

A hazai mézelő méh (*Apis mellifera* L.) populációk genetikai távolságbecslésének vizsgálata

Előzetes közlemény

Zakar Erika – Oláh János – Jávor András –
Kusza Szilvia

Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma,
Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar
Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet,
Debrecen
zakar@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

Magyarországon a krajnai fajta (*Apis mellifera carnica*) honos, jelenleg ez az egyetlen elismert és tenyésztendő mézelő méhfajta az országban. Azt feltételezzük, hogy az országban számos idegen fajta, illetve hibrid is megjelenik. A megkezdett mikroszatellit és mitokondriális DNS vizsgálatok alkalmasak lesznek a fajták könnyű és pontos azonosítására, valamint új lehetőségeket biztosítanak a házi méhek kutatása területén. A genomiális DNS izolálását öt-hét napos álca mintákból sikeresen elvégeztük. A vizsgálatot mikroszatellit markerekkel végeztük el. Kezdeti lépésként megállapítottuk a megfelelő feltapadási hőmérsékletet. A mitokondriális DNS vizsgálatban speciális szekvenálási módszer szükséges a felhasznált COI-COII mitokondriális régióban lévő primer alacsony feltapadási hőmérséklete miatt. E kutatási munka célja a populációk genetikai variációjának felmérése a módszerek felhasználásával.

Kulcsszavak: *Apis mellifera carnica*, mitokondriális DNS, mikroszatellit

SUMMARY

In Hungary, the *Apis mellifera carnica* is the native breed which is the only recognised and breedable honey bee in the country. It is assumed that there are a number of non-native and hybrid honey bee breeds in Hungary. The microsatellite and mitochondrial DNA surveys applied here will be utilised to easily and accurately identify the various sprads, and open up new ways in the research of honey bees. The isolation of the genomial DNS from 5 to 7 day old larvae samples was successfully carried out. In the future the plan is to carry out the measure with microsatellite markers. As an initial step the optimal annealing temperature was identified. In the mitochondrial DNA survey the COI-COII mytochonrial regional primer due to its low anelling temperature cannot be used with any normal sequencing methods. By using these method the aim of this research is the measurement of genetic variance.

Keywords: *Apis mellifera carnica*, mitochondrial DNA, microsatellite

BEVEZETÉS

A mitokondriális DNS az állatok evolúciós kutatásának népszerű molekuláris markere. Alkalmas törzsfeljedési vizsgálatok elvégzésére, továbbá a populáció szerkezetének, dinamikájának és molekuláris evolúciójának tanulmányozására is (Avisé, 1994).

A méhtenyésztés biológiai, genetikai, tartási és tenyésztésszervezési szempontból egyaránt különbözik

valamennyi tenyésztett haszonállat-fajtól. Magyarországon a krajnai fajta (*Apis mellifera carnica*) honos, jelenleg ez az egyetlen elismert és tenyésztendő mézelő méhfajta az országban.

Jellemző, hogy az egyes méhtenyésztő telepek majdnem önállóan, mintegy genetikai izoláltságban tenyésztenek. Morfológiai tulajdonságok mérésével meghatározható, hogy egy adott család egyedei megfelelnek-e a krajnai fajta paramétereinek, illetve nem mutatják-e az olasz méh, vagy más fajták/hibridek fenotípusos jegeit. Az is megállapítható, hogy az országban számos idegen fajta, illetve hibrid is megjelenik. Tekintettel arra, hogy a méhek természetes úton a szabadban párosodnak, ezért az apa nem ismert, azonosítása nem megoldható. Mindkét szülő ismeretének, és így a klaszszikus tenyésztési eljárások bevezetésének egyik feltétele a populációk genetikai variációjának hazai kutatása, valamint az eredmények adaptálása és alkalmazása a méhtenyésztésben is.

Az *Apis mellifera* fajon belül az *A. mellifera mellifera* (északi), *A. mellifera ligustica* (olasz), *A. mellifera carnica* (krajnai), *A. mellifera caucasica* (kaukázusi) gazdaságilag jelentős fajták (Rothenbuhler et al., 1968) (1. ábra).

1. ábra: A mézelő méh fajták elterjedési területei és evolúciós származási vonalai



Forrás: http://www.apidologie.org/index.php?option=com_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/apido/full_html/2009/03/m08114/F1.html

Figure 1: The honey bee spread area and evolutionary lineages

A házi méh biodiverzitását először morfológiai bélyegek alapján mérték fel (Ruttner et al., 1978). A házi méh fajon belül morfológiájuk alapján 24 alfajt különböztetnek meg. Ezen belül három evolúciós származási

vonallal különíthető el az óvilágban (a házi méh eredeti demográfiai területe, mielőtt az ember elterjesztette volna) morfológiai bélyegek alapján. Az európai házi méh (*M*) melyben megjelenik *Apis mellifera iberica* és *Apis mellifera mellifera*, az afrikai (*A*) és az észak-mediterrán (*C*) melybe beletartozik az *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera carnica* és *Apis mellifera cecropia* (Ruttner, 1988). Az utóbbi molekuláris genetikai vizsgálatok bizonyították további két származási vonal meglétét, ami tartalmazza a közel kelet alfajait és Etiópiából az *A. m. yemenica* alfajt (Franck et al., 2000) (1. ábra).

A XX. század óta az észak-nyugat európai méhtenyésztésben a kiválóbb fajták szerepelnek, főként az *Apis mellifera ligustica* Olaszországból és az *Apis mellifera carnica* a korábbi Jugoszláviából. Arra következtethetünk, hogy direkt fajtakicserélés és a génáramlás figyelhető meg az őshonos és betelepített fajták között (Jensen és Pedersen, 2004). Európa egyes részein az őshonos méheket már kihaltak tekintik. Németországban például erőteljes kicserélés kezdődött, az *Apis mellifera mellifera* fajtát *Apis mellifera carnica* fajtára váltották (Maul és Hahnle, 1994). A skandináv országokban és a Brit-szigeteken a legtöbb profi és hobbi méhész ma *Apis mellifera ligustica*-t, *Apis mellifera carnica*-t vagy egy mesterségesen létrehozott vonalat, a *Buckfast* méhet tartják. Így az *Apis mellifera mellifera* természetes elterjedési területe az utóbbi években jelentősen lecsökkent (Jensen et al., 2005).

A krajnai méh (*Apis mellifera carnica* Poll.) a Karavankák hegyláncától, az osztrák-szlovén határ területén őshonos. A vidéken még hagyományos méhészkedést folytatnak. A név az azonos nevű Karnika Alpok területéről származik. Megtalálható a Duna völgyben Bécs-től a Kárpátokig, az Alpokban Ausztria déli részén, Szlovéniában és Horvátországban egészen a dalmát partokig. A fajta jellegét mutatják még a szlovák, dél-lengyel és a Kárpátokban a hegyi méhek, ill. a Kárpát-medence méhe is.

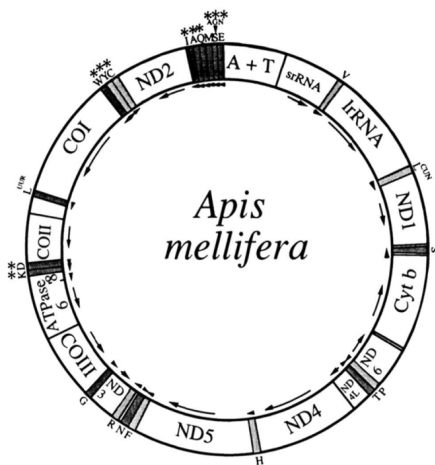
A hazai mézelő méh populáció diverzitását meghatározni mikroszatellit vizsgálatok megkezdésével tervezzük. A mikroszatellit a genomon elszórtan elhelyezkedő néhány bázispár ismétlődéséből álló 50–300 bázispár (bp) hosszúságú szekvencia részletek. Ezen ismétlődések típusa más-más, azonosíthatóságukat az őket határoló, genomon csak néhány helyen előforduló szekvenciák, primer kapcsolódási helyek teszik lehetővé (Fésüs et al., 2000).

Szociális rovarok populáció struktúrájának és rokoni kapcsolatainak vizsgálatához elsőként Davis et al. (1990) alkalmaztak DNS markereket. A házi méhben tudományos és ökonómiai fontossága miatt számos mikroszatellit mutattak ki (Estoup et al., 1993), melyek kiváló eszközei a genetikai diverzitás megállapításának (Estoup et al., 1994) és a géntérképezésnek. Mikroszatellit használatával az egyedek könnyen és pontosan azonosíthatóak, emellett új lehetőségeket biztosítanak a házi méhek kutatása területén (Estoup et al., 1995). A fent említett módszerekkel házi méhcsaládok apasági analízise is elvégezhető (Fondrk et al., 1993).

A hazai mézelő méh populációk diverzitásának meghatározását mitokondriális DNS vizsgálatokkal is ki fogjuk egészíteni, amihez szükség van a mitokondrium sajátosságainak ismeretére. A mitokondrium önálló

genommal rendelkezik, amely a rovarokban kettős szálú, kör alakú DNS molekula (2. ábra).

2. ábra: A mézelő méh mitokondriális genomjának térképe



Forrás: Crozier, R.H. és Crozier, Y.C., 1992

Figure 2: The map of the honey bee mitochondrial genome

Amíg a mitokondriális genomon minden századik, addig a nukleáris genomon csak minden ezredik bázis mutat eltérést. A mitokondriális DNS mutációs rátája jóval nagyobb a nukleáris DNS mutációs rátájánál, megközelítőleg 2% egymillió évenként (Brown et al., 1979).

A házi méh mitokondriális genomjának hossza 16,5 és 17 kb. között van (Smith és Brown, 1988). Ez a láncolat a hosszúság variabilitása szempontjából két részre osztható. Az egyik a kontroll régió, a másikon pedig a méretkülönbség nagyobb (a legrövidebb és a leghosszabb típus között 450 bp) a COI-COII összekapcsolódásánál. Ezt a régiót korábban (Crozier, R.H. et al., 1989) szekvenálták, és közöttük megtalálták a tRNA^{Leu} és a COII géneket. A kapott szekvencia a rövidebb típushoz tartozik. Nem sokkal később (Courmet et al., 1991) meghatározták a COI-COII régió között található hosszú intergénikus szakaszt. Megállapították, hogy a szekvencia hossza változó a fajták között és a fajton belül. Az első alternatív filogenetikai vizsgálatot mitokondriális DNS segítségével végezték el, hogy rekonstruálják a méh nemzetségek közötti rokoni kapcsolatokat (Cameron, 1991, 1993). A mitokondriális genom körülbelül 93%-a kódoló szekvencia, csupán nagyon rövid intronok találhatók benne. Nem kötődnek hozzá fehérjék, ezért kevésbé védett a mutagén hatásokkal szemben. A mitokondriumból hiányzik az excíziós javító rendszer is, ami a létrejött mutációkat javítaná (Li, 1997).

Terveink szerint méhpopuláción belüli és populációk közötti összehasonlítást végzünk.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A dolgozó méheket tizenhat méhészetből (populációból) gyűjtöttük Magyarország területén, melyekről feltételezzük, hogy a krajnai fajtaban megjelenő egyéb fajta genetikai tulajdonságait is tartalmazza. Kontroll csoportként a Kisállattenyésztési és Takarmányozási

Kutatóintézet Méhtenyésztési és Méhbiológiai Osztályától fajtatiszta krajnai mintákat, külföldi méhészetekből pedig *Apis mellifera iberica*, *Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligustica* fajtatiszta egyedeket és *Buckfast* hibrideket kértünk. A hazai populációkból a genetikai vizsgálatokhoz ötven egyedet gyűjtöttünk, melyek még lefedés előtti 5–7 napos álcák voltak. A mintákat 5 kaptárból vettük, kaptáronként 10 egyed. A méhek egyenként eppendorf csövekbe kerültek, majd azokat -20 °C-on tároltuk a laboratóriumi vizsgálat megkezdéséig.

A genetikai vizsgálatokat a Debreceni Egyetem Állatgenetikai Laboratóriumában végeztük. A genomális DNS kivonása Latorre et al. (1986) módszere alapján történt. A felhasználásra kerülő mikroszatellit markerek a következők: A7, A14, A28, A113, B124, A(B)24, A88, A35 (Estoup et al., 1995), A43, A76, A107 (Estoup et al., 1993).

Az allélfrekvenciákat és az allélek számát, valamint a megfigyelt és várt heterozigotizás értékét a GENEPOP 1.2. és a POPGENE 1.32. szoftvercsomagok segítségével számítottuk ki. Az egyes lokuszon megjelenő egyedi alléleket a CONVERT 1.31-es szoftverrel detektáltuk. A Shannon-féle index segítségével az állomány genetikai változatosságát számszerűsítettük. A Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés (X^2 -próba) és a heterozigóta deficit valószínűségi értékeinek kiszámításához ugyancsak a GENEPOP 1.2 szoftvercsomagot alkalmaztuk (Yeh és Boyl, 1997). A populáción belüli és populációk közötti genetikai különbségeket (Fst érték), az allélgazdagságot, valamint az egy lokuszon megfigyelt allélok kiszámítását az FSTAT programmal végeztük el (Goudet, 1995).

A fajták és populációk közötti Nei-féle genetikai távolság értékek kiszámításához ismételten a POPGENE 1.32 programot használtuk fel. Az adatokból generált dendrogram elkészítéséhez pedig a TREEVIEW szoftvert alkalmaztuk (Page, 1996).

EREDMÉNYEK

Mintagyűjtés

Az országban 16 helyről történt mintagyűjtés (Fertőszentmiklós, Kercaszomor, Bazsi, Kaposfüred, Dinnyeberki, Pest, Abony, Kecskemét, Kiskunfélegyháza, Abasár, Okány, Cserépfalu, Perkupa, Hajdúszoboszló, Hajdúvid, Nyírcsholy). Minden méhészetből 50 egyed került begyűjtésre, 5 családból családonként 10 egyed.

Mikroszatellit vizsgálat

A mikroszatellit vizsgálatok első lépéseként megközelítőleg 800 egyedből a genomális DNS izolálása történt meg (Latorre et al., 1986) módszere alapján (3. ábra).

Ezt követően a meglévő DNS általunk vizsgált szegmensét polimeráz láncreakció (PCR) segítségével felsokszorozítottuk. A PCR program a következő: 94 °C 2:00 perc, 35 ciklus 94 °C 0:30 perc, (55 °C, 56 °C, 58 °C, 60 °C 0:30 perc, 72 °C 0:30 perc, 72 °C 10:00 perc, 10 °C. Az amplifikációhoz szükséges reakcióelegy a következő: 1 µl izolált DNS, 1 µl dNTP, 2 µl 5 × puffer, 1,7 µl MgCl₂, 0,1 µl primer, 0,07 µl Taq polimeráz, 4,03 µl dH₂O.

3. ábra: Álcából kivont genomális DNS gélképe

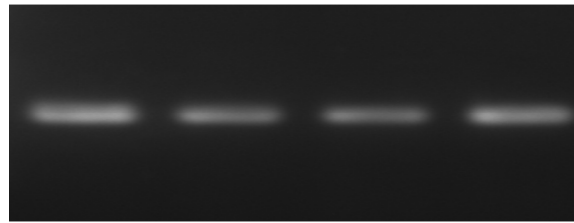


Figure 3: The photo of the genomic DNA gel extracted from honey bee larvae

Mitokondriális DNS vizsgálat

A mitokondriális DNS (továbbiakban mtDNS) vizsgálat során a COI-COII régióban lévő primer pár felhasználására került sor (Estoup et al., 1995). Quiagene tisztító kit segítségével eltávolításra kerültek az oldatban a felesleges vegyszerek. A primer feltapadási hőmérséklete a standard hőmérsékleti tartományon kívül esik, így csupán a minták kis része értékelhető (4. ábra). A tisztított DNS Németországba postázását követően a minták jelentős részénél használhatatlan szekvenciát (5. ábra) kaptunk.

Munkánk folytatásaként két primer pár tervezése történt a Primer3 programmal. Az említett primerek a COI és 16S rRNS régióban találhatóak. A primerek tesztelése után meghatározásra került az optimális feltapadási hőmérséklet és a PCR kondíciók, melyek a következők: 92 °C 2:00 perc, 35 ciklus 92 °C 0:30 perc, (63 °C, 64 °C) 0:30 perc, 63 °C 2:00 perc, 63 °C 10:00 perc, 10 °C. Az amplifikációhoz szükséges reakcióelegy a következő: 1 µl izolált DNS, 1 µl dNTP, 2 µl 5 × puffer, 1,5 µl MgCl₂, 0,1 µl primer, 0,07 µl Taq polimeráz, 4,33 µl dH₂O.

KÖVETKEZTETÉSEK

A vizsgálatok első lépéseként megközelítőleg 800 egyedből a genomális DNS izolálása történt meg (Latorre et al., 1986) módszere alapján.

Mikroszatellit használatával az egyedek könnyen és pontosan azonosíthatóak, emellett új lehetőségeket biztosítanak a házi méhek kutatása területén. A mikroszatellit vizsgálatok kezdeti lépéseként a megfelelő feltapadási hőmérsékletét és PCR kondíciók megállapítása történt meg.

A felhasznált COI-COII mitokondriális régióban lévő primer az alacsony feltapadási hőmérséklet miatt számunkra a hagyományos szevenálási technológiával nem alkalmazható. A két újabb primer pár tesztelése után meghatározásra került az optimális feltapadási hőmérséklet és a PCR kondíciók.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A publikáció elkészítését a TÁMOP 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007 és a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 számú projektek támogatták. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

4. ábra: Értékelhető mtDNS szekvencia

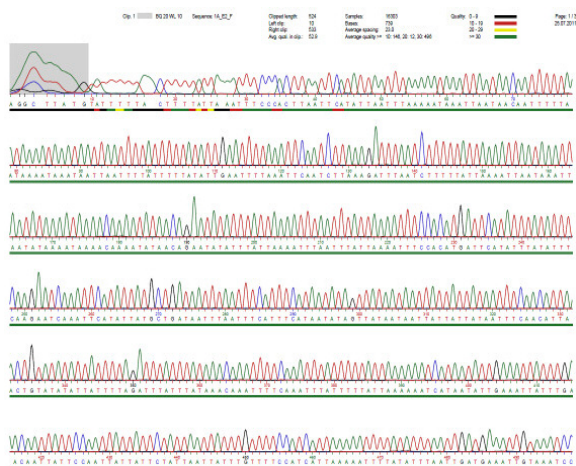


Figure 4: Measurable mtDNA sequence

5. ábra: Értékelhetetlen mtDNS szekvencia

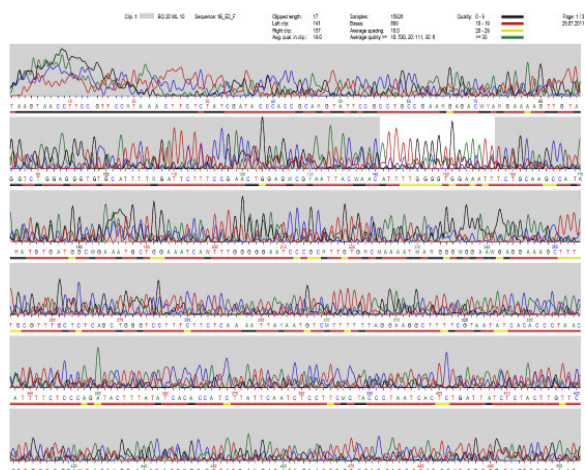


Figure 5: Unmeasurable mtDNA sequence

IRODALOM

- Avise J.C. (1994): Molecular Markers, Natural History, and Evolution. New York. Chapman and Hall.
- Brown, W.M.–George, M.J.–Wilson, A.C. (1979): Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. PNAS. 76: 1967–1971.
- Cameron, S.A. (1991): A new tribal phylogeny of the Apidae inferred from mitochondrial DNA sequences. [In: Smith, D.R. (ed.) Diversity in the genus, *Apis*.] Westview Press. Oxford. 71–87.
- Cameron, S.A. (1993): Multiple origins of advanced eusociality in bees inferred from mitochondrial DNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 8687–8691.
- Cornuet, J. M.–Garnery, L.–Solignac, M. (1991): Putative origin and function of the intergenetic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. Genetics. 1128: 393–403.
- Crozier, R.H.–Crozier, Y.C.–Mckinley, A.G. (1989): The COI and COII region of honeybee mitochondrial DNA: evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates. Mol. Biol. Evol. 6: 399–411.
- Crozier, R.H.–Crozier, Y.C. (1992): The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. Genetics. 133: 97–117.
- Davis, S.K.–Strassmann, J.E.–Huges, C.–Pletscher, L.S.–Templeton, A.R. (1990): Population structure and kinship in Polister (*Hymenoptera, Vespidae*): An analysis using ribosomal DNA and protein electrophoresis. Evolution, 44: 1242–1253.
- Estoup, A.–Lionel, G.–Michael, S.–Jean, M.C. (1995): Microsatellite Variation in Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Populations: Hierarchical Genetic Structure and Test of the Infinite Allele and Stepwise Mutation Models. Genetics. 140: 679–695.
- Estoup, A.–Solignac, M.–Cornuet, J.M. (1994): Precise assessment of the number of matings and of relatedness in honey bee colonies. Proc. R. Soc. London. B. Biol. Sci. 258: 1–7.
- Estoup, A.–Solignac, M.–Harry, M.–Cornuet, J.-M. (1993): Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two-insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. Nucleic Acids Res. 21: 1427–1431.
- Fésüs L.–Kömlösi I.–Varga L.–Zsolnai A. (2000): Molekuláris genetikai módszerek alkalmazása az állattenyésztésben. Agroinform Kiadó és Nyomda Kft. Budapest. 40–42.
- Fondrk, M.K.–Page, R.E.–Hunt, G.J. (1993): Paternity analysis of worker honeybees using randomly amplified polyorphic DNA. Naturwissenschaften. 80: 226–231.
- Franck, P.–Garnery, L.–Solignac, M.–Cornuet, J.M. (2000): Molecular confirmation of a Middle East lineage in *Apis mellifera*. Apidologie. 31: 167–180.
- Goudet, J. (1995): Fstat version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. Journal of Heredity. 86. 26: 485–486.
- Jensen, A.B.–Palmer, K.A.–Boomsma, J.J.–Pedersen, B.V. (2005): Varying degrees of *Apis mellifera* ligustica introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe. Molecular Ecology. 14: 93–106.
- Jensen, A.B.–Pedersen, B.V. (2004): Honeybee conservation: a case story from Laeso Island, Denmark. [In: Lodesani, M. (ed.) Sustainable bee breeding.]
- Latorre, A.–Moya, A.–Ayala, F. (1986): Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 8649–8653.
- Li, W.H. (1997): Molecular Evolution. Sinauer. Sunderland. 488.
- Maul, V.–Hahnle, A. (1994): Morphometric studies with pure bred stock of *Apis mellifera carnica*, Pollmann from Hessen. Apidologie. 25: 119–132.
- Northern Bee Books: Mytholmroyd. Hebden Bridge.
- Page, R.D.M. (1996): Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computer. Computer Applications in the Biosciences. 12: 357–358.
- Rothenbuhler, W.–Kulinevic, J.–Kerr, E. (1968): Bee genetics. Ann. Rev. Genetics. 2: 413–438.
- Ruttner, F.–Tassencourt, L.–Louveaux, J. (1978): Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. Apidologie. 9: 363–381.
- Ruttner, F. (1988): Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg.
- Smith, D.R.–Brown, W.M. (1988): Polymorphisms in mitochondrial DNA of European and Africanized honeybees (*Apis mellifera*). Experientia. 44: 257–260.
- Yeh, F.C.–Boyl, T.B.J. (1997): Popgene Microsoft Windows-based software for population genetic analysis. A joint project development by Francis C. Yeh, University of Alberta and Tim Boyl for International Forestry Research. Bogor. Indonesia. 29.