



UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ CLUJ-NAPOCA

FACULTATEA DE ZOOTEHNIE ȘI BIOTEHNOLOGII
Catedra III – Discipline tehnologice
Disciplina: Tehnologia produselor apicole și sericicole

Titlul proiectului: CARACTERIZAREA POTENȚIALULUI GENETIC AL ALBINEI APIS MELLIFERA CARPATICA UTILIZÂND TEHNICI MOLECULARE ÎN VEDEREA CONSERVĂRII BIODIVERSITĂȚII ACESTEIA

Director proiect: Prof. dr. ing. Liviu Al. Mărghițaș
Contract nr. 390/2007; cod ID_852

Raportare intermediară în derularea proiectului



I. Stadiul realizării indicatorilor de performanță

Desfășurarea prezentului proiect a dat posibilitatea unui membru în echipa de implementare a proiectului de a finaliza și susține în anul 2008 teza de doctorat intitulată „*Variabilitatea genetică a ecotipurilor de albine din Transilvania*”, sub coordonarea științifică a Directorului de proiect, Prof. Dr. Ing. Liviu Al. Mărghitaș.

Principalii indicatori de performanță sunt redați în tabelul următor:

	2007		2008		2009		2010	
	prevăzut	realizat	prevăzut	realizat	prevăzut	realizat	prevăzut	realizat
Număr de articole acceptate spre publicare în reviste indexate ISI	-	-	1	0	1	-	1	-
Număr de articole acceptate spre publicare în reviste indexate în baze de date internaționale	-	-	-	-	-	-	-	-
Număr cereri de brevete naționale depuse	-	-	-	-	-	-	-	-
Număr cereri de brevete internaționale depuse	-	-	-	-	-	-	-	-

Dintre **lucrările științifice** publicate de colectivul implicat în desfășurarea proiectului amintim:

1.Orsolya Teleky, Cristina Bojan, Adela Moise, Cristian Coroian, Daniel Dezmirean, Mărghitaș L. Al., 2007, **Ecotypes differentiation within honeybee (*Apis mellifera carpatica*) from Transylvania**, USAMV-CN, 64/2007, ISSN 1454, 2382, p. 195-200.

2.Orsolya Teleky, Marghitas L. Al., Dezmirean D., 2007, **Modern techniques used in the study of the genetic diversity and of phylogenetic relationships at honeybees populations**, 1st International Conference on Apiculture from Science to Agribusiness and Apitherapy, p. 189- 192.

În prezent, se află în pregătire 2 articole, care vor fi publicate la Simpozionul Internațional al USAMV Cluj-Napoca din octombrie 2009, intitulate:

-*The biodiversity testing of honeybee's populations bred in Transylvania;*

-*The study of AND markers with applicability in genetics analyses at *Apis mellifera carpatica*.*

II. Principalele rezultate noi, originale din punct de vedere științific

Studierea heterogenității populațiilor studiate și a gradului de hibridare

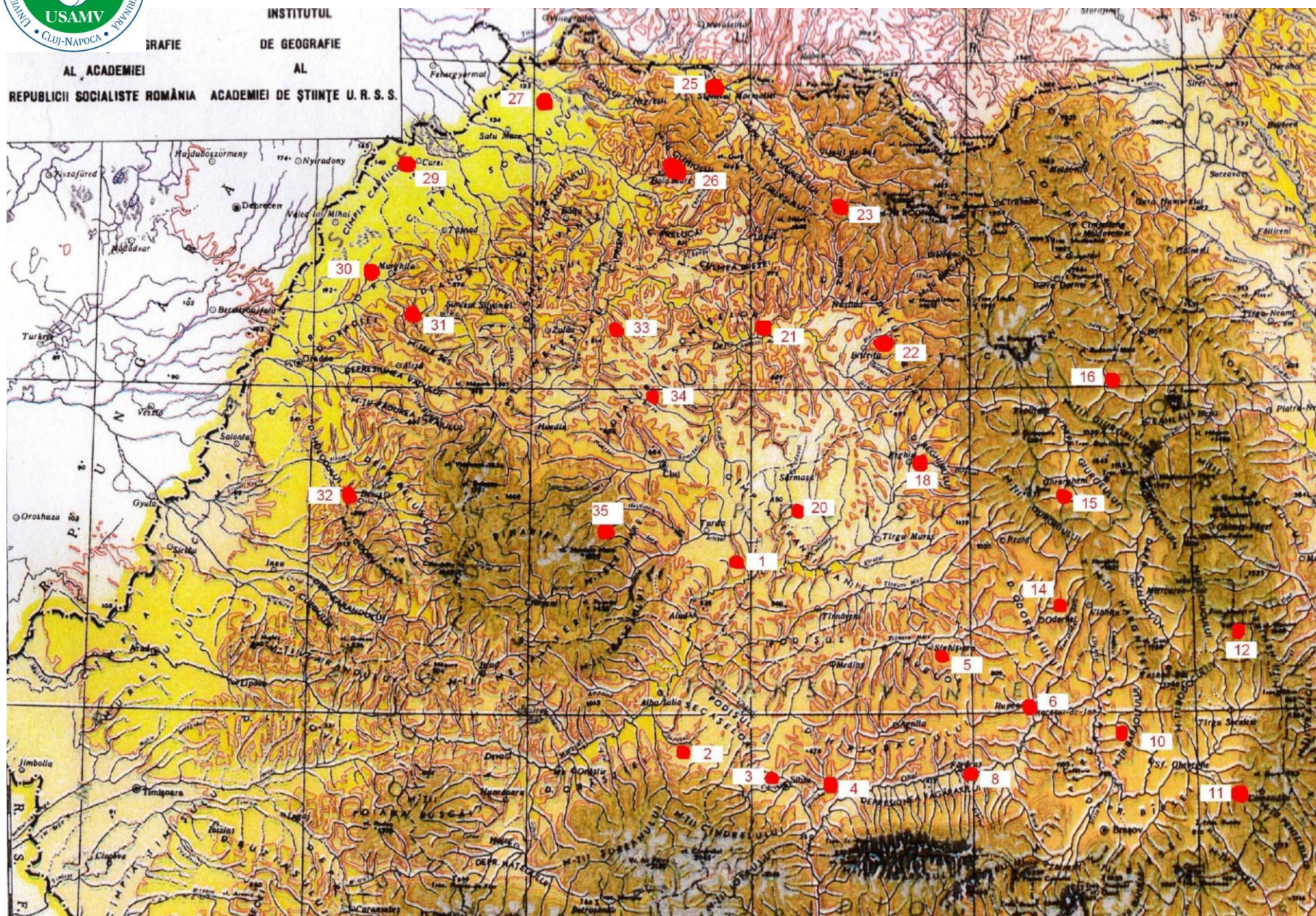
1. Analiza gradului de heterogenitate în populațiile studiate

S-au realizat măsurători morfometrice la albine provenite din 35 de locații din Transilvania, care au fost apoi corelate cu [analizele genetice efectuate asupra ADN mitocondrial](#). Heterogenitatea sub aspectul gradului de înrudire a populațiilor studiate a fost prelucrată cu ajutorul analizei comparative a mărimii fragmentului amplificat analizat.

S-au folosit 2 perechi de primeri ADN mt, E2 și H2 (Garner *et al.*, 1993) care amplifică o porțiune intergenică cuprinsă între gena tRNA^{leu} și a doua subunitate a genei citocrom oxidaza (COII), care prezintă un bogat caracter polimorfic (Cornuet *et al.*, 1991) și primerii N1 și N2, care amplifică un fragment mai lung (Moricz, 2002).

Nr. probă	Localitatea	Județul	Inițiale
1	Unirea	Alba	AB
2	Cut	Alba	AB
3	Cristian (hibridul Buckfast)	Sibiu	SB
4	Bradu (pastoral)	Sibiu	SB
5	Vânători	Mureș	MS
6	Rupea	Brașov	BV
8	Făgăraș	Brașov	BV
10	Arcuș	Covasna	CV
11	Zagoni	Covasna	CV
12	Poian	Covasna	CV
14	Zetea	Harghita	HR
15	Suseni	Harghita	HR
16	Borsec	Harghita	HR
18	Petelea	Mureș	MS
20	Cuci	Mureș	MS
21	Uriu	Bistrița-Năsăud	BN
22	Livezile	Bistrița-Năsăud	BN
23	Fiad	Bistrița-Năsăud	BN
25	Tisa (pastoral)	Maramureș	MM
26	Baia Sprie	Maramureș	MM
27	Medieșu Aurit	Satu Mare	SM
29	Petri	Satu Mare	SM
30	Săcueni	Bihor	BH
31	Camăr	Sălaj	SJ
32	Finiș	Bihor	BH
33	Zimbor	Sălaj	SJ
34	Bădești	Cluj	CJ
35	Băișoara	Cluj	CJ

Harta distributiei populatiilor analizate





1. Analiza gradului de heterogenitate în populațiile studiate

Din fiecare stupină au fost folosite 10 albine din care s-a realizat extracția ADN genomic (din mușchii toracali), folosind 2 protocoale de lucru:

- a.** 150 μ l de Chelex + 6 μ l Proteinaza K [probele se pun în termociclu cu PCR (Eppendorf-Mastercycler personal), după programul: 55°C – 1 oră, 99°C – 15 min., 37°C – 1 min., 99°C – 15 min., apoi se păstrează la 4°C până se dau în lucru];
- b.** Extracția cu Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Au fost citite cantitatea și puritatea ADN. Valorile au fost cuprinse între 13-139 ng/ μ l pentru cantitate, iar puritatea (260/280) între 1,06 și 1,97. Cu protocolul a. se obține o cantitate mai mare de ADN și o puritate mai scăzută, iar cu protocolul b. se obține o cantitate mai mică de ADN și o puritate crescută.

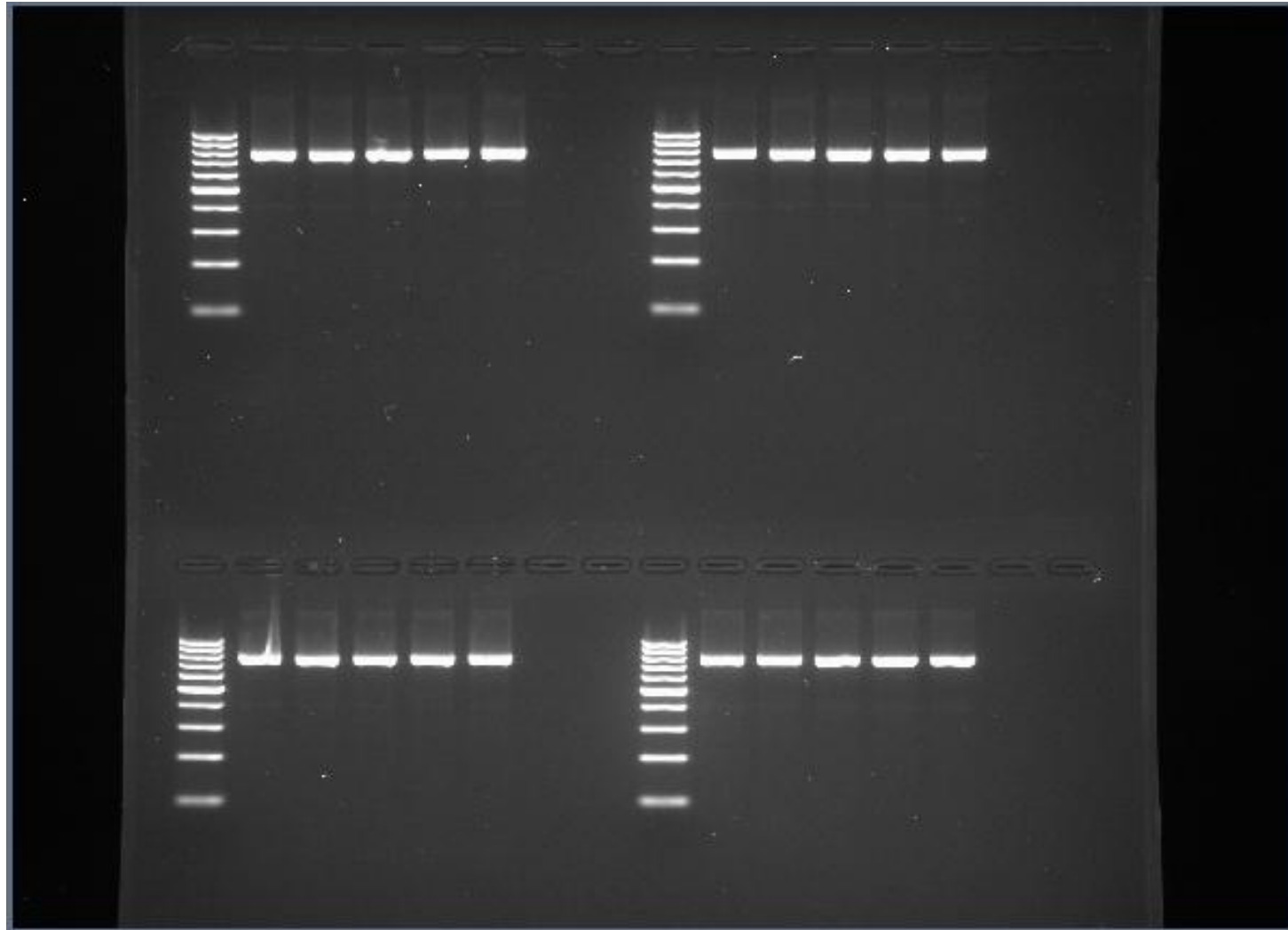
Amplificarea s-a făcut folosind 2 protocoale de lucru, pentru un volum de 10 μ l/reacție (**A**), respectiv 25 μ l (**B**). S-a folosit PCR Master Mix (2x) (Fermentas), 10 pmol/reacție primerii E2 și H2 și 50 ng ADN/reacție. Aceleași cantități au fost respectate și pentru volumul de 25 μ l/reacție.



2. Identificarea afluxului de gene străine prin cuantificarea analizelor ADN mitocondrial cu markeri specifici

REZULTATE ȘI DISCUȚII

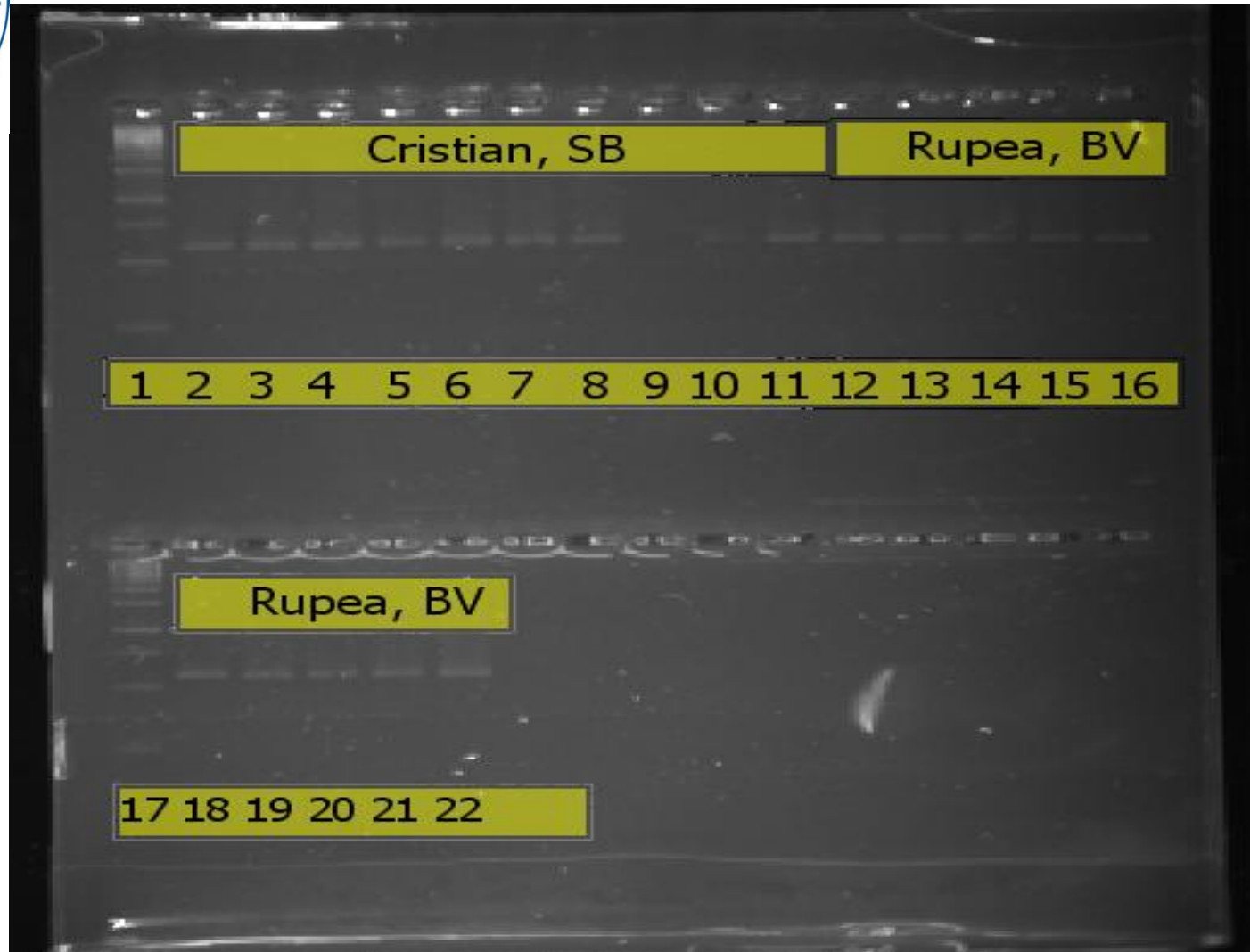
Migrarea electroforetică a probelor s-a realizat în gel de agaroză 2%, pe câte 5 albine din fiecare stupină. Markerul de lungime a fragmentelor este de 100 pb.



Imaginea fragmentelor amplificate cu primerii N1 și N2



REZULTATE ȘI DISCUȚII



Imaginea fragmentelor amplificate cu primerii E2 și H2



REZULTATE ȘI DISCUȚII

După migrarea produsilor PCR, obținuți în urma amplificării cu primeri specifici E2 și H2, s-a realizat capturarea imaginii gelului de agaroză cu ajutorul sistemului UVP. În funcție de markerul de talie moleculară utilizat (Ladder, 100 bp, Promega, USA), s-a estimat mărimea fragmentelor amplificate, corespunzătoare fiecărei albine (10) și respectiv fiecărei probe (Cristian SB, Petri SM, Uriu BN, Petelea MS, Finiş BH, Rupea BV, Bădești CJ, Fiad BN, Arcuș CV, Băișoara CJ, Suseni HR).

Înainte de analizarea acestor probe cu primeri specifici de ADN mitocondrial, acestea au fost analizate cu primeri specifici pentru microsateliți. Rezultatele obținute cu analiza microsateliților au arătat procentele de apariție a diferitelor ecotipuri în funcție de genotipul estimat și procentul de hibridare cu hibridul importat Buckfast. Astfel probele Petri SM, Uriu BN, Finiş BH, Bădești CJ, Fiad BN, Arcuș CV, Băișoara CJ au fost detectate 100% aparținând ecotipului Transilvănean. În schimb proba provenită din Petelea MS s-a detectat ca fiind amestecat cu hibridul Buckfast în procent de 10%, Rupea BV în procent de 20%, Suseni HR în procent de 30%, iar Cristian SB în procent de 100% Buckfast.



REZULTATE ȘI DISCUȚII

Potrivit lui Ruttner și colaboratorii, (1978) cele 24 de subspecii de *Apis mellifera* au fost grupate în patru linii evolutive, bazându-se pe măsurători morfometrice: albinele melifere europene (M), africane (A), și nord-mediteraniene (C). Mai târziu, când s-a dezvoltat ingineria genetică, cu ajutorul **ADNmt** (Cornuet și colab., 1991) și a **ADN genomic**, aceste grupe s-au clasificat în 5 linii distincte:

- ◇ linia A (se găsește în Africa, exceptând partea nord-vestică);
- ◇ linia M (partea vestică și nordică a Europei);
- ◇ linia C (sudul Europei cu excepția Spaniei și Franței);
- ◇ linia O (Asia estică și nord-estul Africii);
- ◇ linia Y (s-a identificat până în momentul de față numai în Somalia) (Franc și colaboratorii, 2000, 2001).

În gelul de migrare a produșilor de PCR din figurile 1-4 se poate urmări rezultatul amplificării cu primerii E2 și H2 utilizați pentru analizarea ADN-ului mitocondrial de la albine. În cazul probelor noastre se poate vedea că probele provenite din localitățile următoare: Petri SM, Uriu BN, Petelea MS, Finiș BH, Bădești CJ, Fiad BN, Arcuș CV, Băișoara CJ, Suseni HR au alelă homozigotă la mărimea 590 perechi de baze, în schimb probele din localitatea Cristian SB și Rupea BV au mărimea de 240 perechi de baze.



REZULTATE ȘI DISCUȚII

Se poate face o clasificare a materialului biologic din stupinele studiate în funcție de lungimea fragmentului amplificat cu primerii E2 și H2. Astfel, lungimea fragmentului de 590 pb ne permite să încadrăm acele albine în specia *Apis mellifera carnica*, **linia evolutivă M**, ecotipul *carpatica*, iar fragmentul de 240 pb indică albine aparținând *Apis mellifera ligustica*, **linia evolutivă C**.



REZULTATE ȘI DISCUȚII

S-au realizat amplificări și cu primerii N1 și N2 care amplifică o altă regiune din ADN-ul mitocondrial. Imaginile arată o mai mare omogenitate a probelor decât în cazul primerilor E2 și H2, și aceeași lungime a fragmentului amplificat, de aproximativ 780 pb.

Pentru a face o încadrare a celor 35 de populații într-o anumită subspecie și linie evolutivă, este necesară secvențierea fragmentului analizat. Această operațiune este în curs de desfășurare momentan, și va fi raportată odată cu raportul de etapă prevăzut pentru etapa III.

III. Implicarea tinerilor cercetători și modul în care se reflectă în cheltuielile de personal

Nume	Funcție în cadrul proiectului	Activități desfășurate în prezent
Prof. Dr. Ing. Liviu Al. Mărghițaș	Director de proiect	- gestionarea resurselor umane, organizarea muncii și trasarea sarcinilor pentru membrii echipei implicate în proiect; - planificarea realistă a lucrărilor de cercetare și susținerea și verificarea aplicării lor în practică; - elaborarea și verificarea rapoartelor de activitate; - asigurarea unei bune comunicări între membrii echipei.
Conf. Dr. Ing. Daniel Dezmirean	Cercetător cu experiență	- coordonarea activitatilor de promovare a obiectivelor proiectului; - organizare de workshop; - determinarea parametrilor biometrici ai populațiilor de albine <i>Apis mellifera carpatica</i> și la analiza moleculară a acestora; - participă la toate manifestările științifice planificate.
Dr. Ing. Adela Moise	Cercetător cu experiență	- participă la activitățile de recoltare a materialului biologic; - determinarea parametrilor biometrici ai populațiilor de albine <i>Apis mellifera carpatica</i> și la analiza moleculară a acestora; - participă la toate manifestările științifice planificate.
Dr. Ing. Cristian Coroian	Cercetător cu experiență	- participă la activitățile de recoltare a materialului biologic; - determinarea parametrilor biometrici ai populațiilor de albine <i>Apis mellifera carpatica</i> și la analiza moleculară a acestora. - participă la toate manifestările științifice planificate.
Drd. Ing. Orsolya Teleky	Cercetător în formare	Activitatea de doctorand încheiată cu susținerea tezei de doctorat „<i>Variabilitatea genetică a ecotipurilor de albine din Transilvania</i>”; Concediu de maternitate (cf. Notei justificative nr. 3749/06.04.2009)
Drd. Ing. Cristina Bojan	Cercetător în formare	Activitatea de doctorand încheiată cu susținerea tezei de doctorat; Concediu de maternitate (cf. Notei justificative nr. 3749/06.04.2009)

Centralizarea cheltuielilor de personal

	Etapa 1 (1 oct. -15 dec. 2007)	Etapa 2 (1 dec. 2007-31 oct. 2008)	Etapa 3 (1 nov. 2008 – 15 sept. 2009)	Etapa 4 (16 sept. 2009 –15 sept. 2010)
Cercetători cu experiență (inclusiv directorul de proiect)	24 772	145 047	130778	-
Cercetători în formare	3 600 (2 pers/2.5 luni)	21 603 (1 pers/11 luni)	2 686 (1 pers/2 luni)	-
TOTAL	28 372	166 650	133464	266 546

IV.Dificultăți întâlnite în derularea proiectului

Dificultățile întâlnite în desfășurarea proiectului sunt reprezentate de **reducerea sumelor contractate**, așa cum rezultă din următorul tabel:

Tipul de cheltuieli	Contractat inițial pt. anul 2009	Valori după modificarea bugetului/2009
Cheltuieli de personal	233310	133464
Regie	64633	27084
Mobiliăți	8667	0
Logistică	81690	20011
TOTAL	388300	180559



Vă mulțumim pentru atenție!

