmplător legată de prezența marker-ului, între comportament și zona cromozomială respectivă există linkage scăzut, sau nu există. Nivelul asocierii dintre comportament și

localizarea pe cromozom a genei care îl guvernează poartă numele de **punctaj LOD** (McClean, P., 1998).

Cea mai mare parte a însușirilor cantitative, inclusiv însușirile comportamentale, au punctaje LOD mari pentru două până la patru localizări cromozomiale în genomul unui organism. Cu cât punctajul LOD are o valoare mai mare, cu atât se pare că este mai mare importanța genei ce reglează comportamentul respectiv.

Cu ajutorul Metodei Punctajelor LOD se pot calcula distanțele de linkage. Această metodă a fost introdusă de N.E. Morton și este o abordare iterativă în care sunt calculate o serie de punctaje LOD pentru un număr dat de distanțe de linkage (McClean, P., 1998).

Principiul metodei constă în estimarea unei distanțe de linkage, a cărei valoare va fi utilizată pentru calcularea probabilității producerii unei anumite secvențe. Această valoare va fi împărțită la valoarea probabilității producerii secvenței presupunând că genele nu sunt linkate. Apoi, se calculează logaritmul acestui raport, valoare ce reprezintă punctajul LOD pentru distanța de linkage estimată.

Se utilizează formula:

$$\text{Punctaj LOD} = z = \log \left\{ \frac{\text{probabilitatea producerii unei secvențe cu o valoare de linkage dată}}{\text{probabilitatea producerii unei secvențe fără linkage}} \right\}$$

Metoda impune folosirea mai multor astfel de distanțe de linkage la care se aplică formula de mai sus și astfel se ajunge la obținerea a mai multor astfel de punctaje LOD. Distanța de linkage pentru care s-a obținut cel mai mare punctaj LOD este considerată estimata distanței de linkage.

Această modalitate de calculare a distanțelor genetice, cu ajutorul căreia se poate determina punctajul LOD a fost inițial utilizată pentru măsurarea linkage-ului la nivelul genomului uman.

Progresul științific continuu a condus la extinderea utilizării acestei metode nu numai la genomul animal ci și la cel vegetal. Astfel, punctajul LOD a devenit un instrument util în determinarea QTL ce guvernează comportamentul igienic, ce stă la baza mecanismului rezistenței la boli și paraziți la *Apis mellifera* L.

Importanța metodei punctajului LOD este evidențiată și de utilizarea pe scară largă a algoritmilor ce stau la baza calculelor ce sau la baza acestei metode și în pachetele soft folosite pentru cartările genetice.

Un exemplu îl constituie programul MAPMAKER, de care se face uz în cercetările de cartare (McClelland, P., 1998)

3.3. GENE UTILIZATE ÎN STUDIUL COMPORTAMENTELOR COMPLEXE LA ALBINE

Din multitudinea de markeri proteici și ADN identificați la insecte (Loxdale, H.D. și col., 1998) majoritatea sunt utilizați și la albine.

Studiul acestor markeri este posibil datorită rezultatelor cercetărilor privitoare la genomul *Apis mellifera* L. efectuate pe plan mondial, se cunoaște atât secvența completă a ADN-ului mitocondrial (fig. 30), cât și genomul (Crozier, R.H. și Crozier Y.C., 1993; www.sci-ed-ga.org).

Au fost utilizate următoarele notații:

- Genele pentru RNAt - o singură literă pentru aminoacizii corespunzători
- Genele RNAt cu asteriscuri corespund celor de la *D. yakuba*.
- Genele codificatoare ale proteinelor - COI
- Genele ce codifică subunitățile 1, 2 și 3 ale citocromoxidazei c - COIII
- Genele pentru citocrom b - Cyt b
- Genele ce codifică subunitățile 1 – 6 și 41 ale NADHdehidogenazei - NDI-6 și ND4L
- Regiunea bogată în AT despre care se crede că ar conține originea replicării pe baza organizării mitocondrale a ADN-ului la *D.melanogaster* (Goddard și

M'Olstenholme 1978, 1980, citați de Crozier, R.H. și Crozier Y.C., 1993) - AT



Figura 30. Harta genomului circular la *Apis mellifera* L.
(după Crozier, R.H. și Crozier Y.C., 1993)

Direcția de transcripție pentru fiecare regiune codificatoare este indicată prin săgeți. ADN-ul mitocondrial la *Apis mellifera* L. are o lungime de 16.343 pb și cuprinde 22 de gene pentru ARNt.

În comparație cu *Drosophila melanogaster*, 11 dintre genele ADNt sunt situate în poziții diferite, dar celelalte ocupă aceleași poziții.

Codul genetic identificat la *Apis mellifera* L este identic cu cel decodat la *Drosophila melanogaster*, dar diferă anticodonii pentru doi ARNt (Crozier, R.H. și Crozier Y.C., 1993).

Markerii moleculari implicați în studiile filogenetice, evolutive, ecologice sau ale comportamentelor complexe la albine sunt situați la nivelul unor gene situate la diverse niveluri celulare.

Regiunile necodificatoare

Acestea includ regiunea mitocondrială de control, intronii genelor nucleare și regiunile spațiului transcripțional intern al genelor ribozomale nucleare. Pentru că aceste regiuni se află sub o presiune de selecție scăzută tind să evolueze rapid și sunt utilizate doar în studiile efectuate la speciile înrudite.

Datorită ratei ridicate de substituție, la nivelul acestor gene se observă heterozigoție, motiv pentru care este necesară clonarea produșilor PCR înaintea secvențării.

Genele mitocondriale

Datorită faptului că se găsesc într-un număr mare de copii sunt mult mai ușor de utilizat decât genele nucleare existente într-o singură copie, iar transmiterea caracterelor acestora strict pe cale maternă are mare utilitate la nivel intraspecific. Genele mitocondriale sunt de două categorii: **gene ribozomale** și **gene ce codifică proteinele**. Există două gene mitocondriale ribozomale, **12S ADNr** și **16S ADNr**, care nu sunt separate prin spații transcripționale interne.

În general, poziția a treia a genelor ribozomale ce codifică proteinele evoluează mai rapid decât genele ribozomale, dar pot fi utilizate cu rezultate bune primele două poziții ale acestora.

Una dintre problemele potențiale în utilizarea genelor mitocondriale constă în faptul că pot fi transferate din regiunea mitocondrială în cea nucleară. Aceste gene, numite **numts** (nuclear copies of mitochondrial genes – copii nucleare ale genelor mitocondriale) sau **pseudogene mitocondriale**, pot fi amplificate și secvențate din greșeală, conducând astfel la erori.

Deși încă nu s-a semnalat existența acestora în studiile de specialitate la Hymenoptere, este util să se țină seama de existența lor pentru a se putea evita eventualele erori induse de prezența lor. Besansson, D. și col. (2001) a elaborat o serie de strategii pentru identificarea și utilizarea acestor pseudogene mitocondriale.

Gene nucleare codificatoare ale proteinelor

Aceste gene au un grad înalt de substituție și pot fi utilizate în diverse studii moleculare. Una din marile probleme pe care le ridică însă utilizarea lor este paralogia. Ele pot fi adesea duplicate și în acest fel nu se poate ști cu exactitate care copie a genei a fost secvențată.

Datorită faptului că aceste gene au o structură intron/exon, vor putea fi desemnați primeri cu un grad înalt de conservare pentru exonii ce vor amplifica secvențele, contracarașând astfel efectul intronilor cu variabilitate ridicată. Această situație este desemnată prin **EPIC** (exon primed intron crossing) și constituie o sursă de markeri nucleari cu variabilitate ridicată utilizați în studiile specifice.



Deși în practică nu se întâlnesc markeri moleculari ideali care să îndeplinească simultan toate însușirile dorite (să fie prezenți într-o singură copie, sau copii omogene multiple și ușor de aliniat; toate situs-urile să poată varia în aceeași măsură; rata de substituție să fie suficient de ridicată pentru a furniza un număr suficient de situs-uri; rata de substituție să fie suficient de scăzută pentru a evita un număr excesiv de substituții multiple; să aibă compoziții ale bazelor sensibil diferite și compoziție constantă bazelor în cadrul aceleași specii; să existe pentru aceștia primeri universali și să fie utilizabili pe scară largă pentru a permite integrarea rezultatelor), la nivelul regiunilor necodificatoare, a genelor mitocondriale și a celor nucleare codificatoare ale proteinelor au fost localizați markeri care le îndeplinesc pe majoritatea și sunt utilizați cu rezultate bune în MAS.



Din multitudinea de markeri moleculari utilizați în prezent pentru a evidenția rezistența la paraziți și boli, la albine își găsesc utilizarea mai puțin cei proteici (alozimele și izozimele) datorită polimorfismului scăzut. Cea mai largă utilizare au însă markerii genetici (RFLP, minisateliți, microsateliți, AFLP și RAPD) care datorită specificului și gradului lor înalt de polimorfism au fost utilizați cu succes în acest tip de investigații.



Se preconizează obținerea la *Apis mellifera* L. a unor producții superioare cantitativ și calitativ prin identificarea cu ajutorul markerilor moleculari (microsateliți, STS, markeri RAPD, RFLP și AFLP) a locilor însușirilor cantitative (QTL – Quantitative Trait Loci) dorite, situați pe hărțile de linkage alcătuite la această specie și selecția familiilor în funcție de aceștia.



CAPITOLUL IV

TEHNICI DE BIOLOGIE MOLECULARĂ UTILIZATE ÎN ANALIZA GENETICĂ LA ALBINE

Indiferent de tehnicile utilizate în vederea identificării markeri-lor moleculari la albine, de importanță majoră este atât luarea probelor cât și păstrarea acestora până în momentul analizei, precum și extracția ADN-ului.

Tehnicile de luare a probelor s-au perfecționat în așa măsură, încât la momentul de față este posibilă chiar luarea probelor fără efect letal asupra albinelor (Châline, N. și col., 2004).

Cea mai eficientă metodă de preservare a probelor de albine, deși nu întotdeauna disponibilă, constă în păstrarea acestora la -80°C , imediat după recoltarea lor.

Ca o alternativă poate fi utilizată depozitarea lor la -20°C , după ce au fost în prealabil introduse în alcoole etilic 100%.

Extracția ADN-ului, deși etapă preliminară în diversele analize genetice, este de importanță majoră pentru efectuarea în condiții optime a studiilor ulterioare și acuratețea rezultatelor obținute.

Există două categorii de metode de extracție a ADN-ului, extracția **brută** și metode de extracție speciale ce furnizează **ADN de puritate ridicată**.

a). Metodele brute de extracție a ADN-ului. Aplicarea acestora nu necesită o purificare prealabilă pentru amplificarea cu succes a ADN-ului.

- Materialul proaspăt este introdus într-o soluție tampon de liză (Tris-HCl 10 mM la pH = 8, EDTA 1 mM, Nonidet P – 40 1%, proteinază K 100 mg/100 ml). Se depozitează peste noapte la 4°C (Black și col., 1992).
- **Extracția cu Chelex.** Materialul proaspăt se aduce în 500 μl Chelex 5%. Se incubează la 56°C (0,5 – 4 ore) după care la $95 - 100^{\circ}\text{C}$ (5 – 15 minute), după care se centrifughează, iar supernatantul se depozitează la -21°C . Datorită cantităților mici de ADN utilizate, este recomandată folosirea ca martor a unei extracții blank, atunci când se aplică acest protocol (Cano și col., 1993).

b). Metode de extracție ce conduc la obținerea ADN-ului de înaltă puritate

- **Metoda de extracție în soluție salină.** Utilizarea acestei metode conduce la obținerea unui ADN-genomic de puritate înaltă, deși este una dintre cele

mai rapide metode și în același timp puțin costisitoare. Avantajul principal constă în eliminarea folosirii unor reactivi nocivi și foarte scumpi (ex. fenolul) și adaptabilitatea sa pentru aplicare la diverse organisme (Sunnucks și col., 1996).

Liza se efectuează în:

- 400 μ l TEN (Tris-HCl 10mM, pH = 8; EDTA 0,2 mM, pH = 8; NaCl 0,4 M)
- 40 μ l SDS 20%
- 8 μ l proteinază K

Se amestecă și se incubează la 55⁰C timp de 1 oră.

Se adaugă 300 μ l NaCl 5 – 6 M și se supune și se supune la vortex 15 – 30 secunde.

Se centrifughează la 10.000 – 40.000 g.

Se transferă supernatantul într-un Eppendorf nou și ADN-ul este precipitat în amestecul 1 : 1 propanol : etanol 100% (de la gheață).

Se păstrează la - 21⁰C timp de 5 – 60 minute.

Se centrifughează la 4⁰C timp de 15 – 20 minute, după care peletul este spălat cu etanol 70% și se lasă să se usuce.

ADN-ul se păstrează până la utilizare sub formă de suspensie în 20 – 50 μ l apă sterilă.

Atunci când **probele au fost recoltate sau păstrate în condiții neadecvate** și pentru a evita procedeele costisitoare de purificare, se utilizează metoda descrisă mai jos (Châline, N. și col., 2004).

☞ Soluția de liză:

- tiocianat de guanidiu 0,5 M
- EDTA 0,1 M
- acetat de amoniu 7,5 M de la gheață

Se amestecă, iar amestecul stă la gheață 10 minute, după care se adaugă 500 ml soluție cloroform : pentanol (21 : 1).

Amestecul este centrifugat la 14.000 timp de 10 minute. Se colectează supernatantul și se trece într-un Eppendorf nou.

Se adaugă izopropanol.

ADN-ul este precipitat la - 20⁰C și colectat după centrifugare la 14.000 g timp de 20 minute.

Peletul de ADN este spălat de trei ori cu etanol 70%, uscat în curent de aer și resuspendat în apă sterilă.

- De asemenea, sunt disponibile **kit-uri comerciale**. Acestea sunt produse în vederea izolării ADN-ului din țesuturi microscopice, pe o lamă sterilă și urmează un protocol într-o singură etapă (Burton și col., 1998). Aceste

kit-uri sunt mai mult sau mai puțin utile în funcție de analiza ADN ce se urmărește a fi efectuată.

În studiul ADN-ului la albine cele mai frecvent utilizate protocoale de extracție se bazează pe aceleași principii menționate în cele descrise mai sus, însă cu adaptări specifice (Wilkes, K. și col., 2003)

Protocolul propus de Wilkes și Oldroyd (2003)

Albinele utilizate trebuie să fie proaspete, sau depozitate la -70°C . ADN-ul este extras prin liză cu CTAB (Hunt și col., 1995).

Abdomenul și capul se plasează individual într-un Eppendorf (1,5 ml). Se adaugă 200 μl soluție de liză:

- CTAB 1%
- Tris 50 mM (pH =8)
- EDTA 10mM
- NaCl 1,1 M
- proteinază K 100 $\mu\text{g/ml}$

Țesutul este zdrobit cu un pestle și incubat la 60°C timp de 1 – 5 ore.

Probele sunt extrase în mod repetat prin inversie lentă cu 100 μl fenol (pH = 7,4) și 100 μl cloroform și centrifugare la 15000 g timp de 10 minute. Stratul apos superior este transferat în alt Eppendorf.

Extracția este repetată cu 200 μ l cloroform agitare lentă prin inversie și centrifugare 2 – 3 minute. ADN-ul este precipitat cu 20 μ l acetat de sodiu 3M (pH = 5,2) și 400 μ l etanol rece 100%. Probele sunt incubate 10 minute la -70°C , apoi centrifugate 20 minute la 7000 g.

Peletul rezultat este spălat în etanol 70% rece, uscat sub vid și dizolvat în 100 μ l TE_{0,1}:

- tampon Tris 10 mM (pH = 7,6)
- EDTA 0,1 mM

prin încălzire la 65°C timp de 10 minute. ADN-ul concentrat este diluat 1 : 200 în apă sterilă pentru a fi apoi utilizat pentru amplificare.

4.1.TESTAREA PROTOCOALELOR DE IZOLARE A ADN-ULUI DE LA ALBINA MELIFERĂ (*APIS MELLIFERA L.*)

Probele au fost recoltate din 358 stupine din județul Sălaj, 24 stupine apicultori din județul Cluj, 14 stupine din județul Satu Mare, 40 stupine din județul Alba și 35 stupine din județul Tulcea.

Aparatura utilizată

- Autoclav, Raypa
- Baie de apă, Fisher Bioblock Scientific
- Microcentrifugă, Sigma 1-15

- Containere pentru deșeuri, Biohazard
- Deionizator de apă, Smeg WP 3000
- Vortex, Bioblock
- Spectrofotometru NanoDrop 1000

Spectrofotometrul NanoDrop 1000

Principala componentă a echipamentului de cuantificare a ADN este Spectrofotometrul NanoDrop 1000 (fig. 31 – 33).

Acesta acoperă întreg spectrul UV – VIS (220 – 750 nm) și este destinat în principal măsurării absorbantei probelor de ADN, ARN și proteine.

Are dimensiuni relativ reduse (20 cm x 14 cm). Durata măsurării este doar de 10 secunde, iar domeniul de măsurare acoperă un domeniu larg de concentrații atât pentru ADN dublu catenar (2 - 3700 ng/μl) cât și pentru ADN și ARN monocatenar (≤ 2400 ng/μl și respectiv ≤ 3000 ng/μl).

Datorită sistemului de funcționare perfecționat, cu ajutorul acestui aparat pot fi cuantificate cantități foarte mici din proba de analizat, o simplă picătură fiind suficientă.

La deschiderea aparatului, cu pipeta automată se plasează o picătură din proba de analizat în locația destinată plasării probei.



Figura 31. Plasarea probei în vederea cuantificării



Figura 32. Poziționarea probei pe parcursul cuantificării

Când aparatul este închis, brațul adus la poziția inițială comprimă picătura de probă care este supusă măsurătorii spectrale. Tensiunea de suprafață este singura forță care menține proba.

Cuantificarea se realizează pe baza măsurării spectrului de radiații emis la o lungime a drumului optic de 1 mm, cu două fibre optice, sursa de emisie fiind o lampă de Xenon.

Când măsurarea este finalizată, aparatul se deschide, iar proba este îndepărtată prin simpla ștergere cu un șervet de laborator.



Figura 33. Îndepărtarea probei după cuantificare

Principiul de funcționare al aparatului (fig.34) se bazează pe existența unei lămpi de Xenon, care emite radiații focalizate pe o lentilă de difracție (care funcționează ca o prismă).

Fluxul luminos rezultat în urma trecerii prin prismă este alcătuit din radiații cu diverse lungimi de undă și este direcționat diferit. Prin fantă trece doar radiația cu lungimea de undă dorită.

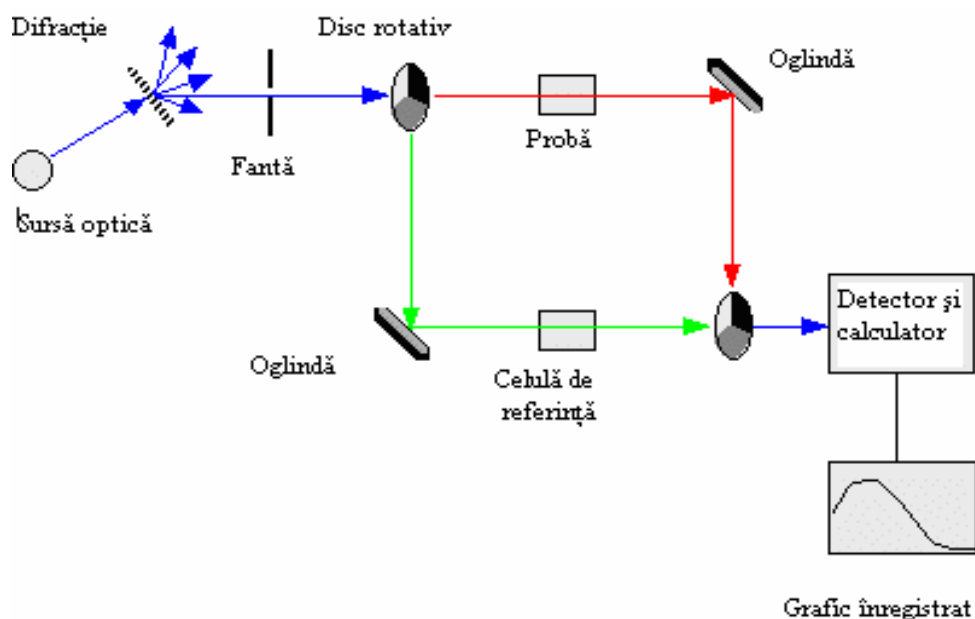
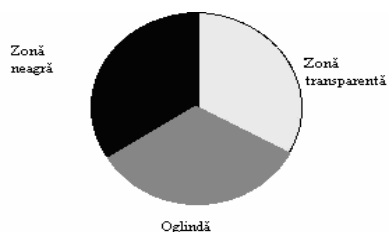


Figura 34. Schema de principiu a funcționării unui spectrofotometru în domeniul UV – VIS

Există trei posibilități:

1. Dacă aceasta ajunge în zona transparentă a discului rotativ ajunge direct în locul în care este plasată proba de analizat, după care este orientată spre cel de al doilea disc rotativ prin intermediul unei oglinzi. Aici vine în contact cu oglinda acestuia, care o direcționează spre detector.



2. Dacă radiația ajunge în zona de oglindă a discului rotativ, aceasta este direcționată spre celula de referință, apoi este orientată spre al doilea disc rotativ și direcționată spre detector.

3. Dacă radiația vine în contact cu zona neagră a discului, aceasta este blocată. Detectorul convertește semnalul luminos în semnal electric. Intensitatea luminoasă a radiației măsurată în celula de referință este notată cu I_0 , iar cea rezultată în urma trecerii prin celula ce conține proba cu I . Raportul dintre cele două intensități luminoase poartă numele de absorbantă și este dat de relația $A = \log I_0/I$.

Datele rezultate de la măsurători sunt stocate automat în memoria dispozitivului specific și pot fi vizualizate fie cu un software tip DataViewer sau programe tip MS Excel.

4.1.1. Protocolul propus de Hunt și col.

Albinele utilizate trebuie să fie proaspete, sau depozitate la -70°C . ADN-ul este extras prin liză cu 350 μl CTAB. Trântorii sau mătcile se plasează individual într-un Eppendorf (1,5 ml). Se adaugă 200 μl soluție de liză:

- CTAB 1%
- Tris-Cl 50 mM (pH =8)
- EDTA 10mM
- NaCl 750 mM
- proteinază K 100 $\mu\text{g/ml}$

Țesutul este zdrobit cu un pestle și incubat la 60°C timp de 2 ore. Se adaugă o treime din volumul de NaCl 1,5M/Tris-Cl 50 mM (pH=8), pentru a preveni precipitarea CTAB și a polizaharidelor.

Probele sunt extrase în mod repetat prin inversie lentă cu 100 μl fenol (pH = 7,4) și 100 μl cloroform și centrifugare la 15000 g timp de 10 minute.

Stratul apos superior este transferat în alt Eppendorf. Extracția este repetată cu 200 μl cloroform agitare lentă prin inversie și centrifugare 2 – 3 minute.

În continuare:

- ☞ ADN-ul este precipitat cu 20 μl acetat de sodiu 3M (pH = 5) și 400 μl etanol rece 100%.
- ☞ Probele sunt centrifugate 10 minute la 4000 g.

Peletul rezultat este spălat cu etanol 70% rece și apoi se adaugă Tris 10mM (pH = 7,6) și EDTA 1mM.

ADN-ul poate fi cuantificat cu un fluorometru, sau spectrofotometru și diluat la 3 ng/μl în Tris 10 mM și EDTA 0,3 mM.

Câte 10 masculi din stupinele studiate din fiecare dintre județele analizate au fost supuși protocolului de izolare a ADN-ului propus de Hunt și col. (1997).

Performanțele constructive și funcționale ale Spectrofotometrului NanoDrop 1000 permit eliminarea etapei de trasare a curbei de calibrare, precum și cele ce implică necesitatea calculului concentrației și purității probelor.

În urma cuantificării ADN-ului extras și a purității acestuia, cu ajutorul Spectrofotometrului Nanodrop, nu s-au obținut nici cantități, nici purități satisfăcătoare (fig. 35, 36).

În cazul cantității de ADN extrase, au fost înregistrați coeficienți de variabilitate foarte mari, cuprinși între 20,63% (albinele din Cluj) și 40,21 % (Tulcea).

Puritatea ADN-ului extras, a fost nesatisfăcătoare (cu valori cuprinse între 1,34% și 1,55%) dar coeficienții de variabilitate au fost mici, între 5,77% (albinele din Sălaj) și 11,56 % (Cluj).

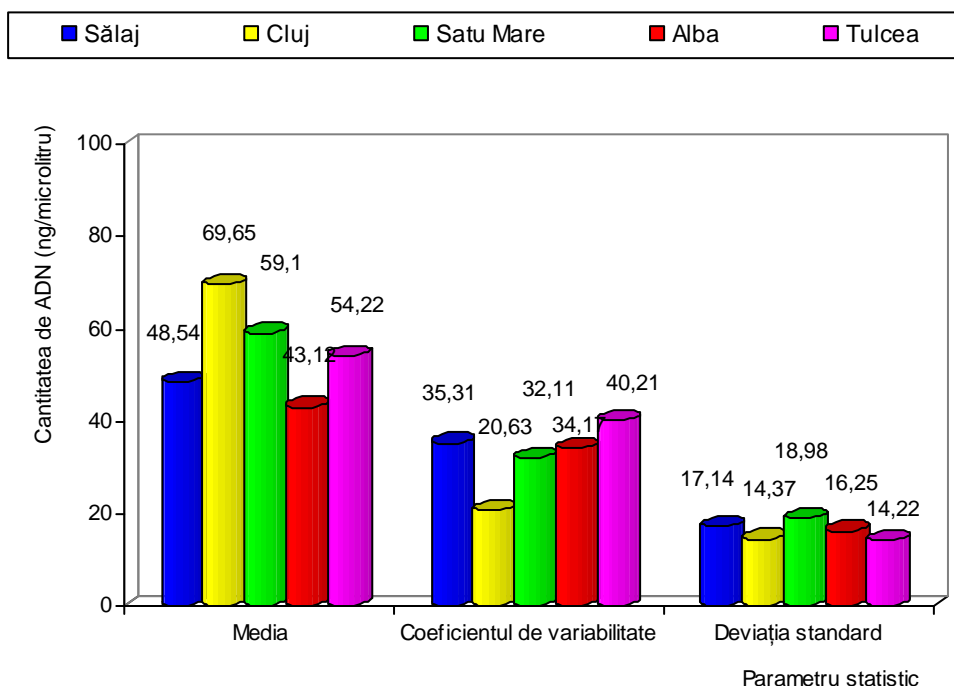


Figura 35. Cantitatea de ADN (ng/μl) extrasă din probele analizate

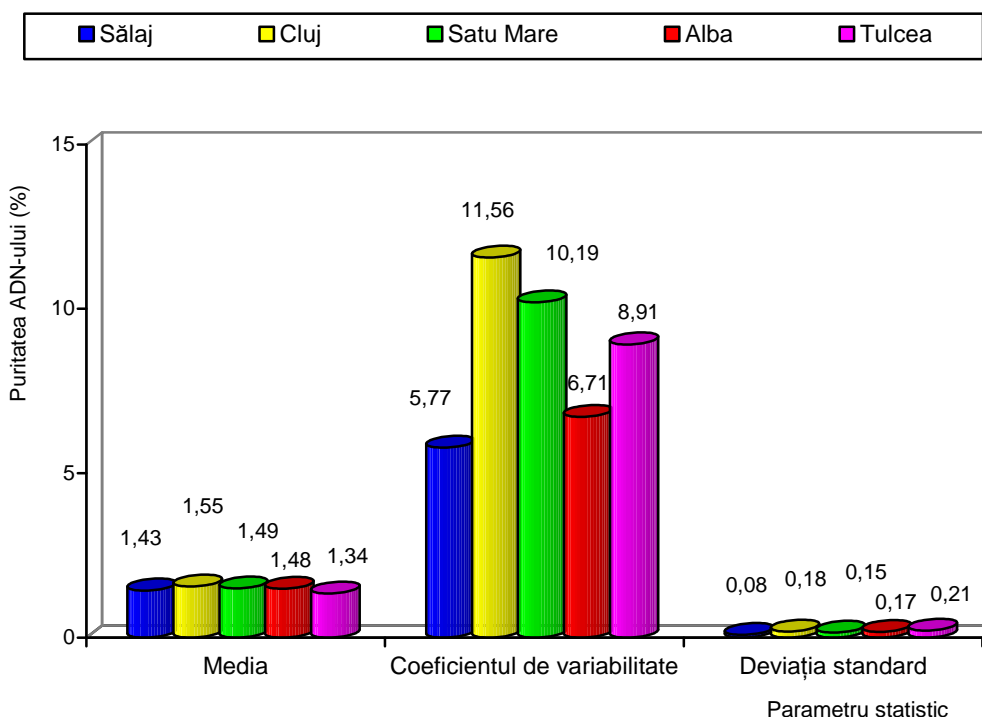


Figura 36. Puritatea ADN-ului extras din probele analizate

4.1.2. Protocolul propus de Wilkes și Oldroyd (2003)

Albinele utilizate trebuie să fie proaspete, sau depozitate la -70°C . ADN-ul este extras prin liză cu CTAB (Hunt și col., 1995).

Abdomenul și capul se plasează individual într-un Eppendorf (1,5 ml). Se adaugă 200 μl soluție de liză:

- CTAB 1%
- Tris 50 mM (pH =8)
- EDTA 10mM
- NaCl 1,1 M
- proteinază K 100 µg/ml

Țesutul este zdrobit cu un pestle și incubat la 60⁰C timp de 1 – 5 ore.

Probele sunt extrase în mod repetat prin inversie lentă cu 100 µl fenol (pH = 7,4) și 100 µl cloroform și centrifugare la 15000 g timp de 10 minute. Stratul apos superior este transferat în alt Eppendorf.

Extracția este repetată cu 200 µl cloroform agitare lentă prin inversie și centrifugare 2 – 3 minute.

ADN-ul este precipitat cu 20 µl acetat de sodiu 3M (pH = 5,2) și 400 µl etanol rece 100%. Probele sunt incubate 10 minute la -70⁰C, apoi centrifugate 20 minute la 7000 g.

Peletul rezultat este spălat în etanol 70% rece, uscat sub vid și dizolvat în 100 µl TE_{0,1}:

- tampon Tris 10 mM (pH = 7,6)
- EDTA 0,1 mM

prin încălzire la 65⁰C timp de 10 minute. ADN-ul concentrat este diluat 1 : 200 în apă sterilă pentru a fi apoi utilizat pentru amplificare.

În urma cuantificării ADN-ului extras și a purității acestuia, cu ajutorul Spectrofotometrului Nanodrop, s-au obținut cantități și purități superioare celor obținute în cazul aplicării protocolului (fig. 37, 38).

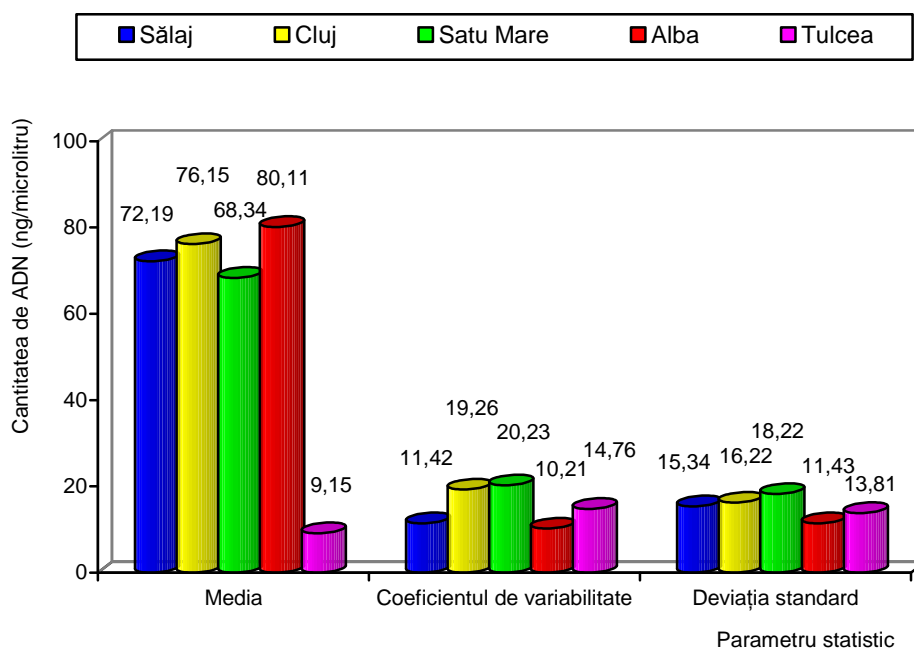


Figura 37. Cantitatea de ADN (ng/μl) extrasă din probele analizate

În cazul cantității de ADN extrase, au fost înregistrați coeficienți de variabilitate foarte mari, cuprinși între 10,21% (albinele din Alba) și 20,23 % (Satu Mare).

Puritatea ADN-ului extras, a fost satisfăcătoare (cu valori cuprinse între 1,75% și 1,93%) iar coeficienții de variabilitate au fost mici, între 3,14% (albinele din Sălaj) și 9,11 % (Cluj).

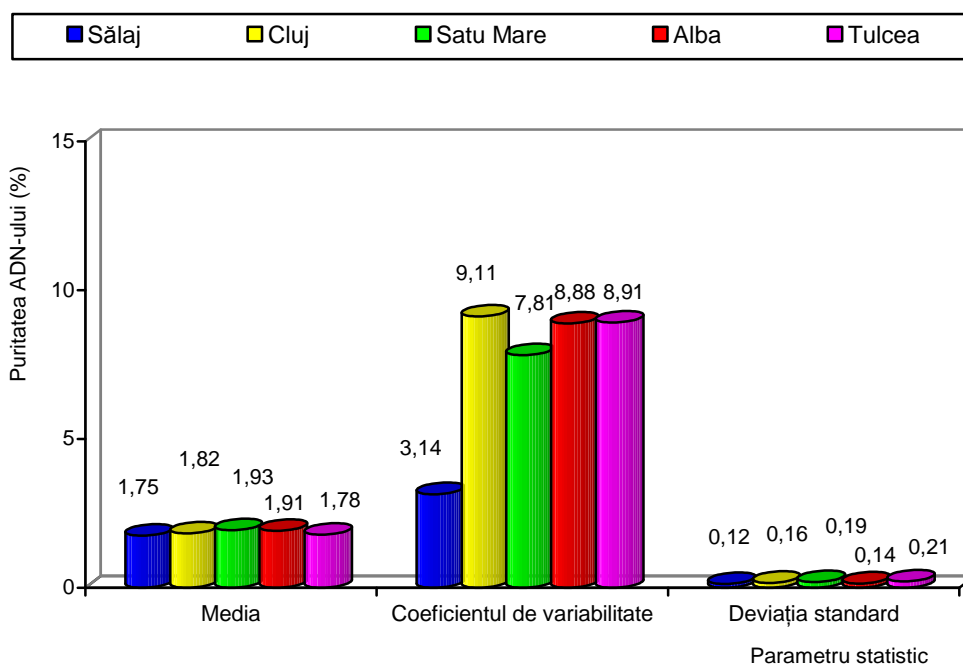


Figura 38. Puritatea ADN-ului extras din probele analizate

În urma cuantificării ADN-ului extras de la *Apis mellifera carpatica* și a purității acestuia, cu ajutorul Spectrofotometrului Nanodrop, metoda propusă de Oldroyd și col., (2002) s-a dovedit cea mai eficientă.

Tehnicile moleculare implicate în identificarea de markeri moleculari la albine s-au diversificat mult în ultimul deceniu, însă toate fac uz de tehnica Reacției în Lanț a Polimerazei, cu largi aplicații în evidențierea maladiilor albinelor (Bakonyi T. și col., 2003).

4.2. TEHNICA REACȚIEI ÎN LANȚ A POLIMERAZEI – PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

Bazele acestei tehnici moleculare au fost puse de Kary Mullis la mijlocul anilor '80 (Vlaic, A., 1997) bazându-se pe caracteristicile replicării ADN-ului. Este o tehnică rapidă, necostisitoare și permite copierea unor fragmente specifice de ADN în cantități foarte reduse. Adesea PCR este utilizată pentru a amplifica secvențe de ADN cunoscute. Se alege secvența ce se dorește a se amplifica, apoi primerii care se vor atașa și vor flanca secvența de interes în prezența unei polimeraze, în felul acesta PCR conducând la amplificarea unui anumit segment de ADN.

PCR include trei etape:

- **Denaturarea** – fragmentele de ADN sunt încălzite la temperaturi ridicate ce determină denaturarea ADN-ului, iar catenele devin accesibile primerilor;
- **Cuplarea** – temperatura se reduce, primerii se atașează la regiunile complementare situate pe catenele complementare ale ADN-ului matriță și se formează din nou catena dublă între primeri și secvențele complementare;

- **Elongația** (extensia) – ADN-polimeraza sintetizează o catenă complementară. Enzima citește secvența de pe catena opusă și extinde primerii prin adăugarea nucleotidelor în ordinea în care acestea se pot împerechea. Întregul proces se repetă.

Inițial amplificarea s-a realizat cu ajutorul ADN-polimerazei provenită din *E.coli*. Această ADN-polimerază are un optim de funcționare la temperatura de 37⁰C. Datorită temperaturii de reacție ridicate în cazul PCR aceasta se denaturează, fiind necesară înlocuirea ei la începutul fiecărui ciclu. Din acest motiv s-a renunțat la utilizarea sa, la momentul de față fiind utilizată ADN-polimeraza Taq izolată din bacteria *Thermus aquaticus* care trăiește în mediu acvatic la temperaturi de până la 95⁰C (Brown, T.A., 2002). Aceasta este o enzimă stabilă la temperatura de lucru având un optim de funcționare la 72⁰C.

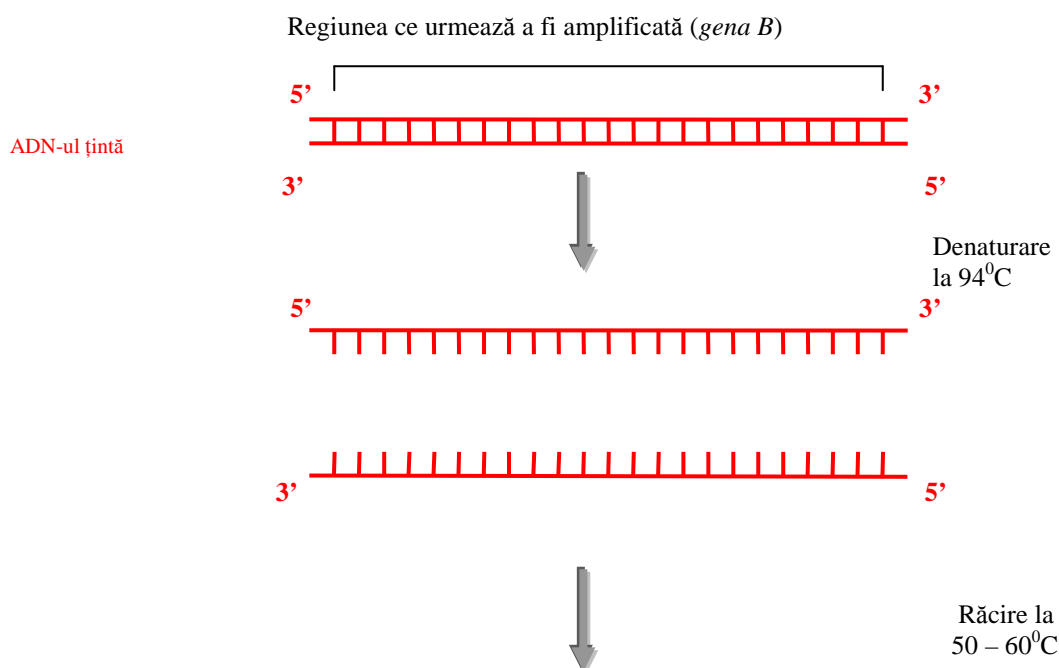
Spre exemplu, dacă se ia în considerare un fragment de ADN ce conține 3 gene (fig. 39), în condițiile unei reacții PCR simple, prin care se urmărește amplificarea doar a genei B se realizează un amestec de reacție alcătuit din gena B, Taq polimerază, nucleotide și doi primeri care se vor atașa la fiecare capăt al genei B. Aceștia din urmă sunt secvențe scurte de nucleotide (15 – 35) complementare capetelor secvenței de ADN ce urmează a fi amplificată.



Figura 39. Fragment de ADN din care se va amplifica gena B

În prima etapă, **denaturarea** (fig. 40), reacția este începută prin încălzirea amestecului de reacție la 94°C , temperatură la care se rup legăturile de hidrogen dintre cele două catene polinucleotidice ale helixului, ADN-ul denaturându-se și devenind o moleculă unicatenară.

În etapa a doua, **cuplarea** (fig. 40), temperatura se reduce la $50 - 60^{\circ}\text{C}$, ceea ce are drept rezultat realăturarea unora dintre catenele simple ale ADN-ului, dar în același timp permite și primerilor să se atașeze în pozițiile complementare aflate la capetele genei de interes. Cei doi primeri se leagă la capetele 3' ale genei urmărite pe cele două catene, motiv pentru care aceștia se numesc primeri „sens” și „antisens”.



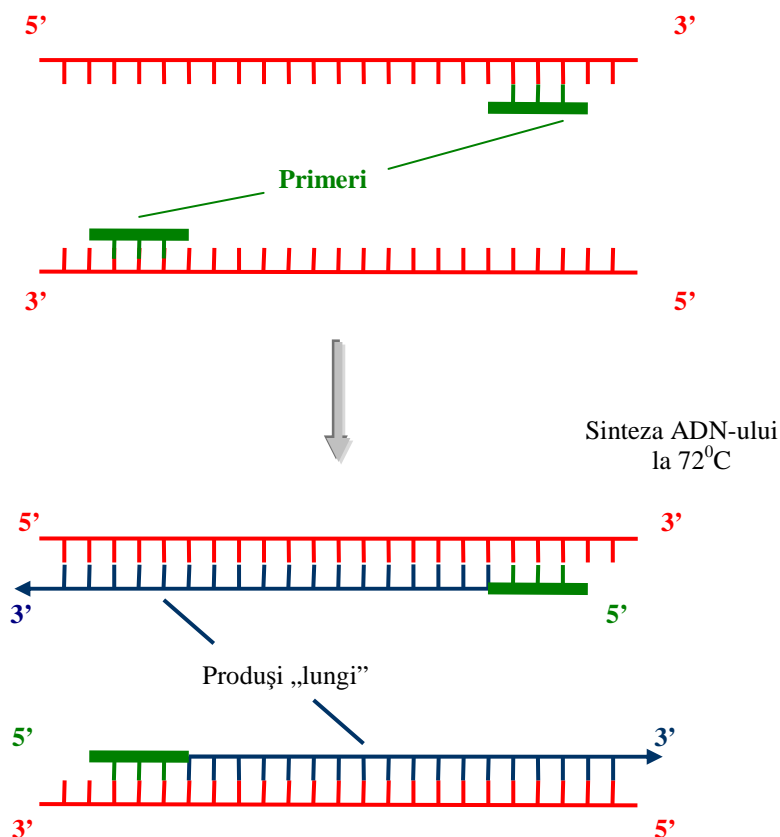


Figura 40. Etapele PCR

Din acest moment începe sinteza ADN-ului, iar temperatura este ridicată la 72°C, temperatură optimă pentru acțiunea Taq polimerazei.

În etapa a treia a reacției, **elongația** (fig. 40), se sintetizează o serie de produși „lungi” din fiecare catenă a ADN-ului țintă. Polinucleotidele au aceleași terminații 5', dar terminațiile 3' sunt întâmplătoare și reprezintă pozițiile în care sinteza ADN-ului se încheie la întâmplare.

Cele trei etape ale PCR-ului se desfășoară pe cicluri:

➤ **Ciclul 1** – pe parcursul denaturării (1 minut, 95⁰C) catenele de ADN se despart pentru a forma catene separate: pe parcursul atașării (aproximativ 1 minut, 45 - 60⁰C) un primer se leagă de o catenă de ADN, iar celălalt de catena complementară. Sit-urile de atașare a primeri-lor sunt alese în așa fel încât să asigure sinteza ADN-ului în regiunea de interes pe parcursul extensiei (1 minut, la aproximativ 72⁰C) când sinteza ADN-ului se desfășoară în regiunea de interes pe distanțe variabile în zona de „flancare” (flanking region) producând „fragmente lungi” de dimensiuni variabile.

➤ **Ciclul 2** – când începe ciclul 2, există două tipuri de matrițe:

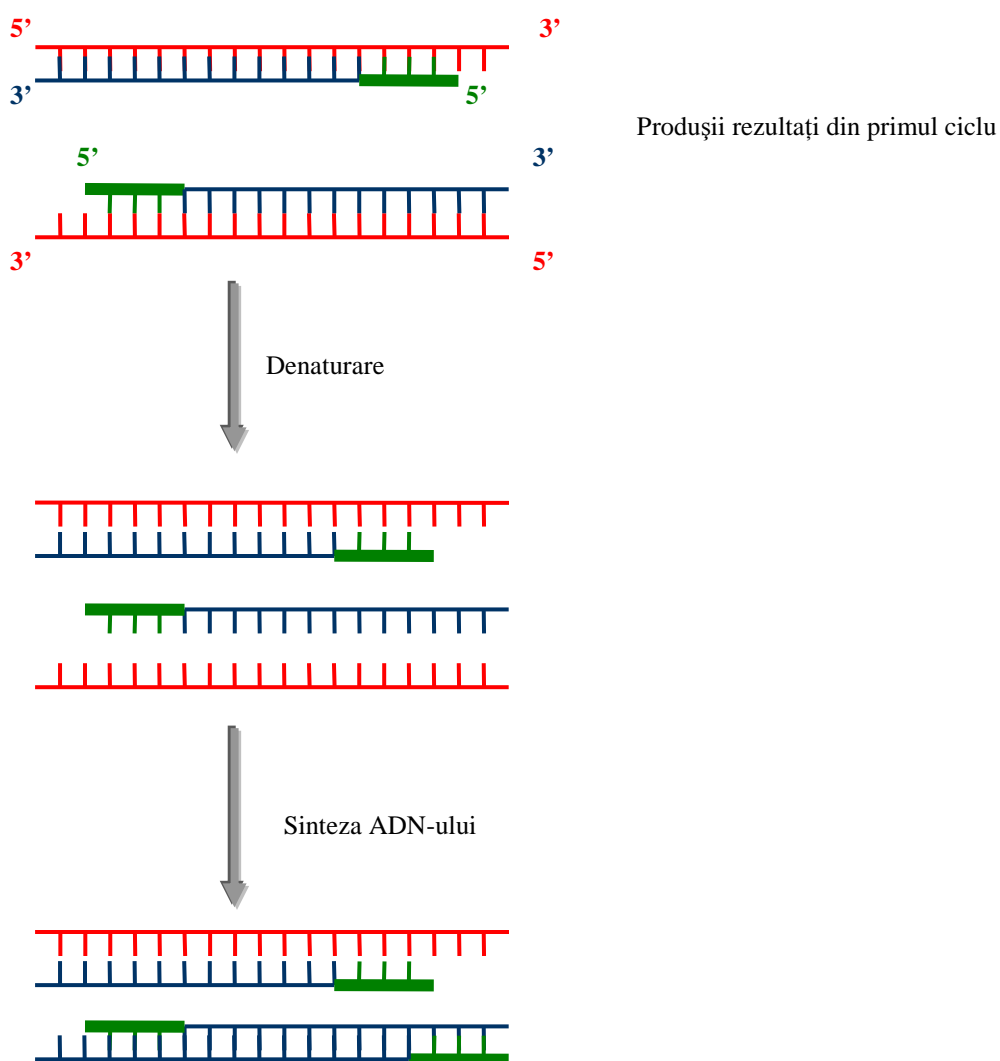
1. Catenele originale de ADN și
2. Catenele de ADN nou sintetizate ce constau din regiunea țintă și lungimi variabile ale zonei flancatoare situată la capătul 3’.

Când în acest ciclu se utilizează ultima matriță se replică doar regiunea țintă.

➤ **Ciclul 3** – Regiunea țintă de ADN nou sintetizată (ex. fără regiunile flancatoare) joacă rol de matriță. Molecula originală de ADN este încă prezentă și va fi până la sfârșitul reacției. După câteva cicluri, fragmentul de ADN nou sintetizat se stabilizează rapid și devine matrița predominantă.

Când se repetă ciclul **denaturare – cuplare – sinteză** (fig. 41), produșii „lungi” acționează ca matrițe pentru noile sinteze de ADN dând naștere la produșii „scurți” a căror terminații 3’ și 5’ sunt stabilite de pozițiile de cuplare a

primerilor. Pe parcursul ciclurilor următoare numărul produșilor de reacție „scurți” se acumulează exponențial (dublându-se pe parcursul fiecărui ciclu) până la epuizarea unuia dintre compușii de reacție.



Prođușii rezultați din
al doilea ciclu

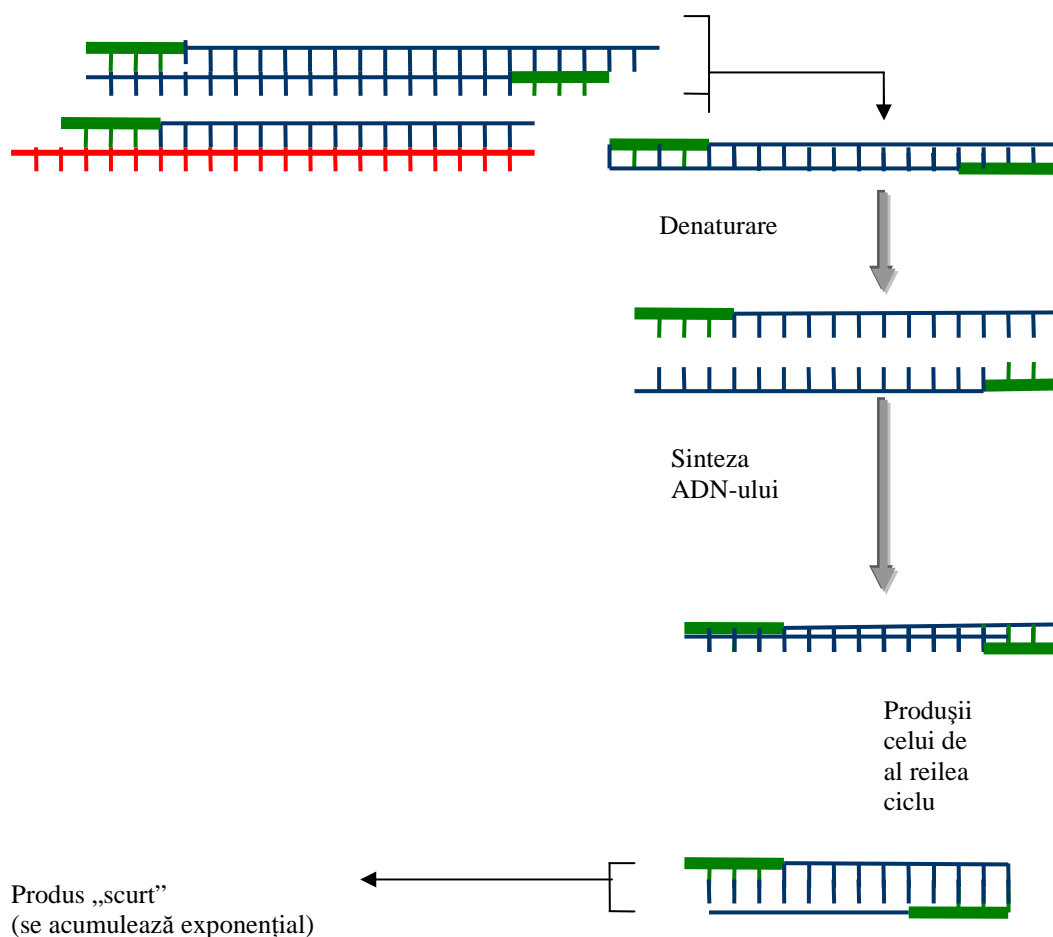


Fig. 41. Sinteza produșilor „scurți” ai PCR

Aceasta înseamnă că după 30 de cicluri vor exista peste 250 milioane de produși proveniți din fiecare moleculă inițială. Adică, din câteva nanograme de fragment de ADN ce se dorea a fi amplificat (ex. gena B) vor rezulta câteva micrograme de

produs al PCR. Astfel, este amplificată doar gena de interes (B) care va fi purificată pentru a fi în continuare utilizată.

Rezultatele PCR pot fi vizualizate și verificate pe diferite căi. De obicei, produșii sunt analizați prin electroforeză pe gel de agaroză, sau poliacrilamidă.

Astfel, produșii de reacție separați prin electroforeza în gel de agaroză sau poliacrilamidă sunt identificați în funcție de calitatea lor și dimensiunea fragmentului amplificat.

4.3.VIZUALIZAREA PROBELOR

Ei pot fi vizualizați direct prin **colorare** cu bromură de etidiu sau argint, sau prin **marcare** cu radioizotopi și autoradiografie.

a). Colorarea

⇒ Colorarea cu **bromură de etidiu** este convenabilă în cazul în care sunt disponibile cantități mari de ADN, cum este cazul produșilor PCR, când rezultă ADN purificat utilizat apoi în analize de ADN specifice, fiind mai puțin adecvată în cazul ADNm, care este detectată cu acuitate mai mare utilizând alte tehnici.

Utilizarea bromurii de etidiu dă cele mai bune rezultate în cazul gelurilor de agaroză. Nu este recomandată utilizarea acesteia în cazul gelurilor de poliacrilamidă folosite pentru identificarea cu o rezoluție înaltă a unor cantități reduse de ADN.

Molecula de bromură de etidiu capabilă să se intercaleze între cele două brațe ale helixului ADN-ului absoarbe lumina UV (la 300 nm), oscilează, pierde energie și emite fluorescență de culoare portocalie (cu lungimea de undă de 590 nm).

⇒ Colorarea cu **argint** (Sambrook și col., 1989) este utilizată în principal când electroforeza se efectuează în gel de poliacrilamidă (mai frecvent pentru RFLP și microsateliți).

Prepararea colorantului se efectuează sub agitare blândă.

- ☞ Gelul este introdus în soluția tampon A (180 ml apă sterilă, 40 ml etanol 100%, 2 ml acid acetic glacial) timp de 4 minute.
- ☞ Soluția A este îndepărtată și se introduce gelul în soluția B (100 ml apă sterilă, 0,1 g azotat de argint) timp de 10 minute.
- ☞ Gelul se spală de două ori cu apă sterilă.
- ☞ Gelul este introdus în soluția tampon C (150 ml apă sterilă, 2,25 g hidroxid de sodiu, 15 g borohidru de sodiu, 0,6 ml formaldehidă) până în momentul apariției benzilor. Nu trebuie însă supraexpus, pentru că există riscul înnegririi gelului și nu se vor mai putea vizualiza benzile.
- ☞ Se clătește în apă sterilă, după care se introduce din nou în soluția tampon A pentru fixare.

b).Marcarea

Marcarea cu radioizotopi se realizează prin încorporarea marker-ului respectiv (radioactiv sau fluorescent) într-o copie nouă sau parțial sintetizată a secvenței inițiale de ADN. Aceasta se poate realiza prin mai multe procedee (marcare întâmplătoare, translație "Nick", sau marcarea capătului moleculei de ADN).

⇒ **Marcarea întâmplătoare** conduce la un grad înalt de încorporare a markerului în molecula de ADN. Lungimea moleculei de ADN poate constitui un factor limitant în obținerea unei calități corespunzătoare a semnalului. Alegerea izotopului ce va fi utilizat depinde de secvența de nucleotide prevalentă în probă (dCTP, dATP, dGTP, dTTP).

Ordinea descrescătoare a capacității de emisie radioactivă a radioizotopilor utilizați este următoarea: ^{32}P , ^{33}P și ^{35}S . Fiecare dintre acești izotopi sunt disponibili cu diferite activități de emisie în funcție de analiza în care sunt folosiți: $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP 3000 Ci/mmol pentru analizele de amprentă genetică, $[\alpha^{33}\text{P}]$ dATP 2500 Ci/mmol pentru analizele de microsateți, și $[\alpha^{35}\text{S}]$ dATP 1000 Ci/mmol pentru secvențiere.

Proba este inițial purificată, după care este denaturată pentru a obține ADN unicatenar, după care se păstrează la gheață până în momentul amestecului cu markerul radioactiv.

⇒ **Translația "Nick"** asigură un grad mai redus de încorporare a markerului dar necesită un ADN mai puțin pur. În cazul folosirii izotopului radiomarcant $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP, la proba purificată denaturată se adaugă:

- apă sterilă și 10 x tampon de translație "Nick" (dATP, dGTP și dTTP câte 0,2 mM fiecare și soluție tampon de reacție),
- amestec enzimatic (ADNaza I/ADN polimerază)
- și radioizotopul, după care se amestecă.

☞ Se incubează la 37°C timp de o oră, după care se utilizează.

☞ Markerii de translație "Nick" sunt introduși la întâmplare în catenele de ADN de către DNaza I și ADN polimerază. Efectul constă în obținerea unor noi

molecule marcate uniform, cu marker-ul încorporat la locusul de substituție a nucleotidei C.

⇒ **Marcarea capătului moleculei de ADN** constă în marcarea radioactivă a unui capăt a ADN-ului în prezența transferazei terminale, Co^{2+} și $[\alpha^{32}\text{P}] \text{ dATP}$. Se mai poate realiza și prin fosforilarea directă a terminațiilor H 5' după îndepărtarea grupărilor 5'fosfat cu ajutorul fosfatazei alcaline și marcarea cu $[\gamma^{32}\text{P}] \text{ dATP}$ în prezența polinucleotid kinazei T4.

4.4. APLICAȚII ALE PCR

4.4.1. Tehnica SAGE

De asemenea, perfecționarea și adaptarea tehnicii PCR în vederea cuantificării simultane a nivelului ARNm total prezent într-o probă a condus la punerea la punct a tehnicii SAGE (serial analysis of gene expression – analiza în serie a expresiei genice).

Tehnica SAGE se bazează pe principiul că o secvență de 10 pb poate fi suficientă pentru a identifica ARNm (fig. 42).

Datorită dimensiunilor lor reduse, un număr mare de asemenea capete pregătite pentru o populație de ADNc pot fi ligate împreună și analizate simultan prin tehnici de secvențiere.

Frecvențele relative cu care apar aceste „capete” în secvența totală sunt identice cu cele ale diferitelor molecule de ARNm din proba originală. Etapele SAGE sunt prezentate schematic în fig. 43.

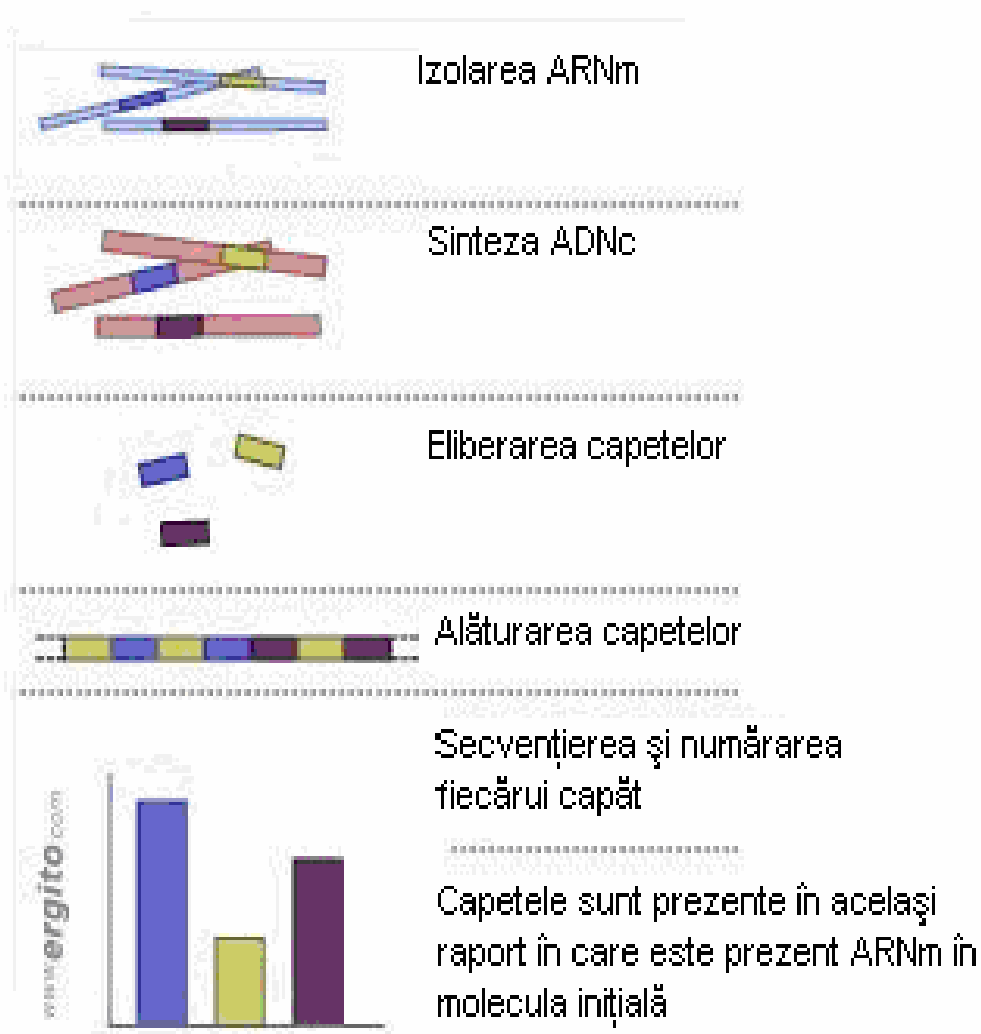


Figura 42. Principiul tehnicii SAGE (www.ergito.com)

În **primele două etape**, moleculele de ARNm se leagă de paturi la capătul 3'. Se sintetizează ADNc și apoi se face scindarea cu o endonuclează de restricție ce recunoaște secvențele de 4 perechi de baze (pb).

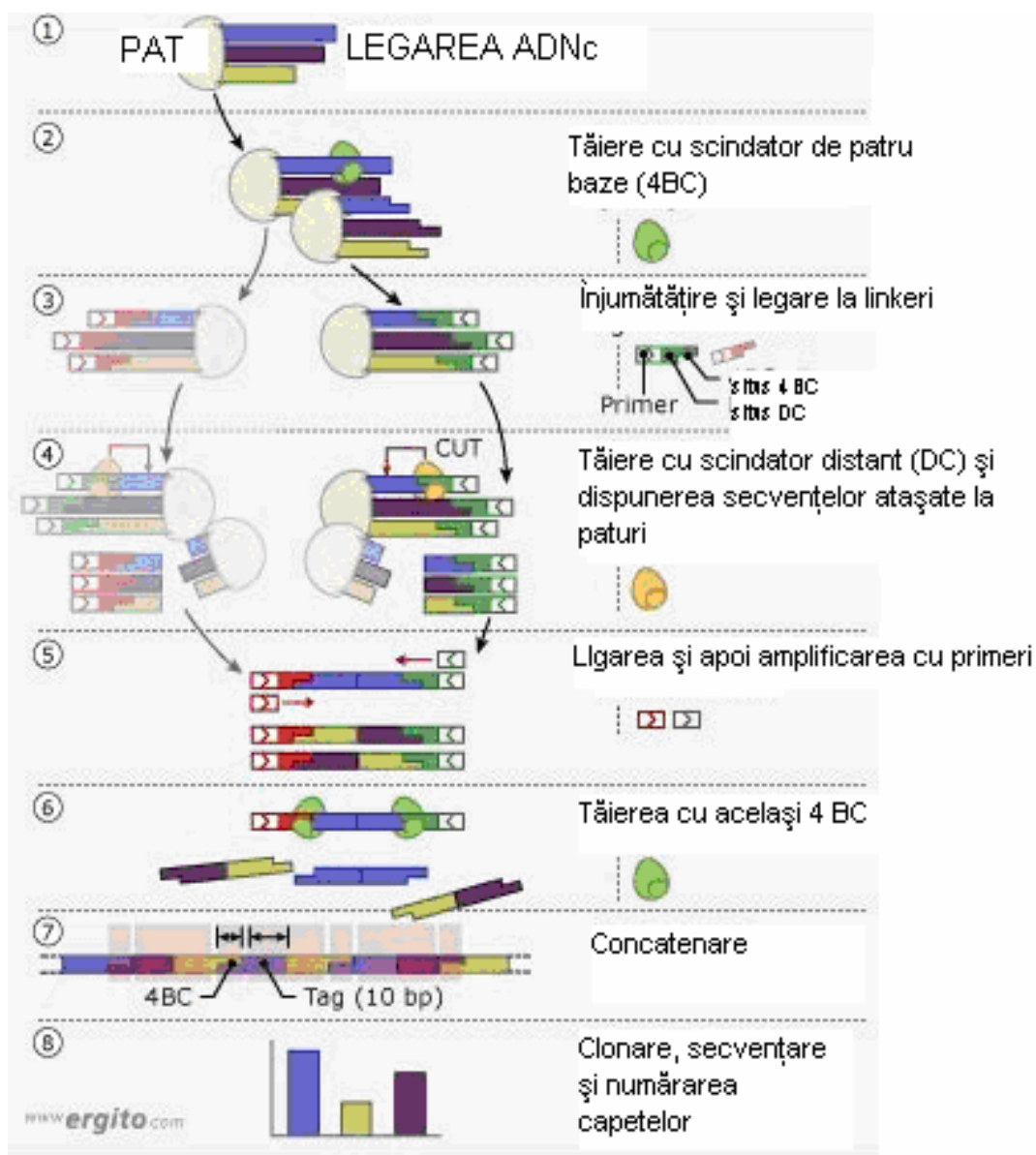


Figura 43. Etapele SAGE (www.ergito.com)

Etapa a 3-a. Se colectează paturile, se izolează fiecare fragment a fiecărui ADNc ce corespunde capătului 3' a transcriptului original. Proba se împarte în două și una dintre cele două molecule de ADN linker este ligată. Fiecare linker conține o secvență ce va fi utilizată pentru următoarea PCR, constituind în același timp și situs asimetric de recunoaștere pentru endonucleaze de restricție IIS (care scindează la distanță de situs-urile de recunoaștere).

Etapa a 4-a. Enzimele de tipul IIS scindează secvența ADNc punând în libertate un fragment de ADN care conține linkerul la un capăt și aproximativ 10 pb ale ADNc la celălalt capăt. Această secvență de 10 pb constituie „capătul” (tag). Fragmentele sunt purificate prin simpla colectare urmată de eliminarea paturilor.

După utilizarea ADNpolimerazei pentru a crea capete plate e fragmente, acestea se combină și se produce ligarea. În felul acesta se obțin „capete duble” (ditags) ce constau din două „capete” (tags) atașate cap la cap în mod întâmplător.

Etapa a 5-a. „Capetele duble” (ditags) cu situs-uri pentru primeri diferiți la terminațiile lor sunt amplificate selectiv prin PCR și apoi purificate.

În etapa anterioară sunt produse și „capetele duble” (ditags) cu situs-uri pentru același primer la ambele terminații. Aceste „capete duble” (ditags) nu sunt amplificate prin PCR pentru că cele două capete ale fiecărei molecule se atașează unele de altele și cu de primer. Din acest motiv proba trebuie scindată în două.

Etapa a 6-a. „Capetele duble” (ditags) purificate sunt scindate cu aceeași endonuclează de restricție care a fost utilizată inițial pentru a scinda moleculele

de ADNc. Aceasta conduce la producerea de fragmente interne care sunt compuse în cea mai mare parte din secvențe ale celor două „capete” (tags).

Etapa a 7-a. Aceste fragmente sunt apoi purificate și ligate formând concatemi lungi în care fragmentele sunt încorporate întâmplător. Concatemii sunt apoi clonați pentru a forma o bibliotecă SAGE. Apoi, clone individuale sunt luate la întâmplare și secvențate.

Etapa a 8-a. Cu ajutorul soft-ului specializat pentru acest tip de analiză se numără fiecare tip de „capăt” (tag) și se determină frecvența apariției sale față de celelalte. Se realizează corespondența dintre „capete” (tags) și ADNc cu ajutorul unei liste de „capete” (tags) prezise pe baza unor molecule de ADNc cunoscute.

Deși „capetele” (tags) conțin doar o secvență de 10 – 11 pb, pentru că provin dintr-o anumită zonă bine definită din cadrul fiecărei molecule de ADNc (foarte aproape de capătul 3' a situs-ului 3' a primei enzime de restricție) sunt suficiente pentru a identifica cu exactitate 4^{10} molecule de ADNc.

Aplicațiile SAGE vizează:

- caracterizarea transcriptelor specific celulare din cadrul diferitelor țesuturi, identificarea genelor induse în celula ca răspuns la tratamentul cu un factor de creștere sau diferențiere,
- identificarea modificărilor produse în expresia genică în diferite stadii de dezvoltare,
- monitorizarea diferențelor apărute în expresia genică dintre celulele normale și canceroase.

Principiile tehnicii PCR și-au găsit aplicabilitate în pentru evidențierea și utilizarea microsateliților. Odată cu identificarea markeri-lor de tipul STS, au fost dezvoltate și o serie de alte tehnici care au la bază prezența acestora:

- OCS – **ordered catenation of sequence-tagged sites** (Higasa, K. și col., 2002)
- STMP - **sequence-tagged microsatellite profiling** (Hayden, M.J. și col., 2001), care utilizează principiile SAGE pentru a genera o bibliotecă ST pentru caracterizarea rapidă a locilor SSR în cadrul unui genom de interes din care pot fi identificați și utilizați markeri de tipul microsateliților.
- TALEST – **tandem arrayed ligation of expressed sequence tags** (Spinella, G.D. și col., 1999), ce oferă o modalitate relativ simplă de analiză cantitativă a profilurilor globale ale expresiei genice din celule și țesuturi.

Acestea tehnici au implicații importante în studiile efectuate pe albine.

La albine, în particular, tehnica PCR și adaptările acesteia utilizate în vederea identificării microsateliților și-au adus contribuția în diverse studii genetice prin evidențierea:

- Genotipului și variabilității acestuia la *Apis mellifera* L. utilizând 4 loci ai microsateliților ADN (Neumann și col., 1997) .
- Variabilității ridicate a populațiilor de *Apis mellifera* L. din Costa Rica (Segura, J.A.L., 2000) cu ajutorul a doi markeri genetici cu polimorfism înalt evidențiați în genom (microsatelitul A7 și regiunea intergenică COI-COII din ADNmt).

- Existenței QTL implicați în comportamentul igienic al populațiilor de *Apis mellifera* L. cu ajutorul unui set de microsateliți alcătuit din repetiții cu predominanță perfecte, 52 (CT)_n și 23 (GT)_n la distanțe de 15 kb și respectiv 34 kb. Acestea au o distribuție asociativă și regiunile care le flanchează sunt suficient de asemănătoare pentru a putea permite amplificarea PCR (Estoup, A. și col., 1993, 1995)
- Existenței a șapte QTL ce influențează comportamentul igienic la albine, stabilind un punctaj numeric al nivelului mediu al acestuia. (Hayden M.J. și col., 2001, Lapidge și col., 2002)
- Identificarea la *Apis mellifera iberica* a QTL implicați în mecanismele de identificare a rezistenței la boli cu ajutorul a șapte microsateliți (B7, ED-R, FE, FM-F, GH-F, GJ, HC) (Rowe și col., 1997).

4.4.2. Tehnica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – Polimorfismul fragmentelor de restricție)

Markerii RFLP au fost primii markeri ADN studiați. La tratarea moleculei de ADN cu o enzimă de restricție se obține întotdeauna același set de fragmente, ceea ce semnifică faptul că respectivele enzime scindează molecula de ADN la nivelul unor secvențe de recunoaștere specifice.

Această aserțiune nu este valabilă și la nivelul ADN-ului genomic, pentru că unele situs-uri de restricție prezintă polimorfism.

Adică, la acest nivel există două alele, **una** cu secvența specifică situs-ului de restricție la nivelul căreia enzima de restricție va scinda molecula de ADN, iar **cealaltă** alelă prezintă modificări secvențiale și nu va fi recunoscută de enzimă, care nu va scinda molecula la nivelul acesteia.

Rezultatul modificării secvenței uneia dintre cele două alele este acela că cele două fragmente de restricție adiacente rămân legate împreună și după tratamentul cu enzima de restricție, ceea ce conduce la apariția unui polimorfism al lungimii. Acesta este de fapt un polimorfism al fragmentelor de restricție (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism), ce poate fi utilizat ca marker ADN.

Tehnica RFLP constă din scindarea moleculei de ADN în două părți cu ajutorul unei enzime de restricție la fiecare parte a regiunii ce prezintă polimorfism, astfel încât aceasta să rămână intactă.

Fiecare moleculă de ADN este digerată cu aceeași enzimă de restricție. Fragmentele de ADN sunt plasate pe gel de agaroză.

La migrarea pe gel, fragmentele de ADN de dimensiuni mai reduse migrează mai repede decât cele de dimensiuni mai mari, rezultând un profil specific.

Fragmentele de ADN dublu catenar sunt ulterior denaturate obținându-se ADN monocatenar și transferate ulterior prin atracție capilară pe o membrană din nylon pe care sunt fixate și menținute ca ADN monocatenar.

Se utilizează o probă (fragment de ADN marcat capabil să recunoască specific polimorfismul obținut) pentru a vizualiza fragmentele de ADN complementar. În felul acesta poate fi determinată dimensiune secvenței repetate în funcție de poziția sa pe membrană.

Rezultatul final este obținut prin utilizarea a patru probe diferite cu puteri discriminatorii diferite.

Membrana de nylon este ulterior expusă razelor X, obținându-se un film care în momentul dezvoltării va prezenta câte o bandă întunecată la locul în care se găsește proba hibridizată cu ADN-ul complementar.

Utilizarea acestei tehnici poate fi dificilă atunci când nu există o cantitate de ADN suficientă.

Cercetări efectuate pe plan mondial (Yang – Jiang Lu și col., 1992, <http://nilgs.naro.affrc.go.jp>) arată rezultatele foarte bune obținute în cazul utilizării tehnicii RFLP pentru evidențierea variației genetice în cadrul populațiilor de albine.

Pentru aceasta se poate utiliza amplificarea segmentului genic 16s ADNr (965 pb) se va utiliza perechea de primeri: 5' – CAACATCGAGGTCGCAAACATC – 3' și 3' – AGTTGGGACTATGTTTTCCATG – 5', iar pentru amplificarea segmentului genic CO I (1028 pb), perechile de primeri: 5' – GATTACTTCCTCCCTCATTA – 3' și 3' – AATAAGTCTGATAGGTCTAA – 5' (Nielsen și col., 1999, citați de Brown T.A., 2001).

Amplificarea prin PCR se realizează cu 5 µl amestec (0,5 x tampon *Taq*ADNpolimerază + 1,5 mM MgCl₂ + 2 x 0,2 mM dNTP + 2 pM din fiecare primer + 0,5 µl ADN matriță + 0,25 U *Taq* ADNpolimerază). Profilul de temperatură este următorul:

- 3 minute la 94⁰C,
- 5 secunde la 50⁰C – 30 de cicluri,
- 5 secunde la 68⁰C.

După ciclul final se mai realizează un ciclu suplimentar timp de 10 minute la 72⁰C. După amplificare, segmentele de ADN_m vor fi supuse acțiunii enzimelor de restricție. Pentru ADN_m: Ss I, Dra I, Hinc II, EcoR I, Pst I și Alu I. Pentru segmentul genic CO I: Sau3A I, Fok I, Bcl I, Ssp I, BstU I și Xho I.

Segmentele obținute în urma acțiunii enzimelor de restricție sunt separate prin electroforeză în gel de agaroză 2% x tampon TBE, colorate cu bromură de etidiu și vizualizate în lumină ultravioletă.

4.4.3. Tehnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – Polimorfismului ADN-ului Amplificat la Întâmplare)

Este o tehnică bazată pe PCR, perfecționată de Williams și col. (1990) și Welsh și McClelland (1990). Cu ajutorul acestei tehnici sunt amplificate segmente de ADN despre care nu se cunosc detalii (întâmplătoare).

Cu ajutorul acestei tehnici este identificat polimorfismul unei secvențe nucleotidice utilizând un test bazat pe amplificarea ADN-ului în care se face uz doar de o secvență nucleotidică aleasă arbitrar.

În vederea amplificării ADN-ului genomic se utilizează un singur primer alcătuit din 10 baze nucleotidice. Acesta se leagă de ADN-ul genomic în două sit-uri diferite pe catene opuse ale matriței de ADN.

Dacă aceste două situs-uri se găsesc la o distanță convenabilă pentru amplificare, în urma amplificării PCR se produc cantități discrete de ADN (fig. 44).

Prezența fiecărui produs de amplificare conduce la identificarea completă sau parțială a omologiei secvenței nucleotidice dintre ADN-ul genomic și primerul oligonucleotidic la fiecare terminație a produsului de amplificare.

Fiecare primer va dirija amplificarea mai multor loci în genom, făcând din acest test o cale eficientă de evidențiere a polimorfismului secvențelor nucleotidice la diferiți indivizi. Astfel, un anumit fragment de ADN care este generat doar pentru un individ și care nu coincide cu cel generat pentru alt individ prezintă polimorfism al ADN-ului, putând fi astfel utilizat ca marker genetic. Acești markeri sunt transmiși la descendenți pe cale mendeleeană.

Principalul avantaj al acestei tehnici constă în aceea că nu necesită cunoașterea detaliilor referitoare la secvența de ADN. De asemenea, merită subliniat faptul că este o tehnică ușor de realizat, utilizează fluorescența în locul radioactivității (Williams și col, 1992 citat de Tingey și col., 1993) și necesită cantități de ADN doar de ordinul nanogramelor.

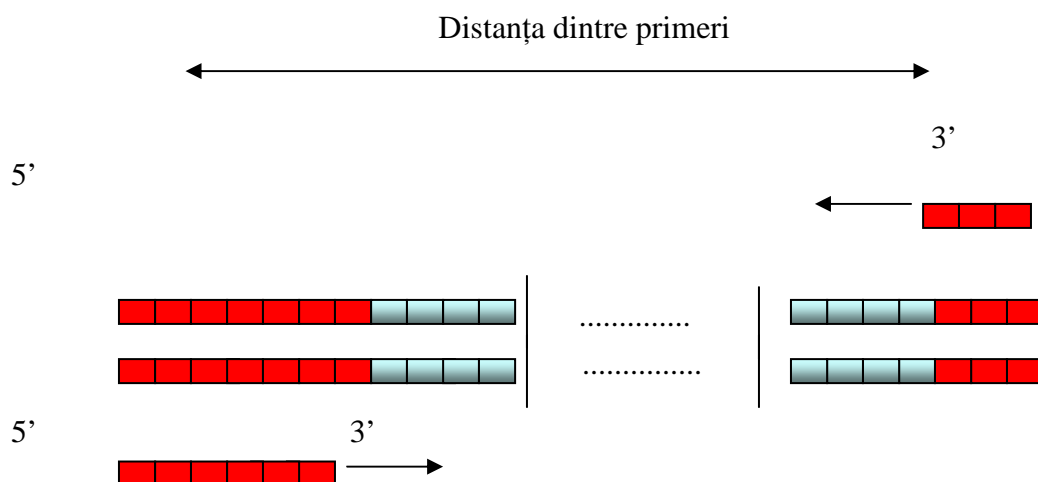


Figura 44. Diagrama schematică a RAPD

În vederea identificării unor gene care conferă rezistență la boli și dăunători la albine, este necesară atât evidențierea genomului (Crozier și col., 1993) cât și alcătuirea unei hărți de linkage.

În vederea alcătuirii unei hărți de linkage, Hunt și col. (1995) au generat markeri RAPD cu ajutorul primer-ului UBC-239, demonstrând polimorfismul tipic al acestora (fig. 45).

Primul culoar din stânga corespunde mamei mătcii F1, iar celelalte culoare conțin ADN amplificat de la descendenții trântorilor haploizi ai mătcii F1 cu excepția markerul-ui de greutate moleculară situat pe culoarul central (*).

Cei cinci markeri care au contribuit la cartarea grupelor de linkage au fost: 239-1, 239-96f, 239-59, 239-4 și 239-29f.

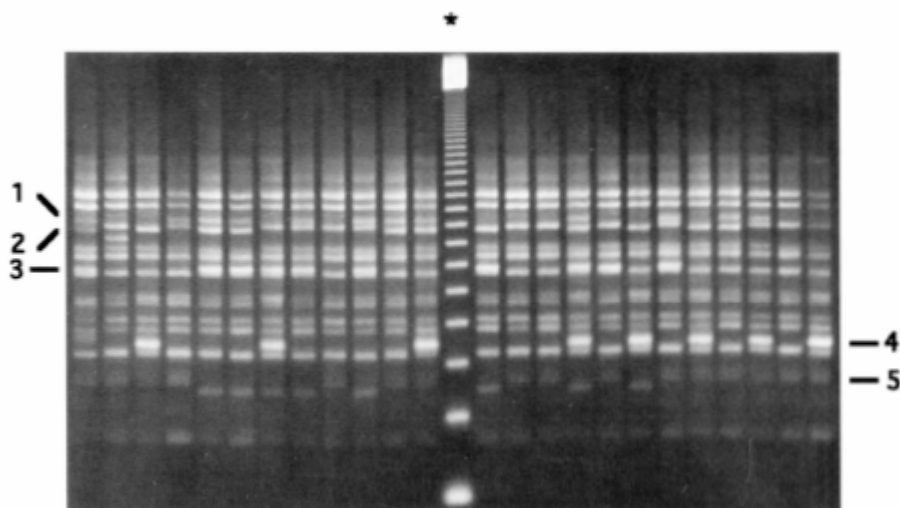


Figura 45. Gelul obținut în urma amplificării ADN-ului polimorfic generat de primerul UBC-239 (după , H u n t și col., 1995)

Harta de linkage alcătuită de H u n t și col. (1995) s-a realizat pe baza segregării a 365 markeri RAPD utilizând descendența haploidă de sex masculin a unei singure mătci.

Aceștia s-au dovedit foarte eficienți în cartare, cu aproximativ 2,8 loci cartăți la fiecare primer 10-nucleotidic utilizat în PCR (fig. 46).

Tehnici de biologie moleculară utilizate la albine



Antonia ODAGIU, Ioan Gh. OROIAN – Caracteristici ecopatologice la insecte, abordare moleculară. Volumul 1. *Apis mellifera* L.
Tehnici de biologie moleculară utilizate la albine

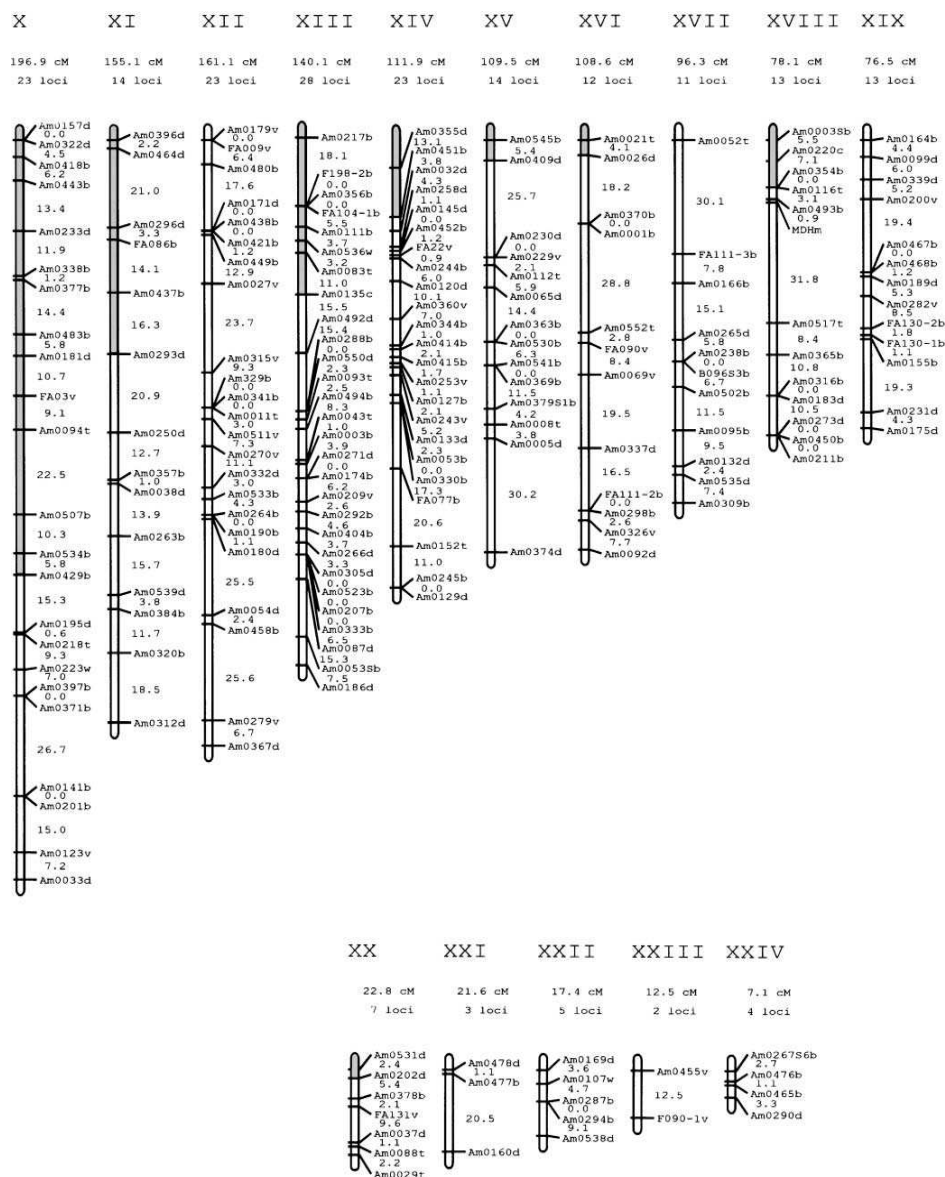


Figura 46 – continuare
Harta de linkage la *Apis mellifera* L. alcătuită pe baza markerilor RAPD
(după , Hunt și col., 1995)

Comparații efectuate între markerii RAPD și microsateliți identificați la o populație de șerpi (*Sistrurus c. catenatus*) utilizați în studii populaționale și de variabilitate au demonstrat cu ajutorul analizei de varianță (ANOVA) faptul că aceștia prezintă performanțe asemănătoare. Cu toate acestea, se pare că microsateliții ar fi mai adecvați în studiile realizate la nivelul populațiilor (Loughed, S.C., 2000).

Variabilitatea genetică din cadrul unor populații la viespi (*Polybia equatorialis*) a fost evidențiată prin aplicarea tehnicii RAPD, ceea ce a condus la relevarea unor informații interesante și privitoare la diviziunea muncii în coloniile respective. S-a emis de asemenea ipoteza că această diviziune a muncii ar putea fi un factor ce contribuie la menținerea unui grad înalt de variabilitate genotipică în cadrul acestor colonii (O'Donnell, S., 1996)

4.4.4. Tehnica AFLP (Amplified Length Polymorphism – Polimorfismul amplificat al lungimi fragmentelor de ADN)

Această tehnică este o variantă a RFLP, prin care este evidențiată prezența sau absența fragmentelor de restricție și nu lungimea lor.

Ea se bazează pe ligarea adaptorilor de fragmentele de restricție genomice, după care urmează amplificarea prin PCR cu primeri specifici adaptorilor (Savelkoul, P.H.M. și col., 1999).

Diferențele dintre fragmentele generate prin această tehnică pot fi detectate ca urmare a modificărilor situs-urilor de restricție/adaptorului, sau a inserțiilor/delețiilor din fragmentul de ADN. Pentru această tehnică nu este necesară cunoașterea genomului, datorită utilizării adaptorilor unei secvențe cunoscute ce este ligată de fragmentele de restricție.

Pentru analiza AFLP sunt necesare cantități reduse de ADN genomic purificat, iar principiul metodei este prezentat în fig.47.

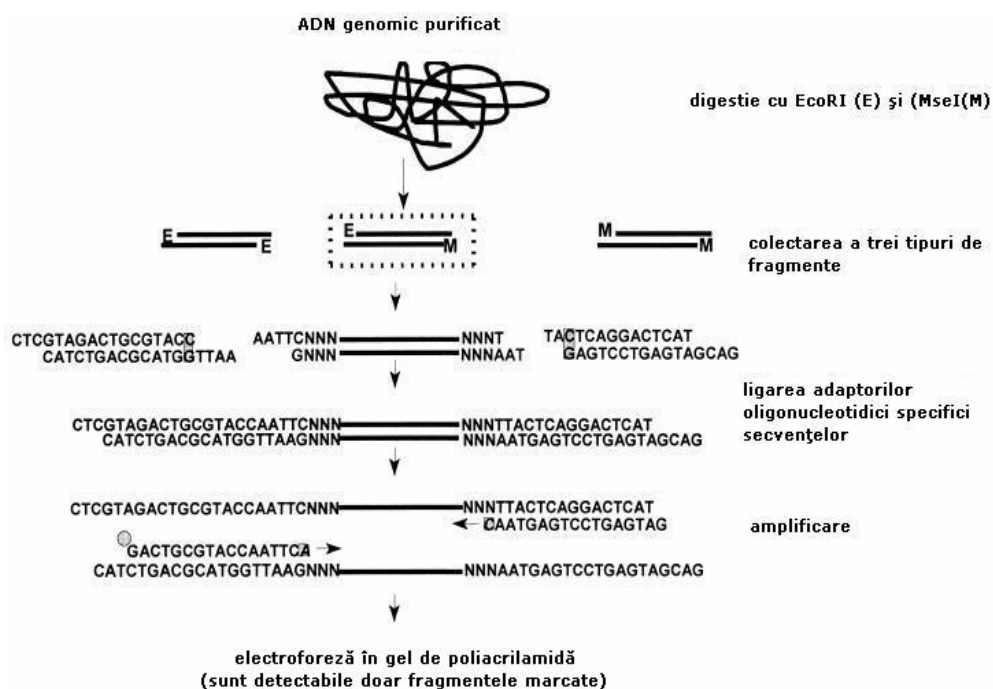


Figura 47. Reprezentarea schematică a principiului AFLP
(după Savelkoul, P.H.M. și col., 1999)

Realizarea tehnicii AFLP implică patru etape (A m a d o r, D.M. și col., 2001):

⇒ **Restricția ADN-ului genomic**

Fragmentele de restricție din ADN-ul genomic sunt produse cu ajutorul a două enzime de restricție MseI (4 pb) care scindează la distanțe mici și EcoRI (6 pb) la distanțe mai mari.

⇒ **Ligarea adaptorilor oligonucleotidici**

Adaptorii dublu catenari constau din o secvență ”miez” și o secvență specifică enzimei. Ei sunt specifici atât pentru situs-ul EcoRI cât și pentru MseI. Restricția și ligarea se produc în cadrul unei singure reacții. Ligarea adaptorului la nivelul situs-ului de restricție a ADN-ului modifică situs-ul de restricție astfel încât previne producerea celei de a doua scindări după ce s-a produs ligarea.

Se utilizează următorul amestec de restricție ligare:

- tampon de ligare 10 x T4
- NaCl 0,5 M
- BSA 1 mg/ml
- 50 μM adaptorii MseI (5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'
3'-CAT CTG ACG CAT GGT TAA-3')
- 5 μM adaptorii EcoRI (5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3'
3'-TA CTC AGG ACT CAT-5')
- EcoRI 20 U/ ml
- MseI 4 U/μl
- ADN ligază T4 3 U/μl

Reactivii se adaugă în ordinea indicată în tub, după care se adaugă ADN-ul genomic (0,5 – 1 µg).

Se amestecă și se centrifughează la 14.000g timp de 15 secunde.

Se incubează 2 ore sau mai mult la 37⁰C (sau pe timpul nopții la temperatura camerei).

⇒ **Amplificarea preselectivă**

Primerii utilizați în această etapă constau dintr-o secvență „miez”, o secvență specifică enzimei de restricție și o extensie selectivă alcătuită dintr-o singură bază la capătul 3’.

Secvențele adaptorilor și situs-urilor de restricție servesc ca situs-uri de legare a primeriilor pentru „amplificarea PCR preselectivă”.

Fiecare primer preselectiv posedă o nucleotidă „selectivă” care recunoaște subsetul fragmentelor de restricție ce au perechea nucleotidică în aval de situs-ul de restricție.

Prođușii primari ai acestei etape sunt acele fragmente ce au fost scindate o dată de MseI și o dată de EcoRI și posedă nucleotidele pereche.

Etapa de amplificare preselectivă conduce la reducerea de 16 ori a complexității fragmentului de ADN analizat.

Se utilizează următorul amestec amplificare preselectivă:

- apă
- tampon PCR (apă/MgCl₂ 15 mM) x 10
- dNTP mM
- primeri PS EcoRI A (5' - GACTGCGTACCAATTC A - 3')
- primeri PS MseI C (5' - GATGAGTCCTGAG TAA C - 3')
- ADN polimerază termostabilă 5 U/ µl

În fiecare tub se adaugă 15 µl, amestec de preamplificare şi 5 µl din probe. Se amestecă şi se centrifughează la 14.000g timp de 15 secunde. Amplificarea preselectivă se realizează cu următorul program pentru termocycler:

72⁰C2 minute

Incubare inițială

94⁰C 20 secunde denaturare

56⁰C 20 secunde cuplare

72⁰C 20 secunde extensie



20 de cicluri

72⁰C 2 minute

Extensie finală

60⁰C 30 minute

Incubare finală

Se adaugă 180 µl tampon TE (dilat de 10 ori).

⇒ **Amplificarea selectivă cu primeri marcați**

Primerii selectivi sunt marcați atât radioactiv cât și fluorescent. Ei constau dintr-o secvență identică cu cea a primeri-lor utilizați la amplificarea preselectivă plus încă două nucleotide selective la capătul 3'.

Aceste două nucleotide suplimentare pot fi oricare dintre cele 16 combinații posibile ale celor patru nucleotide.

Din numărul imens de fragmente generate de enzimele de restricție, doar cele ce se potrivesc nucleotidelor vor fi amplificate (50 – 200 fragmente). Această etapă reduce complexitatea produsului PCR de 256 de ori.

Diferitele combinații de primeri vor genera fragmente diferite. Este necesară o evidențiere preliminară pentru a alege perechea de primeri care generează niveluri de variație adecvate.

Amestecul de amplificare selectivă:

- apă
- tampon PCR (apă/MgCl₂ 15 mM) x 10
- dNTP mM
- primeri EcoRI **A** 0,46 μM (5'-*FAM*-GACTGCGTACCAATTC **ACT** -3')
- primeri MseI **C** 2,75 μM (5'- GATGAGTCCTGAG TAA **CAG** -3')
- ADN polimerază termostabilă 5 U/ μl

În fiecare tub se adaugă 15 μl, amestec de preamplificare și 5 μl din probe.

Se amestecă și se centrifughează la 14.000g timp de 15 secunde

Amplificarea preselectivă se realizează cu următorul program pentru termocycler:

72⁰C 2 minute

Denaturare inițială

94⁰C 20 secunde denaturare

56⁰C 20 secunde cuplare

72⁰C 20 secunde extensie

94⁰C 20 secunde denaturare

Se scade 1⁰C/ciclu 30 secunde cuplare

72⁰C 20 minute extensie

} 9 cicluri

94⁰C 20 secunde denaturare

56⁰C 20 secunde cuplare

72⁰C 20 secunde extensie

} 20 de cicluri

60⁰C 30 minute

Incubare finală

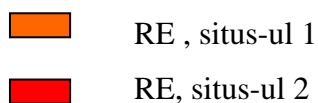
⇒ **Analiza fragmentelor amplificate obținute în gel**

Datorită faptului că fragmentele sunt marcate cu coloranți ce prezintă fluorescență pot fi separate și cuantificate cu ajutorul secvențatorului.

Proba multiplă (amplificată cu seturi separate de primeri, fiecare marcată cu o culoare fluorescentă diferită) poate fi plasată pe un singur gel alături cu un standard marcat de ADN.

În secvențator se introduc 5 μ l din produsul de reacție rezultat de la amplificarea selectivă și se adaugă 5 μ l colorant fluorescent.

Schematic, principiul AFLP poate fi redat astfel:



ADN genomic



ADN restricționat



Adaptorii complementari ai secvenței cunoscute sunt ligați de terminațiile restrictive ale ADN-ului. Dacă enzimele de restricție utilizate la tăierea ADN-ului genomic nu sunt labile termic, secvența adaptoare nu trebuie să regenereze secvența de recunoaștere originală.

Adaptori complementari



Matrița de AND ligată este acum gata pentru amplificarea PCR.

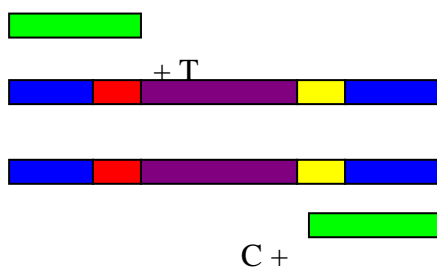
Fragmentul ligat



Pentru a reduce din start complexitatea populația fragmentului adaptat, amplificarea PCR se realizează cu primeri complementari secvențelor adaptoare, fiecare cu o nucleotidă selectivă.

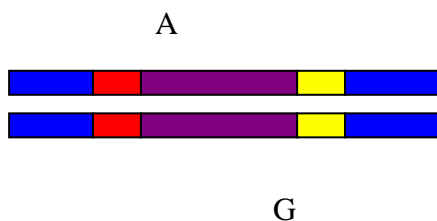
Teoretic, presupunând existența de frecvențe nucleotidice egale și că fiecare bază adițională se extinde în regiunea necunoscută de AND ar trebui să reducă numărul fragmentelor generate cu $4n$ (n – numărul de baze adiționale). PCR se realizează în condiții stricte asigurându-se ca doar cuplările perfecte să ajungă la elongație.

Primer 1



Primer 2

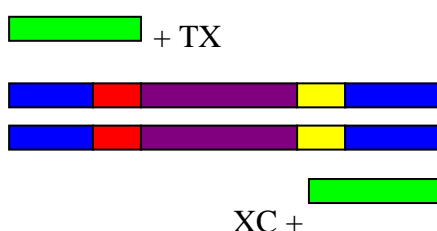
Populația fragmentelor preselective generate prin PCR constă în primul rând din cele cu următoarea frecvență:



Prođușii preselectivi sunt din nou amplificați la fel ca în etapa anterioară, dar unul dintre primeri, cu posibile nucleotide selective multiple va fi marcat cu fluorofor. Doar fragmentele ce conțin un situs cu primer complementar primerului marcat cu fluorofor va fi vizualizat în continuare.

Numărul de nucleotide selective necesar pentru distribuția optimă a fragmentului este în mare măsură dependent de complexitatea ADN-ului țintă care variază mult printre clasele de organisme.

Primer 1



Primer 2

Datorită faptului că utilizează markeri ADN ce au polimorfism ridicat, această tehnică și-a dovedit utilitatea în construirea de hărți de linkage în vederea identificării QTL pentru însușirile legate de comportamentul igienic la albine (Wilkes, K. și col., 2002).

Aplicarea AFLP a contribuit și la evidențierea a peste 315 STS utilizate în alcătuirea hărții de linkage la *Apis mellifera* L., ceea ce se preconizează că ar avea drept rezultat facilitarea muncii de cercetare în vederea alcătuirii unei liste de gene candidate asociate cu comportamentele complexe la această insectă (Schlipalius D.I., 2004).

4.4.5. Tehnica RT – PCR (Reverse Transcriptase – PCR - Revers Transcripția – PCR)

Această tehnică este tot o variantă a PCR-ului, în care amplificarea pornește de la câteva molecule de ARNm. În prezența revers transcriptazei, molecula de ARNm devine matriță pentru sinteza ADNc, după care procesul de amplificare decurge în mod normal (fig. 48).

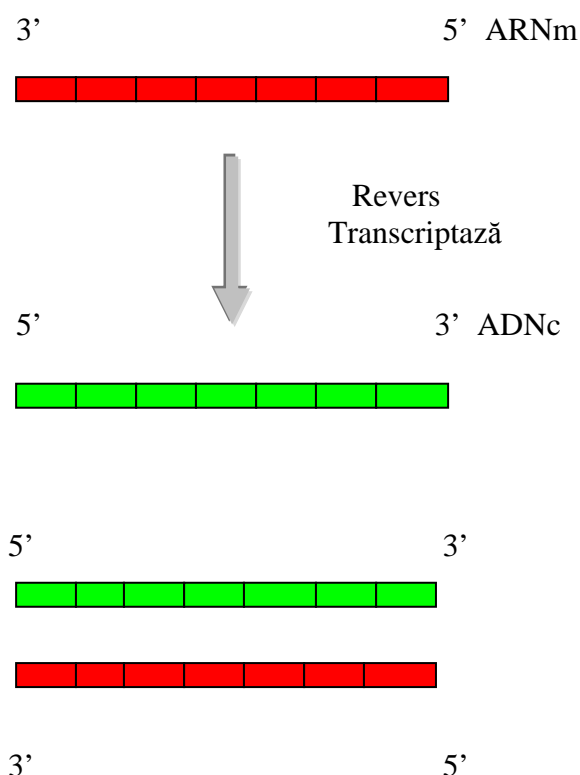


Figura 48. Principul RT – PCR

Cuantificarea expresiei genice se bazează pe presupunerea că se păstrează o anumită proporționalitate între cantitatea de ADN de la începutul reacției și cantitatea produsului de amplificare.

O apreciere a cantității de ARNm prezent înainte de transcrierea inversă poate fi făcută prin compararea intensității benzilor într-un gel de agaroză.

Este demn de subliniat faptul că aplicarea PCR la moleculele de ARN necesită o modificarea a PCR în prima etapă.

Pentru că molecula nu poate fi copiată în prezența Taq polimerazei, această etapă este catalizată de revers transcriptază, enzimă în prezența căreia este sintetizată molecula de ADN pe matrița de ARN.

Copia de ADN este apoi amplificată în prezența Taq polimerazei, prin tehnica specifica RT-PCR.

Descoperirea enzimelor termostabile (ex. ADN-polimeraza T obținută din bacteria *Thermus thermophilus*) cu ajutorul cărora pot fi obținute copii termostabile de ADN atât de pe matrițe de ADN cât și de pe matrițe de ARN deschide va face posibilă aplicarea RT – PCR în condițiile în care va fi necesară o singură reacție în prezența unei singure enzime (Brown, T.A., 2002).

Aplicarea acestei tehnici și-a dovedit utilitatea în special la identificarea nor markeri moleculari la *Apis mellifera*, cu ajutorul cărora este pusă în evidență prezența virușilor în organismul insectei, în cercetările efectuate în întreaga lume.

Avantajul ei constă în faptul că s-a dovedit un instrument rapid, specific și sensibil în diagnoza virală la albine, punând în evidență acizii nucleici virali cu o acuratețe mult superioară metodelor tradiționale de analiză (Grabensteiner, E. și col., 2001).

În 2002, Evans, J.D. și Hung, A.K., în SUA, au realizat o clasificare a virusurilor ce atacă albinele. Conform acestor cercetări, ele aparțin la două clase de virusuri: cele de tip picorna, precum și o clasă de virusuri cunoscute sub numele de virusuri de tip *Drosophila*.

Leat, N.și col. (2003), în Africa de Sud, au pus în evidență cu ajutorul RT-PCR virusul celulei negre a mătcii, stabilind în același timp și apartenența acestuia la virusurile de tip picorna.

Tot în Africa de Sud, cercetări efectuate în ultima decadă (Davison, S. și col., 2003) au pus în evidență și caracterizat 18 viruși ce infestază albinele, obținându-se și secvența completă a genomului pentru cei de tip picorna (virusul paraliziei acute, celulei negre a mătcii, puietului în sac și a aripilor deformate).

Bekesi, L. și col. (1999) și Bakonnyi, T. și col. (2002) au evidențiat prin aceeași tehnică gradul de infestarea a stupinelor din Ungaria cu virusul paraliziei acute, a cărui agent viral este parazitul *Varroa destructor*.

Existența unor cazuri de coinfecție realizată de virusurile paraliziei acute și Kashmir asupra organismului albinei a fost pusă în evidență de Evans, J. (2002). De asemenea, Hung, A.C. a evidențiat și posibilitatea determinării existenței virusului Kashmir cu ajutorul RT-PCR din excreta albinelor.

Tot cu ajutorul RT-PCR a fost evidențiat rolul de agent viral al parazitului *Varroa destructor* în vehicularea unei mari varietăți de viruși. Aplicația cea mai importantă a fost demonstrată în cazul virusului aripilor deforme la albine în stupinele din Anglia și Suedia (Bowen-Walker, P.L. și col., 2002; Nordström, S., 2003).

În Austria, evidențierea prezenței virusului puietului în sac (Grabensteiner, E. și col., 2001) s-a realizat tot prin tehnici moleculare, având drept principal instrument de laborator tehnica RT-PCR, renunțându-se la studiile tradiționale ce implică microscopia electronică și analizele RIA.

*

*

*

Perfecționarea tuturor acestor tehnici moleculare a contribuit la dezvoltarea concomitentă a o serie de firme cu renume în ziua de azi (**Sigma, Promega, Bio-Rad, Cambridge Bioscience, New England Biolabs, Appligene, Clontech, Stratagene** etc.) care dispun de propriile lor laboratoare și care pun la dispoziția cercetătorilor implicați în acest domeniu nu numai reactivi de înaltă puritate ci și kit-uri comerciale, ce facilitează în mare măsură munca de cercetare.

Sunt furnizate kit-uri atât pentru o analiză completă a ADN-ului, cât și pentru etape separate (extracție, marcarea, clonare) sau pentru identificarea de markeri moleculari prin diverse tehnici (tabelul 2).

Tabelul 2. Kit-uri comerciale disponibile pentru utilizare în tehnicile moleculare folosite la *Apis mellifera* L. (după L o x d a l e și col., 1998)

Companiile comerciale											
Kit-uri	Appligene	Amersham	Bio-Rad	Boehringer Mannheim	Cambridge Bioscience	Clontech	New England Biolabs	Pharmacia	Promega	Stratagene	Sigma
Extracția ADN-ului genomic	●	●	●		●			●	●	●	●
Marcare întâmplătoare	●	●	●	●				●	●	●	
Translație Nick	●			●					●		
Marcare finală				●					●		
Radioizotopi		●									
Marcare cu biotină	●	●		●		●	●		●		●
Colorare cu argint			●					●	●		●
Fluorescență		●		●	●		●	●	●	●	●
PCR			●	●		●		●	●	●	●
Clonare		●	●	●	●	●		●	●	●	●
Secvențiere (normal)		●		●	●			●	●		
Secvențiere pe cicluri		●		●			●	●	●	●	
Geluri pretratate										●	
Markeri moleculari	●	●		●	●		●	●	●	●	●



Markerii genetici își găsesc utilitatea în alcătuirea hărților de linkage care sunt utilizate cu mult succes în identificarea QTL.

În toate aceste analize se face uz de soft-uri specifice elaborate în vederea facilitării procesului de cartare.



Importanța identificării localizării exacte a QTL rezidă în posibilitatea utilizării acestora în design-ul experimental a unor programe de ameliorare aplicate în vederea obținerii însușirilor dorite (comportamentul igienic ce favorizează rezistența la boli și paraziți la *Apis mellifera* L.). Cunoșcând care zone cromozomiale prezintă importanță, pot fi efectuate manipulări genetice în favoarea însușirii urmărite.



BIBLIOGRAFIE

1. Alvarez J.M., 1998, **Molecular Markers for Insect Ecology**, www.ergito.com
2. Amador D.M., D. Brazeau, B. Farmerie, A. Blake, G. Clark, and M. Whitten, 2001, **Introduction to AFLP, and General features of AFLP markers**, AFLP Workshop, Interdisciplinary Center for Biotechnology Research, University of Florida, Gainesville, Florida, June 11 – 13, 2001
3. Anderson D., J.W.H. Trueman, 2000, **Varroa jacobsoni (Acari: Varroidae) is more than one species**, Experimental & Applied Acarology, No. 24, 165-189
4. Arathi H.S., Marla Spivak, 2001, **Influence of colony genotypic composition on the performance of hygienic behavior in the honeybee, *Apis mellifera* L.**, Animal Behavior, 62, 57 – 66
5. Bachanova K., J. Klaudiny, J. Kopernicky, J. Simuth, 2002, **Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus larvae* larvae through bacterial growth – inhibition assay on polyacrylamide gel**, Apidologie, vol. 33, 259 - 269
6. Bakonyi, T., Derakhshifar, I., Grabensteiner, E., Nowotny, N., 2003, **Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization**, Applied and Environmental Microbiology, vol. 69, no. 3, 1504 - 1510
7. Bakonyi T., R. Farkas, A. Szendroi, M. Dobos – Kovacs, M. Rusvai, 2002, **Detection of acute bee paralysis virus by RT – PCR in honey bee and *Varroa destructor* field samples: rapid screening of representative Hungarian apiaries**, Apidologie, vol. 33, 63 – 74

8. Bekesi L., B.V. Ball, M. Dobos – Kovacs, T. Bakonyi, M. Rusvai, 1999, **Occurrence of acute paralysis virus of the honey bee (*Apis mellifera*) in a Hungarian apiary infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni***, Acta Veterinaria Hungarica, vol. 3, no. 47, 319 – 324
9. Benjeddou M., N. Leat, M. Allsopp, and S. Davison, 2002, **Detection of Acute Bee Paralysis Virus and Black Queen Cell Virus from Honeybees by Reverse Transcriptase PCR**, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 67, No. 52384 - 2387
10. Benoit J. B., J.A. Yoder, D. Sammataro, L.W. Zettler, 2004, **Mycoflora and fungal vector capacity of the parasitic mite, *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies**, International Journal of Acarology, Vol. 30, No. 2, 103 – 106
11. Besansson D., D.X. Yhang, D.L. Hartl, G.M. Hewitt, 2001, **Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses**, Trends in Ecology and Evolution, no. 16, 314 - 321
12. den Besten P. J. , H.J. Herwig, E.G. van Donselaar and D.R. Livingstone, 1990, **Cytochrome P-450 monooxygenase system and benzo(a)pyrene metabolism in echinoderms**, Marine Biology, Vol. 107, No. 1, 171 – 177
13. den Besten P.J., 1998, **Cytochrome P450 monooxygenase system in echinoderms**, Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, Vol. 121, No. 1 - 3, 139 – 146
14. Beye M., G.J. Hunt, R.E. Page, M.K. Fondrk, L. Grogmann, and R.F.A. Moritz, 1999, **Usually high recombination rate detected in sex locus region of the honey bee (*Apis mellifera*)**, Genetics, no. 153, 1701 - 1708
15. Beye M., M.K. Fondrk, M. Hasselmann, R.E. Page, 2001, **A strategy to generate variable DNA markers from known sequences for marker based mapping procedures in honey bees**, Methods Mol. Biol., no. 85, 75 – 78
16. Black W.C., N.M. DuTeau, G.J. Puterka, J.R. Nechols, & J.M. Pettorini, 1992, **Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae)**, Bulletin of Entomological Research 82, 151– 159.
17. Boecking, O., Bienenfeld, K., Drescher, W., 2000, **Heritability of the *Varroa* – specific hygienic behavior in honey bees (*Hymenoptera: Apidae*)**, Journal of Animal Breeding and Genetics, vol. 117, no.6, 417 – 424
18. Bowen-Walker, P.L., Martin, S.J., and Gunn, A., 1998, **The transmission of Deformed Wing Virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the**

- ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni*, Experimental and Applied Acarology, vol. 22, 437 – 441
19. Breed M.D., 2003, **Quantitative trait loci (QTL's)**, www.animalbehavioronline.com/qtl.html
 20. Bruneau E., F. Jacobs, and J. Trouiller, 1997, **Résultats de la campagne de détection de la résistance de Varroa aux pyrèthrinoides en Belgique - 1997**. Abeilles et Compagnie, No. 60, 5 – 6
 21. Brogden K.A., 2005, **Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?**, Nature Reviews Microbiology 3, 238-250
 22. Brown T.A., 2002, **Genomes**, 2nd Edition, BIOS Scientific Publishers Ltd., 101, 121, 122
 23. Bulet P., C. Hetru, J.L. Dimarcq, D. Hoffmann, 1999, **Antimicrobial peptides in insects: structure and function**, Developmental and Comparative Immunology, vol. 23, 329 – 344
 24. Burton M.P., B.G. Schneider, R. Brown, N. Escamilla-Ponce, & M.L. Gulley, 1998, **Comparison of histologic stains for use in PCR analysis of microdissected, paraffin-embedded tissues**, Biological Techniques 24, 86 – 92
 25. Cameron S.A., P. Mardulym, 2003, **The major opsin gene is useful for inferring higher level phylogenetic relationships of the corbiculate bees**, Molecular Phylogenetics and Evolution, no., 28, 610 – 613
 26. Casteels – Josson K., W. Zhang, T. Capaci, P. Casteels, P. Tepst, 1994, **Acute Transcriptional Response of the Honeybee Peptide – Antibiotics Gene Repertoire and Required Post – transitional Conversion of the Precursor Structures**, Journal of Biological Chemistry, vol. 269, no. 46, 28569 – 28575
 27. Châline N., L.W.F. Ratnieks, N.E. Raine, N.S. Badcock, T. Burke, 2004, **Non – lethal sampling of honey bee *Apis mellifera*, DNA using wing tips**, Apidologie, vol. 35, 311 – 318
 28. Chandra, S.B.C., G.J. Hunt, S. Cobey, and B.H. Smith, 2001, **Quantitative Trait Loci Associated with Reversal Learning and Latent Inhibition in Honeybees (*Apis mellifera*)**, Behavior Genetics, vol. 31, no. 3, 275 - 285
 29. Cornet B., J.M. Bonmatin, J. Hetru, J.A. Hoffmann, M. Ptak, F. Vovelle, 1995, **Refined three – dimensional solution structure of insect defensin A, Structure**, vol. 3, no. 5, 435 - 448
 30. Cornuet, J-M., L. Garnery, and M. Solignac, 1991, **Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA**, Genetics, no. 128, 393 – 403

31. Correa-Marques M.H. L.M. Medina, S.J. Martin, and D. De Jong, 2003, **Comparing data on the reproduction of *Varroa destructor***, Genetic Molecular Research No. 2, 1 - 6
32. Coșier Viorica, A. Vlaic, 2007, **Abordarea practică a problemelor de genetică animală**, Editura Todesco, Cluj - Napoca
33. Crozier R.H., Y.C. Crozier, 1993, **The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization**, Genetics, no. 133, 97 – 117
34. Cruickshank R.H., 2001, **Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks**, Systematic & Applied Acarology, no. 7, 3 - 14
35. Davison S., N. Leat, M. Benjeddou, 2003, **Development of molecular tools for honeybee virus research: the South African contribution**, African Journal of Biotechnology, vol. 2, no. 12, 698 – 713
36. Dezmirean S. D., L.Al. Mărghițaș, Grația I. Dezmirean, Georgeta Diniță, Otilia Bobiș, Laura Laslo, Adela Moise, Antonia Odagiu, A. Fițiu, I. Pașca, Cristina Bojan, Simona Bârsan, O. Maghear, C. Coroian, M. Man, 2007, **Reccomandations regarding prophylaxis of honey contamination during primary processing**, Apicultura – de la știință la agribusiness și apiterapie, 82 - 84
37. Delaplane K., J.A. Berry, J.A. Skinner, J.P. Parkman, W.M. Hood, 2005, **Integrated pest management against *Varroa destructor* reduces colony mite levels and delays treatment threshold**, Journal of Apicultural Research, No. 44, 157 – 162
38. Denholm C.H., 1999, **Inducible honey bee viruses associated with *Varroa jacobsoni***, Ph.D. thesis Keele University, Staffordshire, and IACR – Rothamsted, Hertfordshire, UK
39. Djordjevic S.P., Wendy A. Forbes, Lisa A. Smith, and M.A. Hornitzky, 2000, **Genetic and biochemical diversitz among isolates of *Penibacillus alvei* cultured from Australian honeybee (*Apis mellifera*) colonies**, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 66, No. 3, 1098 - 1106
40. Doggett N.A., 1992, **The Polymerase Chain Reaction nd Sequence-tagged Sites**, Los Alamos Science, No. 20, 128 - 134
41. Dong K., 2007, **Insect sodium channels and insecticide resistance**, Invertebrate Neuroscience, Vol. 7, No. 1, 1493 - 1104
42. O'Donnell S., 1996, **RAPD markers suggest genotypic effects on forager specialization in an eusocial wasp**, Behavioral Ecology Sociobiology, no. 38, 83 – 88
43. Donzé G., Silvia Schnyder-Candrian, S. Bogdanov, P.A. Diehl, P.M. Guerin, Verena Kilchenman. F. Monachon, 1998, **Aliphatic alcohols and aldehydes of the honey bee cocoon induce arrestment behavior in *Varroa jacobsoni* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasite of *Apis***

- mellifera*, Archives of Insect Biochemistry and Physiology, Volume 37, Issue 2, 129–145
44. Downey D.L., T.T. Higo, M.L. Winston, 2000, **Single and dual parasitic mite infestations on the honey bee, *Apis mellifera***, Insectes Sociaux No. 47, 171 – 176.
 45. Doyle K., D.C. Knipple, 1991, **PCR-Based Phylogenetic Walking: Isolation of Para-Homologous Sodium Channel Gene Sequences From Seven Insect Species and an Arachnid**, Insect Biochemistry, No. 21, 689 – 696
 46. Eleftherianos I., S.P. Foster, M.S. Williamson and I. Denholm, 2008, **Characterization of the M918T sodium channel gene mutation associated with strong resistance to pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer)**, Bulletin of Entomological Research, No. 98, 183 – 191
 47. Elzen P.J., and D. Westervelt, 2002, **Detection of coumaphos resistance in *Varroa destructor* in Florida**, American Bee Journal, No. 142, 291 – 292
 48. Estoup A., M. Solignac, M. Harry and J.M. Cornuet, 1993, **Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris***, Nucleic Acids Research, vol. 21, Issue 6, 1427 – 1431
 49. Estoup A., L. Garnery, M. Solignac, and J-M. Cornuet, 1995, **Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models**, Genetics, no. 140, 679 – 695
 50. Evans J.D., A.C. Hung, 2000, **Molecular phylogenetics and the classification of honey bee viruses**, Archives of Virology, vol. 145, no. 10, 2015 – 2026
 51. Evans J.D., 2002, **Genetic Evidence for Coinfection of Honey Bees by cute Bee Paralysis and Kashmir Bee Viruses**, Journal of General Virology, vol. 7., no. 4, 1716
 52. Evans J.D., 2004, **Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae***, Journal of Invertebrate Pathology, vol. 85, no. 2, 105 - 111
 53. Faye B, D. Waltner-Toews, J. McDermott, 1999, **From ecopathology to agroecosystem health**, Vol. 39 (2), 111 - 128
 54. Flores J.M., J.A. Ruiz, J.M. Ruiz, F. Puerta, M. Bustos, 2001, **Hygienic behavior of *Apis mellifera iberica* against brood cells artificially infested with varroa**, Journal of Apicultural Research, vol. 40, no. 1, 29 – 34

55. Fries I., H. Hansen, A. Imdorf, P. Rosenkranz, 2003, **Swarming in honey bees (*Apis mellifera*) and *Varroa destructor* population development in Sweden**, *Apidologie*, 34, 389 - 397
56. Grabensteiner, E., Ritter, W., Carter, M.J., Davison, S., Pechhacker, H., Kolodziejec J., O. Boecking, I. Derakhshifar, R. Moosbeckhofer, E. Licek, N. Nowotny, 2001, **Sacbrood Virus of the Honeybee (*Apis mellifera*): Rapid Identification and Phylogenetic Analysis Using Reverse Transcription – PCR**, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, vol. 8, no.1, 93 – 104
57. Harris J.W., J.D. Villa, R.G. Danka, 2004, **Environmental effects on the growth of *Varroa* mite populations**, *Bee Culture*, Vol.132, No. 5, 23 – 25
58. Hayden M.J., and P.J. Sharp, 2001, **Sequence-tagged microsatellite profiling (STMP): a rapid technique for developing SSR markers**, *Nucleic Acids Research*, vo. 29, no. 8, 43 – 52
59. Hidas A., M.E. Edvi, Enikő Szalai – Matray, 2004, **Molecular genetic studies on honeybee of different varroa tolerance**, First European Conference on Apidology, Udine 19 – 23 September 2004, 34
60. Higasa,K., and K. Hayashi, 2002, **Ordered catenation of sequence-tagged sites and multiplexed SNP genotyping by sequencing**, *Nucleic Acid Research*, vol. 30, no. 3, e11, i-xiv
61. Higes M., J. Llorente, A. Sanz, A. Meana and R. Calonge, 1998, ***Varroa*: sensibilidad al fluvalinato**, *Vida Apícola*, No.89, 41- 45
62. Hillesheim E., W. Ritter, and D. Bassand, 1996, **First data on resistance mechanisms of *Varroa jacobsoni* (Oud.) against tau-fluvalinate**, *Exp. Appl. Acarol.* No. 20, 283 – 296
63. Huang Y.G., W. LiMing, L. QuiLian, 2001, **Preliminary research on mechanism of fluvalinate resistance in *Varroa jacobsoni*** *Chinese Bulletin of Entomology*, Vol. 38, <http://www.cababstractsplus.org/abstracts%5CAbstract.aspx?AcNo=20063106666>
64. Hung A.C.F., 2000, **PCR detection of Kashmir bee virus in honey bee excreta**, *Journal of Apicultural Research*, vol. 34, no. 3 – 4, 103 – 106
65. Hunt G.J. and E. Page Jr., 1995, **Linkage map of the honey bee *Apis mellifera*, based on RAPD markers**, *Genetics*, no. 139, 1371 – 1382
66. Hoy, Marjorie, A., 1994, **Insect Molecular Genetics, an Introduction to Principles and Applications**, Academic Press Inc.
67. Jandricic S.E., G. Otis, 2003, **The potential for using male selection in breeding honey bees resistant to varroa destructor**, *Bee World*, vol. 84, no. 4, 155 – 164
68. King R.K., W.D. Stansfield, 2002, **A dictionary of genetics**, Sixth Edition, Oxford University Press

69. Klaudini J., S. Albert, K. Bachanova, J. Kopernicky, J. Simuth, 2005, **Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honey bee, *Apis mellifera***, Insect Biochemistry, Molecular Biology, vol. 35, no. 1, 11 – 22
70. Lapidge K.L., B.P. Oldroyd, M. Spivak 2002, **Seven suggestive quantitative trait loci influence hygienic behavior of honey bees**, Naturwissenschaften, 89, 565 – 568
71. Leat N., B. Ball, V. Govan, S. Davison, 2003, **Analysis of the complete genome sequences of black queen – cell virus, a picorna – like virus on honey bees**, Journal of General Virology, vol. 8, no. 81, 2111
72. Lewey L., and C. Coates, 2003, **Identifying genetic basis for Varroa mite resistance in honey bee, *Apis mellifera***, Sixth Annual Graduate Student Forum, Texas A & M University Department of Entomology
73. Liakos V., Ch. Batzios, M. Kokkinis 2002, **Colonies of *Apis mellifera macedonica* (Ruttner) resistant to *Varroa destructor***, http://www.abstracts_greece.doc
74. Loughheed S.C., H.L. Gibbs, K.A. Prior, and P.J. Weatherhead, 2000, **A comparison of RAPD versus microsatellite DNA markers in population studies of the Massasauga Rattlesnake**, American Genetic Association, no. 91, 458 – 463
75. Loxdale H.D., and G. Lushai, 1998, **Molecular markers in entomology - review article**, Bulletin of Entomological Research, no. 88, 577 - 600
76. Mardones G., A. Venegas, 1999, **Chromogenic plate assay distinguishing bacteriolytic from bacteriostatic activity of an antibiotic agent**, Journal of Microbiological Methods, www.sciencedirect.com
77. Martin S. J., 2004, **Acaricide (pyrethroid) resistance in *Varroa destructor***, Bee World, No. 85, 67 - 69
78. Mărghitaș, L.Al., 2003, **Albinele și produsele lor**, Ed. Ceres, București
79. McClean P., 1998, **LOD Score Method of Estimating Linkage Distances**, www.ndsu.nodak.edu/instruct/mcclean/plsc431/linkage/linkage6.htm
80. Medina M.L., S.J. Martin, Espinosa – Montaña, and Ratnieks, F.L.W., 2002, **Reproduction of *Varroa destructor* in worker brood of Africanized honey bees (*Apis mellifera*)**, Experimental and Applied Acarology, 27: 79 – 88
81. Merce E., C.C. Merce, 2009, **Statistică. paradigme consacrate și paradigme integratoare**, Editura AcademicPres Cluj-Napoca
82. Milani N., 1995, **The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to pyrethroids: a laboratory assay**, Apidologie 26, 415 – 429

83. Milani N., G. Della Vedova, 2002, **Decline in the proportion of mites resistant to fluvalinate in a population of *Varroa destructor* not treated with pyrethroids**, Apidologie, No. 33, 417 – 422
84. Moosbeckhofer R., M. Baumgartner, E. Licek, H. Pechhacker, 2003, **Effects of oxalic acid evaporation on bee mortality in cage tests**, 8th European Meeting on Integrated Varroa Control, Kirchhain-Rauischholzhausen, <http://www.ages.at>
85. Morse R.A., K. Flottum Eds., 1997, **Honey Bee Pests, Predators, and Diseases**, Third Edition, A.I. Root Company, Medina Ohio, USA
86. Navajas M., B. Fenton, 2000, **The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review**, Experimental and Applied Acarology, vol., 24, no. 10/11, 751 – 774
87. Neumann P., R.F.A. Moritz, and D. Mautz, 1997, **Testing the reliability of the honeybee performance yard Schwarzenau using DNA microsatellites**, Apidologie, no. 28, 216 - 217
88. Neumann P., K. Fondrk, R.E. Pahe Jr., and R.F.A. Moritz, 1997, **Testing the reliability of DNA microsatellites in instrumentally inseminated queen honeybees (*Apis mellifera* L.)**, in Soziale Insekten, IUSSI – Tagung Graz, Crailsheim K., Stabenhtener A. Eds.
89. Neumann P., R.F.A. Moritz, 1999, **The impact of polyandry on the phenotype of honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies**, Behavioral Ecology, 46 – 59
90. Noedström S., 2000, **Virus infections and *Varroa* mite infestation in honeybee colonies**, Doctoral Dissertation, Uppsala, Suedia
91. Odagiu Antonia, A. Vlaic, L.Al. Mărghițaș, D. Dezmirean, M. Man, 2005, **Molecular mechanisms involved in Apistan resistance in *Varroa* mite – a review**, Proceedings of XL Croatian Symposium on Agriculture with International Participation, 625 – 626
92. Odagiu Antonia, A. Vlaic, L.Al. Mărghițaș, D. Dezmirean, Laura Laslo, 2006, **Preliminary research concerning the hygienic behavior in honeybees from the counties of Cluj**, Buletinul USAMV Cluj-Napoca, Seria Zootehnie și Biotehnologii, Vol. 62, 320 – 325
93. Odagiu Antonia, A. Vlaic, L.Al. Mărghițaș, D. Dezmirean, I. Cornoiu, Laura Laslo, 2007, **Research into the hygienic behaviour of honeybees in Transylvania**, Proceedings of the 42nd Croatian&2nd International Symposium on Agriculture, 13-16 February, 302 – 306
94. Odagiu Antonia, A. Vlaic, L.Al. Mărghițaș, D. Dezmirean, 2007, **The hygienic behavior – testing honeybee colonies from Transylvanian area**, în *Apicultura – de la știință la agribusiness și apiterapie*, Mărghițaș L.Al., D. Dezmirean - Coordonatori, Editura AcademicPres, Cluj – Napoca, 17 - 19

95. von Oers O.M., D. Peters, J.M. Vlak, 2000, **Comparative study of a novel virus of the Varroa mite and Deformed Wing Virus (DWV) of honeybee**, <http://www.wageningen-ur.nl/viro/research/baculo%20biology%20and%20biotechnoogy.html>
96. Page Jr. R.E., J.Gadau, and M. Beye, 2002, **The emergence of Hymenopteran Genetics**, Genetics, no. 156, 375 – 379
97. Pettis J.S., 2003, **A scientific note on Varroa destructor resistance to coumaphos**, U.S. Apidologie, Vol. 35, 91 - 92
98. Rakosy – Tican Elena, L.Al. Mărghițaș, 2007, **The bees as vehicles for transgene transfer from genetically modified plants to other organisms – theoretical issues**, în *Apicultura – de la știință la agribusiness și apiterapie*, Mărghițaș L. Al., D. Dezmirean - Coordonatori, Editura AcademicPres, Cluj – Napoca, 184 – 188
99. Rice R.N., 2001, **Nosema Disease in Honeybees, Genetic Variation and Control**, RIRDC Publication No 01/46, viii
100. Rinderer T.E., G.T. Delatte, L.I. de Guzman, J.L. Williams, J.A. Stelzer, V.N. Kuznetsov, 1999, **Evaluation of the Varroa – resistance of honey bees imported from Far-Eastern Russia**, American Bee Journal no. 139, 287 - 290
101. Rowe D.J., T.E. Rinderer, J.A. Stelzer, B.P. Oldroyd, and R.H. Crozier, 1997, **Seven polymorphic microsatellite loci in honeybees (*Apis mellifera*)**, Insectes Sociaux, No. 44, 85 – 93
102. de la Rúa Pilar, J. Galián, J. Serrano, R.F.A. Moritz, 2003, **Genetic structure of Balearic honeybee populations based on microsatellite polymorphism**, Genet. Sel. Evol., 35, 339 - 350
103. Rees J.A., M. Moniatte, P. Bulet 1997, **Novel antibacterial peptides isolated from an European bumblebee, *Bombus pascuorum* (Hymenoptera, Apoidea)**, Insect Biochemistry Molecular Biology, vol. 27, no. 5, 413 – 422
104. Rinderer T.E., G. T. Delatte, L.I. de Guzman, J.L. Williams, J.A. Stelzer, V.N. Kuznetsov, 1999, **Evaluation of the Varroa – resistance of honey bees imported from Far-Eastern Russia**, American Bee Journal, No. 139, 287 - 290
105. Sambrook J., E.F. Fritsch & T. Maniatis, 1989, **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd edn. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press
106. Sammataro Diana, Pia Untalan, F. Guerrero and Jenifer Finley, 2005, **Distance of Varroa mites (Acari: Varroidae) to acaricides and the presence of esterase**, International Journal of Acarology, Vol. 31, No. 1, 67 – 74
107. Savelkoul P.M.H., A.H.J. Marts, J. de Haas, L. Dijkshoorn, B. Duim, M. Otsen, J.L.W. Rademaker, L. Schouls, and J.A. Lenstra, 1999, **Amplified-**

- Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of Art – minireview**, Journal of Clinical Microbiology, Vol. 37, No. 10, 3083 – 3091
108. Schlipalius D.I., C.M. Emore, S.B.C Chandra, O. Rueppell, R.E. Page, G.J. Hunt, 2004, **Integrating a high-density genetic linkage map of *Apis mellifera* with the honeybee genome project**, Plant & Animal Genomes XII Conference San Diego, <http://www.intl-pag.org/12/abstracts/>
 109. Schuler Mary A., 1996, **The Role of Cytochrome P450 Monooxygenases in Plant - Insect Interactions**, Plant Physiology, No.112, 1411-1419
 110. Segura J.A.L., 2000, **Highly polymorphic DNA markers in an Africanized honey bee population in Costa Rica**, Genetics and Molecular Biology, vol. 23, no. 20 – 28
 111. Sibbesen O., Birgit Koch, Barbara Ann Halkier and Birger Lindberg Møller, 1995, **Cytochrome P-450 Is a Multifunctional Heme-Thiolate Enzyme Catalyzing the Conversion of L-Tyrosine to *p*-Hydroxyphenylacetaldehyde Oxime in the Biosynthesis of the Cyanogenic Glucoside Dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench**, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 270, No. 8, 3506 - 3511
 112. Sunnucks P., P.E. England, A.C. Taylor & D.F. Hales, 1996, **Microsatellite and chromosome evolution of parthenogenetic *Sitobion* aphids in Australia**, Genetics 144, 747–756
 113. Soderlund D.M., and D.C. Knipple, 2003, **The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides**, Insect Biochemistry and Molecular Biology, No. 33, 563 – 577
 114. Soderlund D.M., 2008, **Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels**, Pest Management Science, Vol. 64, No. 6, 610 - 616
 115. Solignac M., D. Vautrin, E. Baudry, F. Mouguel, A. Loiseau and J-M Cornuet, 2004, **A Microsatellite-Based Linkage Map of the Honeybee, *Apis mellifera* L.**, Genetics 167, 253 - 262
 116. Spinella D.G., A.K. Bernardino, A.C. Redding, P.W.Z. Kouty, E.K. Pratt, K.K. Myers, G. Chappell, S. Gerken and S.J. McConnell, 1999, **Tandem arrayed ligation of expressed sequence tags (TALEAS): a new method for generating global gene expression profiles**, Nucleic Acid Research, vol.27, no. 18, e22, i-viii
 117. Spivak Marla, 1998, **Honey bee hygienic behavior as a defense against *Varroa jacobsoni* mites**, Resistant Pest Management, vol. 9, no. 2, 22 – 24
 118. Spivak Marla, M. Gilliam, 1998, **Hygienic behavior and its application for control of brood diseases and varroa**. Bee World 79: 124 - 134

- 119.Spivak Marla, and Reuter, G.S., 2001, ***Varroa destructor* infestation in untreated honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) colonies selected for hygienic behavior**, Journal of Economic Entomology, vol. 94, no. 2, 326 – 331
- 120.Suazo A., H.G. Hall, 2004, **Modification of AFLP protocol applied to honey bee (*Apis mellifera* L.) DNA**, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1
- 121.Subramanian S., Madgula, V. M., George, R. Mishra, R.K., Pandit, M.W., Kumar, C. S., and Singh, L., 2002, **MRD: a microsatellite repeats database for prokaryotic and eukaryotic genomes**, Genome Biology, no.3, [http:// genomebiology.com /2002/3/12/preprint/0011](http://genomebiology.com/2002/3/12/preprint/0011)
- 122.Tan J., Z. Liu, R. Wang, Z. Y. Huang, A. C. Chen, M.Gurevitz, and K. Dong, 2005, **Identification of Amino Acid Residues in the Insect Sodium Channel Critical for Pyrethroid Binding**, Molecular Pharmacology, Vol. 67, No. 2, 513 – 522
- 123.Tarès S., J-M. Cornuet, and P. Abad, 1993, **Characterization of an unusually conserved *AluI* high reiterated DNA sequence family from the honeybee, *Apis mellifera***, Genetics, no. 134, 1195 - 1204
- 124.Tarpy D.R., 2003, **Genetic diversity within honeybee a colony prevents severe infections and promotes colony growth**, Proc.R.Soc. London B, 270, 99 – 103
- 125.Tew E.J., D. Sammataro, D. Heilman, 2003, **Controlling Tracheal Mites in the bee hive**, <http://www.ohioline.osu.edu>
- 126.Tingey S.V., J.A. Rafalski, and J.G.K. Williams, 1993, **Genetic Analysis with RAPD markers**, Application of RAPD Technology to Plant Breeding, 3 - 8
- 127.Trouiller J., 1996, **Résistance de varroa au fluvalinate: les faits**, Santé de l'Abeille 153, 110 - 117
- 128.Trouiller J., and J.P. Faucon, 1997, **Résistance de varroa au fluvalinate — Résultats 1997 des analyses de laboratoire**, Santé de l'Abeille 1 - 2, 35 - 36
- 129.Trouiller J., 1998, **Monitoring *Varroa jacobsoni* resistance to pyrethroids in Western Europe**, Apidologie, No. 29, 537 – 546
- 130.Valles S.M., O.P. Perera, and C.A. Strong, 2003, **Relationship Between the para-Homologous Sodium Channel Point Mutation (g → c at Nucleotide 2979) and Knockdown Resistance in the German Cockroach Using Multiplex Polymerase Chain Reaction to Discern Genotype**, Journal of Economic Entomology, Vol. 96, No.3, 885-891
- 131.Vlaic A., 1997, **Inginerie genetică, realizări, speranțe, neliniști**, Ed. Promedia – Plus
- 132.Vlak J.M. R.W. Goldbach, 2003, **Characterization of a picorna – like virus isolated from the mite *Varroa destructor* and its potential use as**

- a biological control agent against this mite**, Research project 2002 – 2004, Dutch Research Data Base, <http://www.niwi.knaw.nl>
133. Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de M. Lee, Mornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Yabeau, 1995, **AFLP: a new technique for DNA fingerprinting**, Nucleic Acids Research, vol. 23, no. 21, 4407 – 4414
 134. **Walker K.L., Kathryn Sparks, 1997**, Studies on the Apoidae (bees) biodiversity and plant associations in Central Australia: the forgotten pollinators, <http://catalogue.nla.gov.au/Record/1895711?>
 135. Wang R., Z. Liu, K. Dong, P.J. Elzen, J. Pettis, Z.Y. Huang, 2002, **Association of novel mutations in sodium channel gene with fluvalinate resistance in the mite, Varroa destructor**, Journal of Apicultural Research, Vol. 40, No. 1-2, 17 -25
 136. Wang R., Z.Y. Huang, K. Dong, 2003, **Molecular characterization of an arachnid sodium channel gene from the varoa mite (Varroa destructor)**, Insect Biochemistry and Molecular Biology, No. 33, 733 – 739
 137. Wang R., K. Dong, and Z. Y. Huang, 2003, **Cloning and Sequencing of a Putative Sodium Channel Gene from a Parasitic Mite of the Honey Bee, Varroa jacobsoni**, <http://cyberbee.msu.edu/lab/ray/poster.html>
 138. Weeden N.F., G.N. Timmerman, M. Hemmat, B.E. Kneen M.A. Lodhi, 1993, **Inheritance and Reliability of RAPD Markers**, Application of RAPD Technology to Plant Breeding, 12 - 17
 139. Welsh J., and M. McClelland, 1990, **Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers**. Nucleic Acids Research no. 19, 303 – 306
 140. Wilkes K., B. Oldroyd, 2002, **Breeding hygienic disease resistant bees**, Report for the Rural Industries Research and Development Corporation Australia, Project no. US – 39A
 141. Wilkinson D., and G.C. Smith, 2002, **Modeling the Efficiency of Sampling and Trapping Varroa destructor in the Drone Brood of Honey bees (Apis mellifera)**, American Bee Journal, 209 - 212
 142. Williams J.G.K., A.P. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey, 1990, **DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers**, Nucleic Acids Research no. 18, 6531 – 6535
 143. Yang-Jiang Lu, M. J. Adang, D. J. Isenhour, G. D. Kochert, 1992, **RFLP analysis of genetic variation in North American populations of the fall armyworm moth Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae)**, Molecular Ecology, Volume 1, Issue 4, 199 – 208
 144. ***, 2000, Mid-Atlantic Apicultural Research & Extension Consortium (MAAREC), <http://MAAREC.cas.psu.edu>
 145. ***, 2002, **How to study questions in ecology and evolution**, http://www.lifescience-zurich.ch/focus1/material_method-en.asp

- 146.***, 2003, **Varroa mite**, <http://www.beekeeping.com/vita/bdiseases/varroam.htm>
- 147.***, 2003, **Varroa mites**, <http://www.main.org/cahbs/varroam.htm>
- 148.<http://members.aol.com/queenb95/genetics.html>
- 149.<http://nilgs.naro.affrc.go.jp>
- 150.www.liis.lv/kukaini/lkuk2.htm
- 151.www.uni-bayreuth.de/departments/toek1/fortner/
- 152.www.tuat.ac.jp/~ethology/Sasaki/queen-L.jpeg
- 153.www.mossopshoney.co.nz/From+hive+to+honeypot/
- 154.www.hyperdictionary.com
- 155. www.sci-ed-ga.org