
TEZĂ DE DOCTORAT

Potențialul de rezistență genetică la *Varroa destructor* pentru populațiile locale de *Apis mellifera L.*

(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

Doctorand **Giurgiu Alexandru-Ioan**

Conducător de doctorat **Prof. dr. Dezmirean S. Daniel**



INTRODUCERE

Varroa destructor este un ectoparazit care reprezintă o amenințare majoră pentru coloniile de *Apis mellifera* (Rosenkranz et al., 2010). Acest parazit a reușit să treacă de la gazda sa originală, *Apis cerana* pe *A. mellifera*. Odată capabil să infesteze o nouă gazdă care nu avea disponibilă o formă de rezistență, acarienule a reușit să se răspândească prin populațiile de *Apis mellifera* din întreaga lume (Rosenkranz et al., 2010).

În ziua de azi apicultorii trebuie să aplice tratamente intensive cu substanțe chimice care au efect acaricid doar pentru a ține sub control populația de acarieni. Cu toate acestea, până în prezent, nici o substanță sau plan de tratament nu poate eradica complet *Varroa* dintr-o colonie. Mai mult, acarianul a reușit să dezvolte rezistență la unii dintre compușii aplicați, lăsând apicultorilor un număr limitat de soluții; ca urmare, sunt necesare modalități alternative de combatere a parazitului (Dietemann et al., 2012).

Capitolul I

1. 1. Biologia speciei

1.1.1. *Apis mellifera*

Prezintă o scurtă descriere a *A. mellifera*, aria sa naturală și zonele în care au fost introduse. Este prezentat pe scurt sistemul de caste și rolul fiecărei caste în stup.

1.1.2. *Apis cerana*

Scurtă descriere a zonei naturale pentru *Apis cerana*, zonele în care a fost introdusă și o scurtă descriere a speciei în comparație cu *A. mellifera*.

1.1.3. *Varroa destructor*

Descrierea mărimii, culorii și formei acarianului *V. destructor* atât în cazul femelei, precum și o prezentare a formei, dimensiunii și a lipsei pigmentației la mascul.

1.1.3.1. Apariția în România bazată pe răspândirea globală

Conform literaturii disponibile după 1964 *Varroa* a fost observat în diferite zone ale U.R.S.S., iar în jurul anului 1967 a fost observată în Bulgaria (Ogradă, 1977; Sabanov & Nedialkov, 1972). Cu toate acestea, primele mențiuni oficiale în literatura științifică pentru *Varroa* în România au fost făcute în 1975 (Denmark et al. 1991).

1.1.3.2. Biologia la *Varroa destructor*

Describe *Varroa destructor* și cum a fost confundat mult timp cu *V. jacobsoni* din cauza fenomenului de speciație criptică întâlnit frecvent la speciile Acari. Acest fenomen face aproape imposibilă identificarea unei specii pe baza unei analize morfologice standard. Lucrarea publicată în 2000 care a folosit analiză moleculară ADN mitocondrial a demonstrat că *V. destructor* a fost agentul patogen capabil să schimbe gazde și confirmă existența a mai multor specii de *varroa* (Anderson și Trueman, 2000).

1.1.4. Ciclu de viață

Ciclu de viață al parazitului este lipsit de un stadiu de viață liber și poate fi împărțit în două faze distincte. Prima fază este numită foretică în acest stadiu parazitul stă pe albinele adulte se hrănește de pe acestea și le folosește pentru a se deplasa în interiorul coloniei. Tot în acest stadiu parazitul se folosește de albinele adulte sau trântori pentru a se deplasa între colonii (Rosenkranz et al., 2010; Piou et al. 2016).

Faza reproductivă este cel de-al doilea stadiu de viață al parazitului și este sincronizat cu gazda parazitului. Femela de *Varroa* alege o celulă în care se află o larvă de albină în al cincilea stadiu larvar pe care să o infesteze. Aceasta celulă urmează să fie căpăcită în decurs de câteva ore. Odată ce a fost sigilată celula, femela de *Varroa* efectuează prima hrănire de pe larvă esențială pentru activarea ciclului reproductiv (Donzé and Guerin, 1994; Garrido et al., 2000).

1.1.4.1. O înțelegere mai buna a ciclului reproductiv pe baza experimentelor cu infestare artificială

Describe dependența totală a acestui acarian față de gazdă, intervalul scurt de timp în care acarienul trebuie să efectueze prima hrănire de pe larvă pentru a activa faza de reproducere și un experiment cu infestare artificială pe larve și pupe în diferite stadii de dezvoltare în care s-a demonstrat că femela *Varroa* își reglează ciclul reproductiv în funcție de gazda sa. (Garrido and Rosenkranz, 2003)

1.1.4.2. Dezvoltarea parazitului pe gazda originală *Apis cerana*

Describe comportamentul parazitului *V. destructor* pe gazda originală. Limitarea activării ciclului reproductiv pe puietul de trântor precum și mecanismele de apărare care permit *A. cerana* să combată parazitul.

Capitolul II

2.1 Dinamica populației de paraziți pe noua gazdă

Prezintă modul în care *V. destructor* infestază o colonie de *Apis mellifera*; arată cum faza de reproducere a acarienilor nu se limitează doar la puietul de trântor pe noua gazdă. Acest fenomen duce la o rată de creștere exponențială a populației de acarieni într-o colonie. de *A. mellifera*.

2.2. Efectele negative ale parazitării la nivel de individ

Describe efectele parazitării la nivel de individ pentru trântor și albină lucrătoare deopotrivă precum și modul în care infestarea are un impact semnificativ asupra individului (pierderea în greutate, suprimarea funcției imunitare, durata de viață redusă, scăderea performanței de zbor, etc).

2.3. Efecte negative la nivel de colonie

Aici luăm în considerare stupul din perspectiva superorganismului și sunt prezentate efectele negative asupra ratei de creștere și a performanței stupului.

2.3.1 Efect sinergic cu alți factori de stres biotici

Describe pe scurt modul în care efectele negative ale infestării cu *varroa* pot favoriza apariția și dezvoltarea altor agenți patogeni.

2.4. Răspunsul apicultorilor odată ce parazitul a început să producă pagube

De îndată ce acarienul a început să producă daune economice în producție sau pierderi de colonii, apicultorii au folosit varianta chimică aplicând diferite substanțe cu efect acaricid pentru a reduce încărcătura acarienilor la nivel de colonie.

Cu toate acestea, majoritatea acestor substanțe au un efect limitat asupra populației de acarieni. Paraziții care reușesc să supraviețuiască reușesc să dezvolte rezistență la tratamente în timp. Dezvoltarea rezistenței lasă apicultorii cu un număr limitat de opțiuni pentru tratament (Pettis, 2004; Kamler, 2016; Dietemann et al., 2012).

2.4.1. Răspunsul acarienilor la tratamente chimice

Prezintă pe scurt capacitatea acarienului de a dezvolta rezistență la acaricide și există dovezi clare că acarienul poate dezvolta rezistență la acaricidele dure printre care se numără cumaphos, fluvalinat și amitraz (Martin 2004; Sammataro et al., 2005).

2.5. Mecanismele de rezistență identificate

Describe principalele mecanisme de rezistență identificate la albine până în prezent și principiul fiecărui mecanism după cum urmează: 2.5.1. Înmormântarea puietului de trântor, 2.5.2. Comportamentul de îngrijire, 2.5.3. Comportamentul igienic și VSH (Varroa Sensitive Hygiene), 2.5.4. Reducerea succesului reproductiv al parazitului, 2.5.5. Comportamentul de recăpăcire (Descăpăcire/recăpăcire).

Capitolul III

3.1. Populații rezistente identificate

Prezintă cum, în ciuda virulenței ridicate a acarianului și a faptului că poate decima populațiile de *A. mellifera* (fără intervenția apicultorului), în timp au fost identificate populații de albine care pot să reziste fără tratamente. Unele dintre aceste populații au fost identificate ca rezistente sau au fost obținute folosind tehnici specifice sau planuri de ameliorare. În unele cazuri, populația identificată a fost studiată sau acestea sunt în curs de cercetare. Sunt însă și situații în care materialul biologic a fost diseminat sau chiar a ajuns la nivel comercial așa cum este cazul pentru albinele Varroa Sensitive Hygiene (VSH) sau populația de albine din Rusia (RHB) din regiunea Primorsky. Între populațiile descrise avem:

3.1.1. Populația de albine din Gotland.

3.1.2. Populația de albine din Avignon

3.1.3. Populația de albine VSH (Varroa Sensitive Hygiene)

3.1.4. Populația de albine din Rusia (RHB), Primorsky.

3.1.5. Rezistența albinelor africane la Varroa

3.1.6. Rezistența albinelor pe insula Fernando de Noronha

3.1.7. Populației de albine din Pădurea Arnot, Ithaca, NY, U.S.A.

3.1.8. Rezistența populației de albine din regiunea Østlandet din Norvegia

3.1.9. Populația de albine din Toulouse, Franța

3.2. Dezvoltarea schemelor de ameliorare

Prezintă dezvoltarea diferitelor programe de ameliorare și a strategiilor utilizate în timp pentru obținerea de colonii rezistente sau metode pentru diseminarea materialului biologic de la populațiile rezistente identificate.

3.3 Posibile direcții și oportunități de programe de ameliorare pentru ecotipurile locale de albine din România

Prezintă populațiile locale de albine *A.m. carpatica*, cum sunt adaptate la resursele noastre florale locale și cum au fost identificate și descrise.

Prezintă studiile recente care sugerează că *A. m. carpatica* este relativ bine conservată în România, iar cele două subpopulații distincte sunt încă prezente; cu toate acestea, există un risc mare de hibridizare din cauza afluxului de albine neindigene (Tofilski et al., 2021).

3.4. Oportunitatea de a studia interacțiunea gazdă-parazit la nivel genomic și transcriptomic

Sunt descrise eforturile de secvențiere pentru genomul de *A. mellifera*. Dezvoltarea rapidă a bazelor de date și disponibilitatea unui genom asamblat nou și mai complet *A. mellifera* asamblare de genom 3.1 (www.ncbi.nlm.nih.gov). Mai mult, recent a devenit disponibil genomul la *V. destructor* precum și a genomului *A. cerana* (gazda originală a parazitului).

Capitolul IV

4. Scopul și obiectivele cercetării

4.1. Motivația și importanța cercetării

Varroa destructor reprezintă o amenințare globală la adresa coloniilor de *Apis mellifera* datorită abilităților sale de a se răspândi în noi colonii și de a face din coloniile naive de *Apis mellifera* o țintă sigură. Ciclul de viață relativ scurt permite populației de acarieni să copleșească coloniile de *A. mellifera* în câțiva ani. În prezent, doar câteva zone de pe glob sunt libere de acest parazit.

4.2. Obiectivele cercetării

- a) Transcriptomica gazdei și a parazitului
- b) Crearea și implementarea unui program de ameliorare cu populațiile locale de *A. mellifera* care să ghideze noua populație să dezvolte rezistență la infestarea cu acarieni și să fie aplicat la nivelul stupinei

4.3. Descrierea procesului de cercetare

4.3.1. Descrierea pentru obiectivul a. Transcriptomica gazdei și a parazitului

Transcriptomica gazdei și parazitului prezintă designul experimental, pașii necesari pentru pregătirea stupinei, numărul de probe și intervalul de timp relevant pentru studiu. Mai mult decât atât, prezintă pașii pentru etapele de infestare artificială cu respectarea metodelor standardizate prezentate în literatura de specialitate.

4.3.2. Scopul și obiectivele propuse pentru planul de ameliorare

Implementarea unui program de ameliorare pentru a obține rezistență

naturală împotriva *V. destructor* la nivel de stupină prezintă argumente în favoarea planului de ameliorare ales pentru populația noastră locală precum și adaptarea planului de ameliorare în vederea optimizării acestuia pentru populația noastră locală și resursele disponibile.

Capitolul V

5. Material și metodă

5.1. Transcriptomica gazdei și a parazitului

Prezintă procesul de pregătire a stupinei pentru experimentul de infestare artificială. Descrie procedura utilizată pentru obținerea acarienilor varroa ași de inițiere a ciclului reproductiv. Procedura de prelevare a probelor pentru anumite ore și procesul de infestare artificială utilizat pentru acest experiment.

Acest capitol prezintă pașii necesari pentru procesarea probelor și reactivii utilizați pentru extracția ARN și optimizarea protocolului pentru *A. mellifera* (trântori albine lucrătoare) și acarienii. Prezintă, de asemenea, codificarea probei și evaluarea calității ARN și livrarea probelor pentru secvențiere.

5.2. Prezentare generală a protocolului pentru analiza ARN

Descrie echipamentul utilizat, hardware și software, acel pipeline ales pentru această analiză ARN și datele brute primite după pasul de secvențiere. Pentru a alinia transcrierile, a trebuit să folosim un genom de referință pentru fiecare organism studiat. Această secțiune prezintă detalii despre sursa utilizată pentru genomurile de referință, softul folosit pentru asamblarea genomului de referință și procesul de aliniere la genomul de referință cu exemple de linii de comandă utilizate. De asemenea, prezintă outputul rezultat și informații privind rezultatul pentru fiecare pas.

Secțiunea 5.2.2.4. prezintă o opțiune specifică a softului HISAT2, aceasta permite stocarea separată a citirilor nealiniat și modul în care aceste citiri nealiniat pot fi realiniat la un alt genom de referință. În cazul nostru, am folosit citiri nealiniat din probe de varroa și le-am realinat la genomul *A. mellifera* pentru a confirma că acarienui a reușit să se hrănească de pe larvă.

Analiza ulterioară prezintă toți pașii utilizați pentru a converti outputul probelor, asamblarea și cuantificarea genelor și transcripturile pentru probele de *A. mellifera* și *V. destructor*, precum și pentru genele realiniat. Mai mult, prezintă modul de examinare a transcripturilor în comparație cu adnotarea prezentată de genomul de referință și toți pașii efectuați pentru prelucrarea datelor.

5.3 Pregătirea și implementarea planului de ameliorare pentru populația noastră locală de albine

Prezintă modul în care a fost obținut materialul biologic, locația fiecărei stupine care a furnizat material biologic în conformitate cu cerințele protocolului, precum și locația în care s-a format noua populație.

O descriere completă a pașilor protocolului și a ratei de succes a stupului după fiecare pas al protocolului este prezentată pentru fiecare sezon. În total, în această teză, acoperim un total de trei sezoane.

6. Rezultate și discuții

6.1. Rezultate privind implementarea planului de ameliorare

6.1.1 Primul sezon

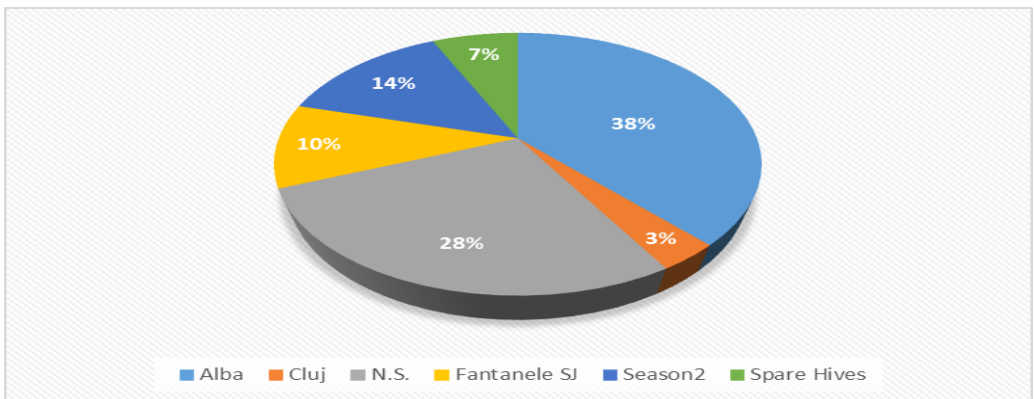
În primul sezon, din cei 25 de stupi selectați la începutul planului de ameliorare, doar 14 stupi au răspuns ramei indicator și au reușit să se dezvolte. Coloniile au fost selectate din 4 județe din Transilvania. Din județul Cluj au fost 4 surse, județul Sălaj 2 surse, Harghita 1 sursă, iar județul Alba 2 surse. Toate aceste colonii au răspuns cu succes la procedura de divizare și au avut o matcă viabilă, obținând 42 de stupi, la care s-au adăugat 2 roiuri naturale prinse lângă USAMV Cluj.

6.1.2. Sezonul al doilea

Sezonul al doilea se caracterizează prin pierderi semnificative de populație în primăvară. În ciuda pierderilor semnificative din primăvară, toți stupii rămași s-au dezvoltat bine și au răspuns la rama indicator. Stupii care au supraviețuit au fost împărțiți cu succes și au obținut o matcă viabilă, iar majoritatea s-au dezvoltat bine până la sfârșitul sezonului.

6.1.3. Al treilea sezon

La sfârșitul celui de-al treilea sezon avem un total de 29 de stupi, prezentați în următoarea configurație: 38% reprezintă stupi din populațiile selectate inițial din județul Alba, 3% reprezentată de populația inițială a județului Cluj, 10% din configurația reprezintă populația nou adăugată din Fântânele Rus, 28 % reprezintă coloniile codificate ca N.S. reprezintă cele 8 roiuri cu măci care s-au împerecheat în zona DBBB. Restul de 7% este reprezentat de cei doi stupi de rezervă.



6.2. Analiza axei principale de variație (Analiza componentelor principale) pentru transcriptomul de *Apis mellifera* și *Varroa destructor*

6.2.1 PCA pentru *V. destructor*

Analiza componentelor principale (PCA) pe cele 20 de probe de *V. destructor* a dus la o separare clară în funcție de intervalul de timp. Am identificat, de asemenea, două probe care au deviat la acarienii care au infestat larve de lucrătoare la intervalul de 8H, reprezentate de probele V8H4 și V8HW5. Îndepărtând cele două probe care nu se grupează și reluând analiza PCA, putem observa o separare mai clară între grupuri.

6.2.2 PCA pentru *A. mellifera*

Am efectuat analiza PCA pentru probele infestate și neinfestate de *A. mellifera*. Primele rezultate au sugerat deja că IW30H3 și IW30H5 nu se grupează aceeași condiție și interval de timp ca și celelalte probe.

6.3. Analiza expresiei diferențiale

Am efectuat o analiză a expresiei diferențiale (DE) pe grupuri prin compararea profilurilor de expresie a ARN ale acarienilor care au infestat trântorii la 8H față de 30H și acarienilor care au infestat larve de albine lucrătoare în aceleași intervale de timp folosind DESeq2 (Love et al., 2014).

6.3.1. Diferențe în analiza de expresie a genelor la *Varroa destructor*

Comparând acarienii care au infestat trântorii d la 8H versus 30H, am obținut 1966 de gene supraexprimate. Aplicând același proces la acarienii care au infestat lucrătoarele, am obținut 1344 de gene supraexprimate. Intersecția acestor două seturi de gene supraexprimate a dus la 823 de gene care sunt comune pentru ambele grupuri.

Pentru genele subexprimate, acarienii care au infestat trântorii 8h vs 30H, am obținut 1911 gene. Pentru acarienii care au infestat lucrătoare 8H vs 30H, am obținut 1434 de gene. Intersectând aceste liste, am obținut 899 de gene comune subexprimate.

În ambele comparații, observăm un număr mare de gene DE specifice gazdei. Interesant este că există mai multe gene DE pentru acarienii care au infestat trântorii în comparație cu acarienii care au infestat larvele de albină lucrătoare. Această diferență este în concordanță cu preferința cunoscută a acarienilor pentru puietul de trântor și cu adaptarea acestuia la gazda originală, *A. cerana*.

6.3.2. Diferențe în analiza de expresie a genelor la *A. mellifera*

Pentru *A. mellifera*, am decis să comparăm profilul de expresie între grupuri pentru fiecare castă. Am prefiltrat genele cu un număr scăzut de citiri pentru fiecare comparație de grup prin eliminarea tuturor genelor care nu au însumat 100 de citiri/rând în cele două grupuri comparate. Ca rezultat din numărul total de 12.241 de gene disponibile pentru *A. mellifera* pentru fiecare grup comparat, am folosit pentru analiză doar genele care au fost peste acest prag. Pentru această analiză, aplicăm praguri de modificare a valorii p și log fold similare ca în analiza de la *V. destructor*.

Comparația dintre trântori și trântori infestați la 30 de ore a dus la 382 de gene supraexprimate și 378 de gene subexprimate. Pentru lucrătoarele în aceeași condiție și interval de timp, a rezultat 677 de supraexprimate și 751 de gene subexprimate. Intersecția dintre genele supraexprimate pentru trântori și lucrătoare a dus la 46 de gene comune.

Pentru genele subexprimate la 30H, avem un total de 378 de gene pentru trântori și 751 pentru lucrătoare; dintre acestea, un total de 33 au fost comune între aceste două grupuri.

Comparația dintre trântori vs. trântori infestați la 8H a dus la 866 de gene supraexprimate, iar pentru lucrătoare vs. lucrătoare infestate la 8H a dus la 973 de gene. Intersecția dintre aceste două seturi de gene a dus la 265 de gene comune. Mai mult, un total de 601 gene au fost specifice pentru grupul de trântori, iar 708 au fost specifice pentru grupul de lucrătoare.

Comparația dintre trântori vs trântori infestați la 8H a dus la 977 de gene subexprimate, iar pentru lucrătoare vs lucrătoare infestate la 8H a dus la 1106 gene. Intersecția dintre aceste două seturi de gene a dus la 304 gene comune. Mai mult, un total de 673 de gene au fost specifice pentru grupul de trântori, iar 802 au fost specifice pentru grupul de lucrătoare.

Având în vedere că gazda acarienilor studiați este *A. mellifera*, *V. destructor* este capabil să activeze faza de reproducere atât pe puietul de albină lucrătoare, cât și pe puietul de trântor. Analizând în continuare aceste gene, ar trebui să găsim perspective importante cu privire la interacțiunea gazdă-parazit dintre *V. destructor* și *A. mellifera*.

6.4. Analiza funcțională (îmbogățire funcțională)

Am efectuat o analiză funcțională pentru toate grupurile de *A. mellifera* din tabelul 29 folosind G: Profiler (Raudvere et al., 2019). Pentru a preveni îmbogățirile false din cauza selecției inerente a genelor induse de configurația experimentală, am ajustat domeniul de aplicare al domeniului statistic și am folosit ca fundal de îmbogățire lista completă a genelor incluse în această analiză. Am folosit parametrii implicați (testare multiplă g: SCS și prag de semnificație de 0,05). Numărul de gene pentru fiecare comparație este disponibil în **tabelul următor**

Grupuri comparate	Nu. gene >100 de numărări	Nr. de gene supraexprimate	Nr. de gene subexprimate
trântor 0 vs 30 H	10757	2717	2154
trântor 0 vs 8 H	10351	1742	1582
trântor 8 vs 30 H	10884	1893	2088
lucrătoare 0 vs 30 H	10534	2677	2547
lucrătoare 0 vs 8 H	10201	1095	1165
lucrătoare 8 vs 30 H	10606	2224	2115
lucrătoare vs lucrătoare infestată 30 H	10471	677	751
trântor 0H vs trântor infestat 8 H	9986	1189	1314
trântor 0H vs trântor infestat 30 H	10774	2771	2180
lucrătoare 0H vs lucrătoare infestată 8 H	10074	1176	1254
lucrătoare 0H vs lucrătoare infestată 30 H	10208	1708	1956
lucrătoare 8H vs lucrătoare infestată 30 H	10316	1442	1090
trântor 8H vs trântor infestat 30 H	10925	2020	2220

6.5. Gene realinierte.

Am investigat transcripturile de *A. mellifera* detectate în probele de *V. destructor* și am raportat că au fost identificate 5908 gene și 6921 gene pentru grupurile de paraziti care au infestat trântori și lucrătoare (citiri efectuate pe probele de 8h și 30h; detectate cu valori mai mari de 100 contorizări (citiri/rând). Literatura disponibilă prezintă procesul de digestie extraorală și ingestia țesutului semisolid, în principal a corpului gras, de către *V. destructor* (Ramsey et al., 2019).

7. Concluzii si recomandari

7.1. Concluzii privind studiul transcriptomic pentru *Apis mellifera* și *Varroa destructor*

Analiza transcriptomului la *V. destructor* și *A. mellifera* și a datelor moleculare au potențialul de a permite înțelegerea atât a biologiei acarienilor, cât și a proceselor moleculare declanșate de infestare. Aceasta a dus la mai multe rezultate, unele deja bine documentate în literatură.

În primul rând, analiza componentelor principale ale variației (PCA) (Figura 54) a arătat că intervalul de timp este principalul factor care afectează transcriptomul cu o separare clară a trântorilor de la 30 de ore și lucrătoarelor în fața probelor de control și de la intervalul de 8H corespunzător. În plus, observăm o separare clară (PC2) pe castă.

În al doilea rând, bazându-ne pe modificările în compoziția citirilor non-self detectate în probele de *V. destructor*, rezultatele noastre sugerează că acarienii se hrănesc devreme (8h) iar odata cu trecerea timpului scade cantitatea de țesut consumată de la gazdă. Procentul de citiri de *A. mellifera* detectate la acarieni a scăzut între 8h și 30h. Nu am putut indica exact tipul de țesut ingerat de acarieni, dar bazându-ne pe profilele transcripționale suplimentare ale țesuturilor *A. mellifera*, studiile viitoare ar putea folosi experimente ARN-Seq pentru a estima principalele țesuturi ingerate de acarien.

În al treilea rând, observăm că lucrătoarele sunt mai afectate decât trântorii și speculăm că acest lucru ar putea fi provocat de masa corporală mai mică a albinei lucrătoare și, implicit, de corpul gras. Diferența de greutate și mărime dintre lucrătoare și trântori este bine documentată în literatură (în momentul căpăcirii este între 140 și 162 mg pentru larva de lucrătoare, în timp ce larva de trântor poate varia între 260 și 419 mg; Hrassing și Crailshein, 2005).

7.2. Concluzii privind implementarea planului de ameliorare

Stupii care vor supraviețui peste iarnă vor rămâne în planul de selecție; iar etapele din protocol se vor repeta în sezonul următor.

Acarianul singur exercită o presiune de selecție mare asupra stupilor, iar în cazul în care resursele de hrană din mediu sunt scăzute va fi necesară hrănirea artificială pentru a menține o presiune de selecție decentă asupra coloniilor.

Primul sezon al planului de ameliorare este crucial; se impune însă asigurarea unei logistici optime pentru sezoanele următoare, în special pentru operațiile necesare în sezonul activ.

Perioada de monitorizare până la etapa de împărțire a coloniilor este esențială.

Deși acest program de ameliorare este limitat la nivel de cercetare și are ca scop să ghideze populațiile locale în dezvoltarea mecanismelor de rezistență, acesta are potențial de dezvoltare în zona comercială.

În principiu, acest protocol ar trebui să scoată la suprafață în cadrul populației selectate gene care conferă rezistență față de parazit.

Adaptarea populațiilor locale la acest parazit pare a fi una dintre cele mai promițătoare modalități de control pe termen lung a bolilor și a paraziților. Un protocol bazat pe selecția naturală ar putea fi o soluție pe termen lung pentru sectorul apicol.

7.2.1 Menținerea noii populații sub supraveghere pentru a observa interacțiunea gazdă-parazit și posibil alte semne clinice ale altor agenți patogeni

Toți stupii au fost evaluați în timpul sezonului activ. O atenție deosebită a fost acordată oglinzii stupului, scândurii de zbor și în interiorul stupului pentru a observa posibile semnele clinice de boală.

Printre agenții patogeni identificați în populația noastră se numără *Nosema* spp., confirmată și cu diagnostic microscopic.

În primul sezon al planului de ameliorare, nu am observat alte semne clinice de boală. Totuși, în sezonul al doilea acestea au început să fie prezente.

Alte semne clinice au fost observate în sezoanele doi și trei, deoarece am observat albine și trântori cu DWV (virusul aripilor deformate) și puiet văros (*Ascospaera apis*)

În al treilea sezon al planului de reproducere nu am observat alte semne de boală clinică în stupii rămași.

7.3. Recomandări

În cazul populației noastre, cel mai semnificativ impact asupra stupilor noștri nu a fost doar *Varroa destructor*, ci prezența unui efect sinergic între *V. destructor* și infestare cu *Nosema* spp.. Cu toate că nu a fost făcută o analiză moleculară pentru confirmare, putem suspecta prezența sporilor de *N. ceranae* pe baza informațiilor disponibile în România și în restul Europei.

În ceea ce privește analiza transcriptomică, aceste date ar putea fi folosite pentru a analiza și compara cu date obținute de la populațiile de albine melifere care au dobândit rezistență la varroa. Ar putea fi, de asemenea, comparat cu probe prelevate pe aceleași intervale de timp de la gazda originală a parazitului *Apis cerana* sau chiar cu *A. m. scutellata*.

8. Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei

- Am reușit să adaptăm și să implementăm un protocol de ameliorare la nivel de stupină care poate fi aplicat de apicultorii profesioniști și amatori pentru a obține populații de albine rezistente la *V. destructor*.
- Faptul că am reușit să aplicăm protocolul de ameliorare fără ajutorul unei firme specializate pe acest domeniu ar trebui să demonstreze că acest protocol de ameliorare poate fi aplicat la nivel de stupină de către apicultori profesioniști sau amatori.
- Informațiile prezentate pentru cele trei sezoane sugerează că populația noastră locală de albine răspunde bine la diviziunile protocolului de ameliorare iar nucleele rezultate se dezvoltă bine.
- Seturile de date transcriptomice prezentate în această teză fac parte dintr-un set de date mai mare prelevat și procesat în perioada în care am fost membru în proiectul GRAL și sunt supuse cercetărilor în curs de desfășurare.
- Analiza ulterioară a datelor ar putea oferi perspective importante în ceea ce privește interacțiunea gazdă-parazit dintre *A. mellifera* și *V. destructor*.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. ANDERSON D.L. AND TRUEMAN J.W.H., 2000, *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species, *Experimental and Applied Acarology* 24: 165–189
2. DENMARK H.A., CROMROY H.L., AND CUTTS, 1991, *Varroa* mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans (Acari: Varroidae), *Entomology Circular No. 347, October 1991*
3. DIETEMANN V., PFLUGFELDER J., ANDERSON D., CHARRIÈRE J.D., CHEJANOVSKY N., DAINAT B., DE MIRANDA J., DELAPLANE K., DILLIER F.X., FUCH S., GALLMANN P., GAUTHIER L., IMDORF A., KOENIGNER N., AND KRALJ J., 2012, *Varroa destructor*: research avenues towards sustainable control, *Journal of Apicultural Research* 51(1): 125-132
4. DONZÉ G. AND GUERIN P.M., 1994, Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood, *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 34:305-319
5. GARRIDO C. AND ROSENKRANZ P., 2003, The reproductive program of female *Varroa destructor* mites is triggered by its host, *Apis mellifera*, *Experimental and Applied Acarology* 31: 269–273
6. GARRIDO C., ROSENKRANZ P., STÜRMER M., RÜBSAM R., AND BÜNING J., 2000, Toluidine blue staining as a rapid measure for initiation of oocyte growth and fertility in *Varroa jacobsoni* Oud., *Apidologie* 31: 559–566
7. HRASSNIGG N., CRAILSHEIM K. 2005, Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie, Springer Verlag*, 36 (2), pp.255-277. [hal-00892139](https://doi.org/10.1007/s10493-016-0023-8)
8. KAMLER M., NESVORNA M., STARA J., ERBAN T., AND HUBERT J., 2016, Comparison of tau-fluvalinate, acrinathrin, and amitraz effects on susceptible and resistant populations of *Varroa destructor* in a vial test., *Experimental and Applied Acarology*, 69:1, <https://doi.org/10.1007/s10493-016-0023-8>
9. LOVE M. I., HUBER W., ANDERS S., 2014, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*,15:550. <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
10. MARTIN S.J., 2004, Acaricide (pyrethroid) resistance in *Varroa destructor*, *Bee World*, 85:4, 67-69, DOI: 10.1080/0005772X.2004.11099632
11. OGRADĂ I., 1977, Bolile și dăunătorii albinelor, Asociația crescătorilor de albine din Republica socialistă România, ed. București pp 72-76 (*transaltion Ogradă I, 1977, Diseases and pests of bees, Association of beekeepers from the Socialist Republic of Romania, ed. București pp 72-76*)
12. PETTIS J.S., 2004.: A scientific note on *Varroa destructor* resistance to coumaphos in the United States., *Apidologie*, 35:91-92.
13. PIOUS V., TABART J., URRUTIA V., HEMPTINNE J.-L., AND VÉTILLARD A., 2016, Impact of the Phoretic Phase on Reproduction and Damage Caused by *Varroa destructor* (Anderson and Trueman) to Its Host, the European Honey Bee (*Apis mellifera* L.), *PLoS ONE* 11(4): e0153482. doi:10.1371/journal.pone.0153482
14. RAMSEY S., GULBRONSON C. J., MOWERY J., OCHOA R., VANENGELSDORP D., AND BAUCHAN G., A., 2018 Multi-Microscopy Approach to Discover the Feeding Site and Host Tissue Consumed by *Varroa destructor* on Host Honey Bees, *Microsc. Microanal.* 24 (Suppl 1) doi:10.1017/S1431927618006773
15. RAUDVERE U., KOLBERG L., KUZMIN I., ARAK T., ADLER P., PETERSON H., VILO J., 2019, g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update) *Nucleic Acids Research* 2019; doi:10.1093/nar/gkz369
16. ROSENKRANZ P., AUMEIER P., AND ZIEGELMANN B., 2010, Biology and control of *Varroa destructor*., *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 96-119
17. SABANOVV M., AND NEDISLAKOV S. 1972, Varoatozata opasno parazitno zablivanje po pcalite, Bulga (Varosis a dangerous disease for honeybees) *Centrul de informare si documentare pentru Agricultura si silvicultura VOL III, Nr. 6. (Paper that states invasion of varroa in Bulgaria in 1972) (Pecelarstvo, BULGA, an. 18, nr 1. Pp 15-17) Translation in Romanian by Maria Doicov made in Current Documentation VIII Apiculture, Information and Documentation Center for Agriculture and Forestry, Volume III, Nr. 6)*
18. SAMMATARO D., UNTALAN P., GUERRERO F. AND FINLEY J., 2005, 'The resistance of varroa mites (Acari: Varroidae) to acaricides and the presence of esterase', *International Journal of Acarology*, 31: 1, 67 — 74, DOI: 10.1080/01647950508684419
19. www.ncbi.nlm.nih.gov