



Debreceni Egyetem

Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és

Környezetgazdálkodási Kar



Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet

Intézetvezető: **Prof. Dr. Jávor András**

egyetemi tanár

Magyarország területén található házi méh (*Apis mellifera*) populációk genetikai diverzitás vizsgálata mitokondriális DNS vizsgálattal

készítette:

Tóth Bianka Mónika

Biológus Msc II. évf.

témavezetők:

Dr. Kusza Szilvia

tudományos munkatárs

Zakar Erika

PhD hallgató

Debrecen

2012

„Ha a méhek eltűnnének a Föld színéről, négy évnél tovább az emberiség sem élné túl.”
(A. Einstein)



Apis mellifera carnica (forrás: <http://www.biolib.cz/en/taxonimage/id17870/?taxonid=70380>)

Tartalomjegyzék

Bevezetés	5
1. Témafelvetés.....	6
2. Szakirodalmi áttekintés.....	7
2.1. A házi méhek és a méhészet története.....	7
2.2. A méhek rendszertana	8
2.3. Az Európában gazdaságilag jelentős fajták jellemzése.....	10
2.3.1. A krajnai méh fajta (<i>Apis mellifera carnica</i>).....	10
2.3.2. Az olasz méh fajta (<i>Apis mellifera ligustica</i>)	11
2.3.3. A sötét európai méh (<i>Apis mellifera mellifera</i>)	11
2.4. Az <i>Apis mellifera</i> faj elterjedése	12
2.4.1. Az európai méh fajták veszélyeztető tényezői.....	14
2.5. Mitokondrium és mitokondriális DNS (mtDNS).....	15
2.5.1. A házi méh (<i>Apis mellifera</i>) mitokondriális DNS-e	16
2.5.2. A citokróm oxidáz I gén (COI).....	18
2.6. Genetikai távolság vizsgálatok.....	19
2.6.1. A polimeráz láncreakció (PCR).....	19
2.6.1.1. Nukleinsavak elválasztása elektroforézissel	19
2.6.2. Szekvenálás.....	20
2.6.3. Házi méh mitokondriális DNS vizsgálatok	20
3. Anyag és módszer	24
3.1. Mintavétel.....	24
3.2. Genomiális DNS izolálás	25
3.3. Primertervezése	25
3.4. Polimeráz láncreakció (PCR)	25
3.5. Nukleinsavak elválasztása elektroforézissel	26

3.6. A minták szekvenáláshoz való előkészítése	27
3.7. Szekvenciák elemzése	27
4. Eredmények.....	28
4.1. Primertervezés	28
4.2. Primerek ellenőrzése PCR segítségével	31
4.3. Szekvenálás	31
4.4. Genetikai diverzitásmutatók.....	33
5. Következtetések és javaslatok	37
6. Összefoglalás.....	38
Szakirodalmi jegyzék.....	39
Köszönetnyilvánítás	44
Nyilatkozat.....	45

Bevezetés

Az ökoszisztéma rendkívül összetett kölcsönhatásokon alapuló folyamat. A méhek a természet fennmaradásában és az emberiség számára jelentős szerepet töltenek be. Alapvető fontosságúak az egyre inkább növekedő élelmiszerszükséglet miatt. Méhek nélkül a jövőbeli élelmiszer ellátás fenntarthatósága kerülne veszélybe (Lampeitl, 2004).

A házi méh (*Apis mellifera*) beporzó tevékenységét tekintve nélkülözhetetlen a bioszféra természetes rendszerében. Meghatározó szerepet tölt be a vadon élő növényfajok diverzitásának megőrzésében. A rovar beporzás alapvetően fontos a legtöbb gyümölcs és zöldség esetében, ezáltal a házi méh a mezőgazdaságban nagymértékben hozzájárul a termés mennyiségének növekedéséhez. Több iparág (élelmiszeripar, gyógyszeripar, vegyipar) hasznosítja a méhcsalád által létrehozott termékeket, mint a mézet, a viaszt, a propoliszt, a méhpempőt valamint a méhmérget (Mátray, 2002., Vicze, 1997). Az akácméz minősége és egyedisége miatt Hungaricumnak számít (Internet 1).

A méhek populáció mérete csökkenő tendenciát mutat a világon, amely az élelmiszerlánc egészére hatással lehet. A méhcsaládok összeomlása egy olyan összetett probléma, mely a családok hirtelen eltűnésével jár. Ez a jelenség például az Egyesült Államokban jelentős számú termelő méhcsalád pusztulásához vezetett (Johnston, 2011., Mátray-Szél, 2000).

Magyarországon is felbecsülhetetlen hasznat hoz a közel félmillió méhcsalád beporzó tevékenysége, mely a mezőgazdasági kultúrák termésátlagának növelésén túl, elősegíti a biodiverzitás fenntartását (Mátray, 2002). A magyar méhészet a mezőgazdaság bruttó termelési értékének 1%-át, az állattenyésztésnek közel 3%-át adja (Magyar Méhészeti Nemzeti Program 2010).

Magyarországon őshonos méhfajta a krajnai méh (*Apis mellifera carnica*), mely kiválóan alkalmazkodott az ökológiai feltételeinkhez. Tenyésztése szabályozott és ellenőrzött körülmények között folyik (Magyar Méhészeti Nemzeti Program, 2010). E fajta genetikai tisztaságát veszélyeztethetik a külföldről hazánkba érkező más fajták.

Hipotézisünk igazolására mitokondriális DNS markert választottunk, mely az állatok evolúciós kutatásának népszerű molekuláris genetikai eszköze. Törzsfajlódási vizsgálatok elvégzésére, valamint a populációk szerkezetének, dinamikájának és molekuláris evolúciójának tanulmányozására is alkalmas (Avice, 1994). Vizsgálatunkhoz a teljes mitokondriális genomon belül a citokróm oxidáz I régió egyik legvariabilisabb szakaszát vizsgáltuk.

1. Témafelvetés

A házi méh mitokondriális DNS-e kapcsán számos kutatást végeztek különböző genetikai módszerek segítségével.

Mitokondriális DNS felhasználásával 22 méhészet 142 méhcsaládját elemezték az Egyesült Államok DK-i részén. Az eredmények alapján a családok 4 %-a az *Apis mellifera mellifera* fajta tartozik. *Apis mellifera ligustica* és *Apis mellifera carnica* fajta a fennmaradó 96 %, melyek import útján kerültek a területre a XIX. században. Jelentős különbséget figyeltek meg a vad és tenyésztett populációk között. Javaslatot tettek arra, hogy a két populáció között lévő genetikai variabilitás lehetőséget nyújthat további tenyésztési programokra (Nathan-Sheppard, 1995).

Szerbia őshonos házi méh populációját tanulmányozták mtDNS felhasználásával. A vizsgálat során három ökotípust különítettek el: Bánság (B), Syenichko-Peshterski (S) illetve Timok (T). Az eredményeik alapján az országban jelenlévő fajták a „C” származási vonalba sorolhatók. Az eredmények alapján az ökotípusok több haplotípusba különíthetők el. Szerbiában e tanulmányban alkalmazták először a mtDNS vizsgálatát, mint molekuláris technikát, az *Apis mellifera* származási vonalainak feltérképezéséhez (Kozmus et al., 2007).

Magyarországon a krajnai méh (*Apis mellifera carnica*) genetikai diverzitását vizsgálták RAPD-PCR segítségével 6 különböző anyanevelő méhészet 19 méhcsaládjában. A kapott eredményeket morfológiai eredményekkel vetették össze. Bizonyították, hogy az egy tenyésztő által nevelt családok nem hasonlítanak jobban egymásra, mint az ország más részéről származók. Az analízis alapján megerősítették, hogy az általuk vizsgált hazai anyanevelő telepek nagyfokú diverzitást mutatnak, melynek nagy szerepe lehet a jó termelési tulajdonságok megtartásában (Révay et al., 2008).

A kereszteződés igazolásának vagy cáfolásának kiváló eszköze a mitokondriális genom, mely új származási vonalak felfedezésében is szerepet játszott.

Tudományos diákköri munkámban választ kerestünk arra, hogy a Magyarországon őshonos krajnai méh fajta (*Apis mellifera carnica*) homogén vagy más fajták beáramlása is kimutatható az általunk vizsgált mintákban.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. A házi méhek és a méhészet története

A méhek a Földön jóval az ember előtt jelentek meg. A legrégebbi lelet 30 millió éves, a földtörténeti harmadkorból származik. Az emberrel való kapcsolat kezdetéről egy spanyolországi barlangfestmény tanúskodik, mely 20 ezer éves. A történelem előtti idők embere az egész lépet –az álcákkal és petékkal együtt- elfogyasztotta (Kotics, 2002).

Az asszírok ékírásos táblát hagytak az utódaikra, melyen mézből készült gyógyszerek receptjeit írták le. Az ókori Egyiptomban a templomi domborművek bizonyítják a méhészkedést. A mézet balzsamozásra is használták. Az Ószövetségben ugyancsak találunk utalást a méhek gondozásáról, a füstöléséről és a méz kinyeréséről. Belső-Ázsiában feltárt asztanai temető egyik aknasírjának a falfestményén méhkaptár és méhek láthatók. Az ókori görögök is gyakorolták a méhészet mesterségét. Rómában, a császárság korában a fő étkezéseken állandó kellékké vált a méz és a mézzel készített ételek (Vicze, 1997).

A méhészet Euráziában is elterjedt, a Kárpát-medencében már a honfoglalás előtt ismert mesterséggé vált. A méhészetről az első írásos emlékünkn Szent István korából származik. Mátyás király idején a méhészkedés jelentős fejlődésnek indult, egyre nagyobb igény jelentkezett a méz és mézből készült termékek iránt. A magyar méhészek látták el a környező országokat mézzel, mézeskaláccsal, mézsörrel és viasszal. A méz fogyasztása és a viasz használata Mátyás király korszakában nagyobb jelentőséggel bírt, mint napjainkban, így nagy mennyiség került exportra. A méhészkedés a XVI. században indult hanyatlásnak. Mária Terézia 1776-ban eltörölte a méhészettel foglalkozók adóját. 1770-ben Bécsben méhészeti főiskolát alapított ennek következtében a mesterség ismét fejlődésnek indult (Halmágyi- Keresztesi, 1991).

A méhek a természetben egy faodúban vagy sziklarepedésben esetleg földüregben építenek lépeket. Korábban az ember a méhek kirablásával jutott hozzá a mézhez, később fatönkbe illetve kasba helyezte a méhcsaládot. Ez már egy sokkal hatékonyabb módszernek bizonyult, de a kas illetve fatönk bővítése továbbra sem vált lehetővé, így nagyobb hordás idején a méhcsalád egy része kirajzott. Az egyik leghatékonyabb és mai napig is jól működő módszer 1683-ban a keretes kaptár megjelenése. Hazánkban a bioméhészkedés a kaptárak és keretméretek számos típusával folyik. Magyarországon a méhlegelők sokféleségéből adódóan álló és vándor méhészetek alakultak ki

(Szalai, 2001). Ezáltal a mézelő méh fokozott szerepet tölt be a vadon élő növényfajok diverzitásának fenntartásában továbbá a mezőgazdasági kultúrák beporzásában.

2.2. A méhek rendszertana

Számos méhfaj alakult ki a világon a különböző természeti körülményekhez alkalmazkodva.

A faj és fajta fogalma biológiai és morfológiai megközelítésben értelmezhető. A faj az élőlények rendszerezésének az alapegysége. A morfológiai megközelítés az egymáshoz hasonlító, de más egyedektől eltérő állatok csoportját jelenti. Biológiai értelemben a morfológiai tulajdonságok helyett a genetikai tulajdonságok a mérvadók, vagyis a génkicserélődésen van a hangsúly. A fajon belül megkülönböztetünk alfajokat, változatokat, eltéréseket, földrajzi változatokat (ökotípus) és rasszokat. A méhészeti szakirodalomban az alfaj helyett a fajta megjelölést használják. A fajon belül az alak, és élettani eltérést mutató csoportok megjelölésére is a fajta megnevezést alkalmazzák. A fajták egymással keresztezve termékeny utódokat hoznak létre, természetes és mesterséges úton is kialakulhatnak. A házi méh fajhoz összesen 39 fajta sorolható. A fajták többnyire természetes úton jöttek létre, az emberi beavatkozás csak kis mértékben játszott szerepet (Mátray, 2002).

A házi méh rendszertani helye:

Ízeltlábúak (*Arthropoda*) törzse

Légcsövesek (*Tracheata*) altörzse

Rovarok (*Insecta*) osztálya

Szárnyas rovarok (*Pterygota*) alosztálya

Hártyásszárnyúak (*Hymenoptera*) rendje

Fullánkosok (*Aculeata*) alrendje

Méhek (*Apidae*) családja

A hártáásszárnyúak (*Hymenoptera*) rendjébe kb. 100.000 faj található, ebből 2000 fajt a méhfélék (*Apidae*) családjába sorolunk. Jelenleg nyolc fajt ismerünk az *Apis* nem (genus) belül. Ezek a következők:

- nyugati (európai) házi méh (*Apis mellifera*) (Linnaeus, 1758)
- törpe méh (*Apis florea*) (Fabricius, 1787)
- keleti házi méh (*Apis cerana*) (Fabricius, 1793)
- óriás méh (*Apis dorsata*) (Fabricius, 1798)
- bokor vagy bozótlakó méh (*Apis andreniformis*) (Smith, 1858)

- sziklák méhe vagy himalájai méh (*Apis laboriosa*) (Smith, 1871)
- vörös méh (*Apis koschevnikovi*) (Buttel-Reepen, 1906)
- „apróméh” (*Apis nuluensis*) (Tingek-Koeniger-Koeniger, 1996)

A házi méh fajtái földrajzi elterjedés szerint:

1. Krajnai méh (*Apis mellifera carnica*) – a Balkán-félszigettől az Alpokig
2. Olasz méh (*Apis mellifera ligustica*) – Itália, Európa, Amerika
3. Sötét európai méh (*Apis mellifera mellifera*) – Észak-Európa, Közép-Oroszország
4. Kaukázusi méh (*Apis mellifera caucasica*) – Kaukázus, Románia, Bulgária
5. Ciprusi méh (*Apis mellifera cypria*) – Ciprus
6. Tell méh (*Apis mellifera intermissa*) – Ibériai-félsziget, Észak-Afrika (Marokkótól Líbiáig)
7. Egyiptomi méh (*Apis mellifera fasciata*) – Nílus völgye
8. Fokföldi méh (*Apis mellifera capensis*) – Fokváros
9. Afrikai méh (*Apis mellifera adansonii*) – a Szaharától Dél-Afrikáig
10. Keleti méh (*Apis cerana*) – Ázsia
11. Óriás méh (*Apis dorsale*) – Ázsia
12. Törpe méh (*Apis florea*) – Ázsia
13. Brazíliában kiszabadult afrikanizálódott méhhibrid az ún. „Gyilkos méh” az *Apis mellifera scutellata* és az *Apis mellifera* hibridje (Mátray, 2002).

2.3. Az Európában gazdaságilag jelentős fajták jellemzése

2.3.1. A krajnai méh fajta (*Apis mellifera carnica*)

A krajnai méh Magyarország őshonos méhfajtája (1. kép). A név az Alpok területéről származik. Megtalálható a Duna völgyben, az Alpokban Ausztria déli részén, Szlovénia és Horvátországon át a dalmát partokig. Elterjedt fajta Norvégiában, Oroszországban és Kanadában. A Kárpát-medence méhének is tekintjük, hiszen a szlovák, dél-lengyel és a Kárpátokban a hegyi méhek mind mutatják a jellegeit. A krajnai méh elterjedési területére a kontinentális klíma jellemző, ahol a hosszú hideg tél és a meleg, száraz nyár váltja egymást. A legjobban áttelelő fajta, a Duna völgyében akár a mínusz 30 °C-ot is túléli.



1. kép: *Apis mellifera carnica* (forrás: Internet 2)

Az anya a nyári hordástalan időkben alkalmazkodik a lehetőségekhez, csökkenő nektárforrás esetén visszafogja a petézést.

Az *Apis mellifera carnica* testfelülete barnás, szürkés, világosszürke széles szőrövekkel. Szőrözete a toron barnás, kitingpáncélja sötét színű. 2-3 potrohgyűrűjén sárgásbarna folt vagy csík jelenhet meg. Fontosabb fajtabélyege a szipóka, melynek hossza 6,5 mm, a kubitális (a harmadik könyöksejt két erének aránya) index értéke 2,3-3,0, a tergitek sötétek, a második torszelvényn kétoldalt néhány %-ban sárgás szín húzódnak.

Nem támadó hajlamú, akár védőeszközök nélkül is kezelhető, közepesen rajzónak tekintik. Viszonylag kis népességgel telel és tavasszal gyorsan fejlődik. Nagy családot fejleszt korai akácra. Tájékozódási képessége kiváló, a terepviszonyokat és a színeket ismeri fel (Lampeitl, 2004., Mátray, 2002., Vicze, 1997).

2.3.2. Az olasz méh fajta (*Apis mellifera ligustica*)



2. kép: *Apis mellifera ligustica* (forrás: Internet 3)

Az olasz méh (*Apis mellifera ligustica*) (2. kép) jellegzetesen sárga színű. Az anya nem fogja vissza a petézést, amikor csökken a nektárforrás, így a hordástalan időben veszélybe kerül a család. Nagy népességgel telel, nagy a téli fogyasztása. Őshazája az Ibériai-félsziget, ezáltal alkalmazkodott a rövid, enyhe, nedves télhez és a hosszú, száraz nyárhoz. Az európai méhhez képest zömökebb, rövidebb. A szipókájának hossza 6,3-6,6 mm. A szőröve sárga, a potrohgyűrű kitinje világos színű. Szelídnek tekintik, nem rajzó hajlamú. Tájékozódási képessége a krajnai méhhez

képest gyengébb (Márton, 2010., Mátray, 2002., Prigli, 2000).

2.3.3. A sötét európai méh (*Apis mellifera mellifera*)

A sötét európai méh (*Apis mellifera mellifera*) (3. kép) eredeti hazája Észak-Európa, az Alpok nyugati lejtője illetve Közép-Oroszország. Tavasszal viszonylag nehezen indul fejlődésnek, azonban nagy családdal telel. Méretét tekintve nagyobb az előző két fajtához képest, ugyanakkor szipókája rövid: 5,5-6,4 mm. Potroha széles, kitinpáncélja pedig egyöntetű sötét színű, a 2. és 3. potrohgyűrűn ritkán fordulnak elő sárga foltok, viszont sárga öv nem jellemző. Hosszú szőrzetű, keskeny



3. kép: *Apis mellifera mellifera* (Internet 4)

szőrövekkel. Kubitális indexe kicsi: 1,3-2,1. Tavasszal csak lassan fejlődik közepes erősségűre. Támadó hajlamú, de a rablás nem jellemzi a fajtát (Márton, 2010., Mátray, 2002., Prigli, 2000).

2.4. Az *Apis mellifera* faj elterjedése



1. ábra: Az *Apis mellifera* evolúciós vonalainak és fajtáinak természetes eloszlása Európában (forrás: De la Rua et al., 2009)

Molekuláris genetikai módszer -SNP (Single Nucleotide Polimorphism) vagy más néven pontmutáció- segítségével bizonyították azt a feltevést, hogy az *Apis mellifera* afrikai származású. A további genetikai vizsgálatok három evolúciós származási vonalat különítettek el (1. ábra). A jégkorszak után fennmaradt populációk Európa felé vándoroltak tovább. A mediterrán területekről Európa északi része felé terjedtek, az egyik fő terület az Ibériai-félsziget, ahol a sötét európai méh (*Apis mellifera mellifera*), a másik a Balkán-félsziget, ahol a krajnai méh (*Apis mellifera carnica*) jelent meg (Whitfield et al., 2006., Franck et al., 2000).

A legnagyobb természetes területén való eloszlással a sötét európai méh rendelkezik. Már 4000 éve jelen van Franciaország, Skandinávia és a Brit-szigetek területén. Ez a fajta manapság szomszédos fajtákkal hibridizál, mint például az Olaszországban honos olasz méhvel (*Apis mellifera ligustica*) és a balkáni országok honos fajtájával, a krajnai méhvel (*Apis mellifera carnica*). Az importból származó idegen honos fajták betelepítése miatt a fajták közötti kereszteződés jelentős (Carreck, 2008., Jensen, 2005).

A Szerbiából, Szlovéniából és Horvátországból gyűjtött krajnai méh (*Apis mellifera carnica*), a macedon méh (*Apis mellifera macedonica*) és a görög méh (*Apis mellifera cecropia*)

fajták közelmúltbeli molekuláris genetikai elemzését követően a kutatók arra az eredményre jutottak, hogy a populációk szoros rokonsági kapcsolatban vannak egymással, melyet valószínűleg a génáramlás okozott (Kozmus et al., 2007).

Az *Apis mellifera carnica* az egész közép-kelet-európai régiókban megtalálható. A fajtán belül földrajzi változatok (ökotípusok) alakultak ki, melyek az alpesi, a pannon és a földközi-tengeri zónákban találhatók. Ezek az ökotípusok befolyásolják a szomszédos fajtákat, a nyugati és az adriai-tengerparton az *Apis mellifera ligustica*-t, az *Apis mellifera mellifera*-t és az *Apis mellifera macedonica*-t (Ruttner, 1988).

A korábbi kutatások alapján olaszországi méh populációk kerültek Franciaország és Szlovénia területére. Az *Apis mellifera ligustica* az olasz félszigetre korlátozódott a poszt-pleisztocén időszakban. Az *Apis mellifera mellifera* a Ligur-tenger partja mentén, az *Apis mellifera carnica* pedig az Adriai-tenger partján terjedt el. A két fajta kereszteződését az Alpok akadályozta, mint természetes földrajzi barrier. Napjainkban egyre inkább alkalmazott molekuláris genetikai módszerek alátámasztják, hogy a két fajta hibridizálódott és új fajták jöttek létre, mely feltehetően az ember okozta mesterséges keresztezések eredményei (Frank et al., 2000).

Az *Apis mellifera ligustica* a méhészek között kedvelt fajta. Az intenzív gazdálkodás a méhanyák tenyésztését eredményezte Észak-Európában, Ausztráliában és a Kanári-szigeteken. Hasonlóképpen felkeltette a méhészek figyelmét az *Apis mellifera carnica* is világszerte. A méhtartók megkönnyítették a krajnai méhanyák szállítását az elterjedési területükön kívülre, a világ bármely részén. A krajnai méh már a 18. században ismertté vált Európa szerte. Szintén ilyen előnyös és kedvelt fajta a kaukázusi méh (*Apis mellifera caucasica*), melyet a méhészek már több mint 100 éve intenzíven tartanak. A kaukázusi méhek elterjedési területe mesterségesen bővült Nyugat-Törökország és Bulgária területére, jelentős számú kaptár került be Oroszországba, Ukrajnába, Németországba és Franciaországba (Frank et al., 2000., Ruttner, 1988).

Az olasz és krajnai méhek intenzív terjesztése az egész európai kontinensre a két fajta szinte teljes cseréjét eredményezte a közép-európai országokban, mint például Németországban. Hibridizációs változatai jelentek meg a skandináv országokban és a Brit-szigeteken (Jensen et al., 2005). Miután egy viszonylag kis népesség differenciálódott Olaszország területére a méhkirálynő intenzív tenyésztésével és a migrációs méhészzel egy olyan új génállomány jött létre, amely kizárólag e területre jellemző (Dall'Olio et al., 2007).

2.4.1. Az európai méh fajták veszélyeztető tényezői

Az európai méh fajták veszélyeztető tényezőit foglaltam össze a következő táblázatban (1. táblázat). Rámutat arra, hogy a genetikai sokféleség megőrzése és a hibridizálódás elkerülése rendkívül fontos feladat a méh fajták megőrzése szempontjából.

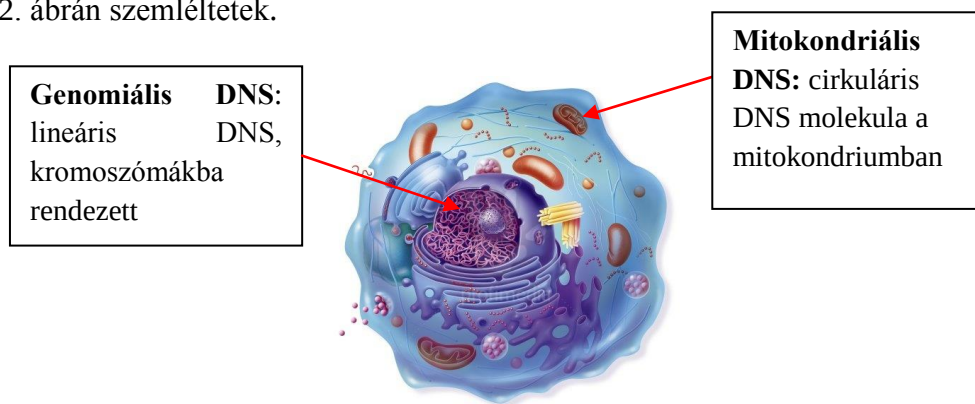
1. táblázat: Az európai méh fajták veszélyeztető tényezői összefoglalva (De la Rua et al., 2009., Szalay, 2008., Vicze, 1997):

Veszélyeztető tényező	Közvetett hatás	Közvetlen hatás
Környezetszennyezés	Talaj- és vízszenyezés, klímaváltozás	peszticidek, herbicidek; korai virágzás, mely a klímaváltozással függ össze, ez populációk beszűkülését idézheti elő
Fajok behurcolása	a paraziták és nem ismert kórokozók terjesztése; a tájidegen fajok terjesztése	a legfőbb gondot jelenleg a méh atka okozza (<i>Varroa destructor</i>); hibridizáció az őshonos fajok között
Intenzív földhasználat	természetes élőhelyek eltűnése	a megfelelő fészkelő- és táplálkozó élőhelyeknek a beszűkülése
a genetikailag módosított növények terjesztése	a vadon élő állatok veszélyeztetése	a természetes élőhelyek beszűkülnek, nem megfelelő a méhek számára a nektárforrás
káros méhészeti tevékenységek	a vándorló méhészet és a méhkirálynővel való kereskedelem	különböző fajták hibridizációja; a genetikai sokféleség beszűkülése
a méhészek támogatásának mérséklése	méhészetek csökkenése	az európai házi méh populációk csökkenése, esetleg néhány faj eltűnése vagy kihalása
védelmi politikák hiánya	a méhészeti tevékenységre nincs korlátozó tényező	valamennyi fent említett hatás

2.5. Mitokondrium és mitokondriális DNS (mtDNS)

A mitokondrium önálló genommal rendelkezik, amely az emlősökben kettős szálú, kör alakú DNS-molekula. A két lánc bázisösszetétele eltér egymástól oly módon, hogy a két lánc centrifugálással szétválasztható. Ez alapján H (heavy, azaz nehéz) és L (light, azaz könnyű) láncot különböztetünk meg. A láncokat a guanin-, illetve citozin tartalmuk alapján különítik el. Tulajdonságaikat tekintve számos eltérést mutatnak például az öröklődés módjában, a rekombináció fokában, az intronok méretében és számában, a javító mechanizmusokban, a mutációs rátában (Scheffler, 1999).

A DNS-nek két típusát különböztetjük meg: a genomiális és a mitokondriális genomot, melyet a 2. ábrán szemléltetnek.



2. ábra: A DNS típusai (forrás: <http://www.profimedia.hu/picture/cell-rajz/0042269948/>)

A genomiális és mitokondriális genomok közötti főbb különbségek (Brown et al., 1979., Omland, 1997):

- A genomiális genomban csak **minden ezredik bázis**, a mitokondriális genomban **minden századik bázis** mutat **eltérést**.
- A mtDNS **mutációs rátája** jóval **nagyobb**, mint a genomiális DNS mutációs rátája.
- A mitokondriális genomban nagyon **rövid intronok** találhatók.
- A mitokondriális genom **37 gént hordoz**, a gének hossza átlagosan 450 bázis.
- Hisztonok és egyéb fehérjék nem kötődnek a mitokondriális genomhoz → így a **mutagén hatásoknak nagyban ki van téve**.
- A mtDNS **szekvenciák szabályszerűbben változnak** a morfológiai és a fiziológiai tulajdonságokhoz képest.
- A morfológiai és genetikai **evolúciós ráták között korreláció** mutatható ki bizonyos esetekben.

A mtDNS analízis érzékenyebb technika, mint a sejtmagi DNS molekuláinak vizsgálata. Előnye, hogy a sejtmaggal nem rendelkező minták analízisét is lehetővé teszi. A módszer eredményesen alkalmazható roncsolódott DNS molekulák esetében is. A mtDNS kizárólag anyai ágon öröklődik (SEÁOK Igazságügyi és Biztosítás-orvostani Intézet), az állatok evolúciós kutatásának népszerű molekuláris genetikai eszköze. Törzsfejlődési vizsgálatok elvégzésére, valamint a populációk szerkezetének, dinamikájának és molekuláris evolúciójának tanulmányozására is alkalmas (Avice, 1994). Eddig számos taxon teljes mtDNS szekvenciáját határozták meg, amelyek segítségével úgynevezett „univerzális primereket” fejlesztettek ki. Ezek az oligonukleotidok konzerválódtak és a hiányos genetikai háttérrel rendelkező taxonok megfigyelésére is alkalmassá váltak (Kocher et al., 1989).

A mitokondriális genomot a legtöbb fajban vizsgálták már, mely egy kerek, körülbelül 16 kb méretű, 13 fehérjét kódoló, egy nagyobb nem kódoló (D-loop), 2 rRNS, 22 tRNS régiója van. Eddig 14 rovar faj genomját teljesen megszekvenálták, melyek a következők (Shao et al., 2001., Yukuhiro et al., 2002):

- 7 légy faj: *Drosophila yakuba*, *D. melanogaster*, *D. mauritiana*, *D. sechellia*, *D. simulans*, *Ceratitis capitata*, *Cochliomyia*
- 2 szúnyog faj (Dipteria): *Anopheles quadrimaculatus*, *A. gambiae*
- *Bombyx mori* (Lepidoptera)
- *Apis mellifera* (Hymenoptera)
- *Locusta migratoria* (Orthoptera)
- *Triatoma dimidiata* (Hemiptera)
- *Heterodoxus macropus* (Phthiraptera)

2.5.1. A házi méh (*Apis mellifera*) mitokondriális DNS-e

A házi méh mtDNS-e kör alakú molekula, teljes szekvenciája 16.343 bázispár hosszú (Clary-Wolstenholme, 1987). Ez a genom 13 fehérjét kódoló gént, 22 tRNS-t, 2 rRNS alegységet és egy nem kódoló régiót tartalmaz (3. ábra). A leghosszabb nem kódoló régió a tRNS és a COII között található, amely 193 nukleotidból áll. Egyéb méh fajok esetében szintén e két gén között figyelhető meg a nem kódoló szakasz. A mtDNS tekintetében különbségeket figyeltek meg a rovaroknál a *Diptera*, *Hymenoptera*, a *Diptera* rendjén belül az *Aedes* és a *Drosophila yakuba* között. A méh mtDNS-e hosszabb, mint a *Drosophila*-é, rövidebb a kontroll régió, általában hosszabb a gének közötti valamint a nem kódoló rész. A méhekre jellemző fehérje szekvenciákról

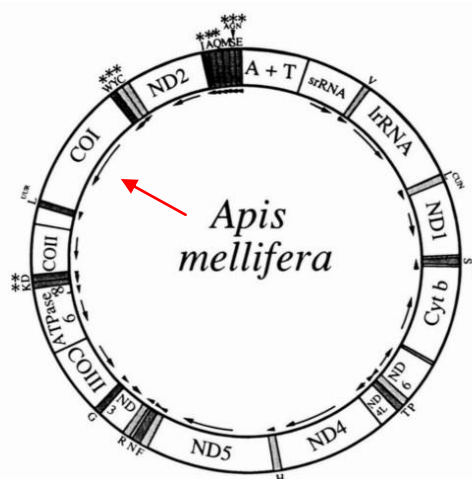
szóló beszámolók szerint nagyobb számú szubsztitúció következett be a méhek esetében a közös őstől számítva a *Diptera*-hoz, *Hymenoptera*-hoz, *Aedes*-hez és *Drosophila*-hoz képest. Egyéb fajokkal ellentétben azonban a házi méh mtDNS-ére jellemző AT gazdagság okainak feltárása további kutatásokat igényel (Clary-Wolstenholme, 1987).

Az *Apis mellifera* mtDNS-ében AT gazdagság jellemző. A házi méh mitokondriális genomja igen magas AT arányt mutat, 84,9 % (*Drosophila yakuba*-ban 78,6 %) (Clary-Wolstenholme, 1987). A nagy számban előforduló nukleotidok jelenlétének okai azonban bizonytalanok. Ugyanakkor azt is megállapították, hogy egyes mutációs folyamatok kedveztek a generációról generációra növekedett AT arálynak (Crozier-Crozier, 1993).

Minden iniciációnál a méh mtDNS-ben a fehérjét kódoló aminosav a metionin (3 ATG, 3 ATA) vagy az izoleucin (1 ATC, 6 ATT). Minden stop kodon a TAA, kivéve a COI és COII régiókat, ahol más végződés is lehet, mint például T vagy AT (Cornuet et al., 1991).

Az *A. mellifera* és *D. yakuba* mtDNS genomjának tekintve az AT nukleotidokat tartalmazó kodonok %-os arányában, az eltérés mértéke a második helyen az aminosavakat felépítő AT triplettek pozíciójától függ. Az *A. mellifera*-nál kb. kétszer több transzverzió fordul elő, mint a *Drosophila*-nál. Ez az arány a kodont felépítő bázisok pozíciójától függően változik (Crozier-Crozier, 1993).

A házi méh mtDNS-e 43,2 %-a adenin, 41,7 %-a timin, 9,6 %-a citozin és 5,5 %-a guanin. A méh mtDNS-ében a legritkább a guanin. Hasonlóan alacsony érték figyelhető meg a tuskésbőrűek közül a *Paracentrotus lividus* mtDNS-ében. A gerinctelenek esetében (mint például a *Drosophila yakuba* vagy a fonálférgek közül az *Ascaris mum* valamint a *C. elegans*), melyeknél jellemzően a legritkább nukleotid a citozin (Wolstenholme, 1992).

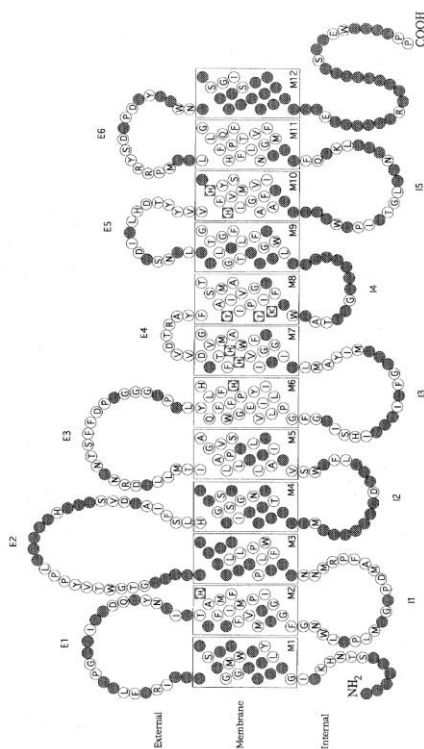


3. ábra: A házi méh (*Apis mellifera*) mitokondriális genomjának térképe, melyen piros nyíl jelöli a citokróm oxidáz I-es régiót (COI) (forrás: Crozier-Crozier, 1993)

2.5.2. A citokróm oxidáz I gén (COI)

A mtDNS citokróm oxidáz gén I. alegysége néhány különleges sajátossággal rendelkezik, melyek révén alkalmas eszköze az evolúciós kutatásoknak. A citokróm oxidáz I részt vesz a membránon keresztül történő bonyolult elektrontranszportban és a hozzá kapcsolódó proton transzlokációjában. Számos különböző funkcionális tartományt tartalmaz, mint például a ligandum helyeket, a proton csatorna alkotóelemeit valamint az α -helikázt (Saraste, 1990., Gennis, 1992). Az aminosav maradványai, melyek a reakció központban erősen konzerválódtak, nem dominálnak a COI molekula központjában, lehetővé téve néhány régióban a nagymértékű variabilitást. A citokróm oxidáz I alegysége a három mtDNS-t kódoló citokróm oxidáz alegység közül az egyik legnagyobb régió (Lunt et al., 1996).

A mtDNS kutatásai alapján a COOH végen szignifikánsan több a variabilitás, mint a belső hurkokon, a külső hurkokon, a transzmembrán spirálon vagy az NH₂ végen. A mtDNS-ben található citokróm oxidáz I (COI) gén (4. ábra) központi régiójában (M5-M8) alacsonyabb szintű a szekvencia variabilitás, azonban kapcsolatot teremt számos alapvető funkcionális területtel. Nagy mennyiségű konzervatív primerrel amplifikálták az eltérő variabilitású régiókat azon célból, hogy meghatározhassák a rovarok teljes COI génjét (Saraste, 1990).



4. ábra A citokróm oxidáz I gén (Lunt et al., 1996)

2.6. Genetikai távolság vizsgálatok

A genetikai sokféleség vizsgálatához a legáltalánosabb módszer a PCR technikával történő amplifikálás, majd szekvenálást követően a szekvencia eredmények elemzése.

2.6.1. A polimeráz láncreakció (PCR)

A polimeráz láncreakció (PCR: Polymerase Chain Reaction) felfedezője Kary Banks Mullis, aki eredményéért 1993-ban kémiai Nobel-díjat kapott. Az eljárás lényege, hogy a vizsgálandó DNS szakasz szintézise lehetővé válik. A PCR elve a DNS függő DNS polimerázok aktivitásán alapul. Ez az enzim egy indító oligonukleotid, a primer segítségével képes lemásolni, és így megkettőzni az eredeti DNS szálát. A ciklusos működésnek köszönhetően az eredeti DNS molekula, a templát többszörösére felsokszorozódik. A technika létrejöttét egy termotabil DNS polimeráz, a Taq polimeráz felfedezése és az automatizált fűtőblokkok kialakítása tette lehetővé, hiszen a reakció általában 50 és 95 °C közötti hőmérsékleten zajlik le és ciklusosan ismétlődik (Dezső, 2005., Fésűs et al., 2000).

Komponensei:

- *DNS-templát:*
biológiai mintából izolált DNS, amely lehet genomiális- vagy extrakromoszomális DNS (plazmid) vagy RNS-ről reverz transzkripcióval átírt cDNS
- *Primerpár:*
a 15-30 bázispár hosszúságú egyszálú forward és a reverz primer
- *dNTP-keverék:*
a DNS lánc építő köveit (dCTP, dATP, dGTP, dTTP) tartalmazza
- *Hőstabil Taq-polimeráz*
- *Egyéb kiegészítő stabilizáló vegyszerek* (puffer, MgCl₂) (Uri et al., 2007, Dezső, 2005., Fésűs et al., 2000).

2.6.1.1. Nukleinsavak elválasztása elektroforézissel

Legáltalánosabban használt módszer a fragmentek elválasztására az agaróz gélelektroforézis. A technika egy egyszerű és gyors módszer arra, hogy a gélben lévő DNS

közvetlenül láthatóvá váljon, a DNS molekulák festhetőek Gelreddel vagy Grsafe-vel. A gélelektroforézis alapelve, hogy a töltéssel rendelkező molekulák elektromos térben, össztöltésüknek megfelelően, az ellentétes elektróda felé vándorolnak (Uri et al., 2007, Dezső, 2005., Fésűs et al., 2000).

2.6.2. Szekvenálás

A szekvenálás során a DNS lánc bázissorrendjét határozzák meg, mely alapján mutációk detektálhatók. Elvileg elegendő a kettősszalú DNS egyetlen szálának ismerete, hiszen a komplementer szekvenciája megjósolható a bázis párosodás szabályai szerint (Fésűs et al., 2000).

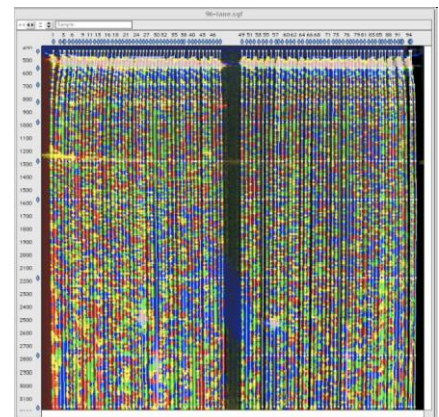
Elterjedtebb szekvenálási módok:

1. Maxam Gilbert-féle szekvenálás:

Egyszálú DNS-t adott bázisra jellemző helyen roncsolnak, a szálát elvágják, a kapott fragmentumokat láthatóvá teszik radioaktív foszfát atommal.

2. Sanger-féle szekvenálás:

A DNS kettős szálát denaturálják, majd a templát DNS szálhoz egy szálát szintetizálnak. Ezt a szintetizálást megszakítják a beépülő didezoxinukleotidok, melyek végéről hiányzik az –OH csoport, így a szintetizált láncba való beépülésük lánczáródáshoz vezet. A különböző ddNTP-eket fluoreszcens festékekkel jelölik, és lézer detektor azonosítja a bázisokat a fény hullámhossza alapján, ezáltal a radioaktív jelölés kikerülhet. Sokkal gyorsabb és biztonságosabb módszer, mint a Maxam Gilbert-féle szekvenálás (5. ábra) (Fésűs et al., 2000).



5. ábra: Sanger-féle szekvenálás eredménye

(forrás:frameworker.wordpress.com/2008/08/

2.6.3. Házi méh mitokondriális DNS vizsgálatok

Molekuláris genetikai vizsgálatok alkalmazásával 5 származási vonalat különítették el. Az európai származási vonal, „M”, melybe például az *Apis mellifera mellifera* és az *Apis mellifera*

iberica sorolható. Az afrikai származási vonalhoz, „A”, tartozik például az *Apis mellifera scutellata* és az *Apis mellifera adansonii*. A harmadik az észak mediterrán származási vonal, „C”, melyben megjelennek például az *Apis mellifera ligustica*, az *Apis mellifera carnica* illetve az *Apis mellifera macedonica* fajták. A legújabb vizsgálatok alapján további két származási vonalat mutattak be, az „O”-t, melyhez a Közel és Közép Keleti országokban megtalálható fajták csoportosíthatók és az „Y”-t, melyhez a kelet afrikai fajták, mint például az *Apis mellifera lamarckii* (Franck et al., 2001).

Az Ausztráliában lévő Tazmánia szigetállamban elvadult és domesztikált házi méhcsaládokból begyűjtésre került mintákban meghatározták a mtDNS polimorfizmusát. Ezen eredményeket az Európa területén honos referencia fajták morfológiai adataival összehasonlították. A minták közül számos hibridizáció bizonyítékaul szolgált, ugyanis a melegebb parti régiókban a két fajta könnyen kereszteződhet. A hidegebb hegyi részekben a hibridizálódás korlátozott, erősen érvényesülnek az *Apis mellifera mellifera* jellemzői (Oldroyd et al., 1995).

Az *Apis cerana* mitokondriális genomjának nem kódoló gének közötti régióját vizsgálták 110 családból származó mintánál. A nem kódoló szekvencia alapján két fő csoportot találtak. Az egyik a nyugati forma, mely Indiában, Sri Lankán és az Andaman szigeteken fordul elő, a másik a keleti forma, mely Nepálban, Thaiföldön, Malajziában, Indonéziában, Philippineken, Hong Kongban, Koreában, Japánban és Indiában. A keleti típuson belül a szekvencia variációk filogenetikai analízise alapján két jól elkülöníthető haplotípust állapítottak meg: egyik a „Sundaland” csoport, mely megtalálható Malajzia, Borneo, Java, Bali, Lombok, Timor és Flores szigeteken. A másik a Philippin csoport, mely előfordul Luzonban, Mindanaóban és Sangehen. Mindkét haplotípus jellemző Sulawesiben, mely arra utal, hogy a sziget az *A. cerana* két csoportjától függetlenül kolonizálódott (Smith-Hagen, 1996).

Az Ibériai-félszigeten tizenegy populációból gyűjtöttek mintákat és a COI-COII markert alkalmazták a vizsgálat során. Eredményeik alapján publikálták, hogy ez idáig a félszigeten nyoma sincs „afrikanizálódásnak” és a populáció nagyon hasonlít a francia méhpopulációhoz. Továbbá megállapították, hogy az Ibériai-félsziget nem átmeneti terület (Franck et al., 1998).

Ausztráliában három szigetről (Mindanao, Luzon és Palawan) valamint Visayan szigetről (Panay, Negros, Cebu és Leyte) 47 méhcsalád egyedeit vizsgálták. E területeken az *Apis cerana* őshonos fajta, melynek morfológiai adatok alapján négy változata fordul elő. Ezek a következők: az *Apis cerana cerana*, az *Apis cerana indica*, az *Apis cerana japonica* és az *Apis cerana himalaya*. Genetikai variabilitás vizsgálatot végeztek restrikciós és mitokondriális régió (tRNS^{leu}-COII) szekvencia analízise segítségével. Eredményeik alapján négy különböző haplotípust különítettek el, a Ce1, a Ce2, a Ce3 valamint a Ce4 típusokat. A Ce1 haplotípus Mindanao és a Visayan szigeteken, a Ce2 Luzonban, a Ce3 és Ce4 kizárólag Palawan területén jelent meg. A szekvenciák filogenetikai

analízise azt az eredményt nyújtotta, hogy a fajon belül jelentős a variabilitás, mely a szigetek geológiai történetével és néhány korábbi morfológiai és molekuláris genetikai tanulmány eredményével párhuzamba vonható (De la Rua et al., 2000).

Afrika területén végeztek *Apis mellifera mellifera* populációban mikroszatellit és mtDNS vizsgálatokat. A mtDNS analízisek különböző haplotípusok létét bizonyították, melyek között eddig nem közölt származási vonalak is megjelentek. Az ún. „O” és „Y” feltehetően a Közel-Keletről származtak. Ezen eredmények alapján megállapították, hogy a mitokondriális adatok önmagukban nem elegendők a házi méh populációk taxonómiai és genetikai státuszának meghatározásához (Franck et al., 2001).

A Kanári-szigeteken előforduló méhpopulációkat is megvizsgálták a mtDNS módszerével. A filogenetikai analízis megmutatta, hogy jellemzően két haplotípus fordul elő nagy gyakorisággal. A kanári-szigeteki házi méh különbözik más származási vonalaktól, illetve genetikailag bizonyított a populációk afrikai származása (De la Rua et al., 2001).

Szlovén házi méh minták vizsgálata alapján arra a következtetésre jutottak Susnik et al. (2004), hogy a megfigyelt méhcsaládokban a genetikai különbség alacsony mértékű a mtDNS COI-COII régiója alapján. Felfedeztek egy új mitokondriális haplotípust, melyet C2C-nek neveztek el. Hasonló haplotípust detektáltak horvát, néhány német és cseh mintákban. Az *Apis mellifera macedonica* populációban nagy genetikai változatosságot igazoltak, ami egy új haplotípus elkülönítését tette lehetővé (C2D).

Tíz ismert házi méh fajban két különböző régiót (ND2 mitokondriális gén és EF1- α intron) amplifikáltak, klónoztak majd szekvenáltak. A méheket természetes elterjedési területükön gyűjtötték. A mtDNS szekvenciákat parsimony-, távolság- és maximum likelihood módszerrel analizálták, mely alapján az *Apis* nemzetségen belül a filogenetikai rokonság megállapításra került. A származási analízis alátámasztotta a korábbi morfológiai vizsgálatokat és három fő klaszterre osztotta: óriás méhek (*A. dorsata*, *A. binghami* és *A. laboriosa*), törpe méhek (*A. adeniformis* és *A. florea*) és üregben fészkelő méhek (*A. mellifera*, *A. cerana*, *A. koschevnikovi*, *A. nuluensis* és *A. nigrocincta*). Mitokondriális gének alapján a három fő klaszterbe sorolt csoport között a szekvencia különbség közel 18%, míg az intronban 10-15 % (Arias-Sheppard, 2004).

Görögországban és Cipruson RFLP technikán alapuló mtDNS génszegmensek alapján állapították meg a filogenetikai kapcsolatot házi méh populációk között. Elkülönítették azon enzimeket, melyek egyenként ismerik fel a 16s rRNS, COI és ND5 régiókat. Eredményeik alapján hét haplotípust állapítottak meg, és az *Apis mellifera macedonica* fajtát megkülönböztették a populációk eltérő fajtáitól (Bouga et al., 2005).

A COI régióban Hinfl emésztéssel kimutatták, hogy az *Apis mellifera lamarckii* a Franck et al. (2001) által felfedezett „O” származási vonalba sorolható (Kandemir, 2006).

Új haplotípusokat azonosítottak a Törökországban előforduló házi méh populációkban is mtDNS vizsgálattal. Restrikciós enzim polimorfizmus vizsgálat kimutatta, hogy a török méhpopulációk az észak mediterrán és a kelet-közép európai származási vonalba tartoznak. A felfedezett haplotípusok közül hármat Törökországban azonosítottak (Özdil et al., 2009).

Tizenöt különböző törökországi *Apis mellifera* méhpopulációt vizsgáltak meg a mtDNS egyik legvariabilisabb régiójában, a citokróm oxidáz I (COI) szegmensben. A kapott haplotípusokat a GenBank-ban található minták szekvenciájával hasonlították össze. Az eredmények alapján készített filogenetikai fán a kelet európai fajták egy haplotípusba sorolhatók, az olasz és néhány görög házi méh fajta hasonlóan egy haplocsoportot alkot. A publikáció a mitokondriális genom COI régiójának részletesebb megismerését teszi lehetővé. A régió alkalmazásával átfogó képet kaptak a Törökországban előforduló haplotípusokról (Özdil-Ilhan, 2012).

2001-ben La Palma szigetén (Kanári-szigetek) törvény született a honos házi méh megőrzése céljából. A törvény az idegen honos fajták behurcolását tiltotta. Az *Apis mellifera* populációk genetikai diverzitását mtDNS (COII és a tRNS^{leu} régiók) és nukleáris DNS (öt mikorszatellit marker) segítségével vizsgálták. Választ kerestek arra a kérdésre, hogy a területen található házi méh fajta genetikailag homogén maradt-e a törvény bevezetése után. Két felmérés alapján (1998 és 2006) vizsgálták a genetikai állomány esetleges változását. Az eredmények szerint a mtDNS variabilitása jelentősen megváltozott a területen a törvény bevezetését követően, azonban nukleáris szinten nem tudták bizonyítani e tényt (Munoz-De la Rua, 2012).

3. Anyag és módszer

3.1. Mintavétel

A magyar minták begyűjtése előzetes telefon egyeztetés után, a 2009-2010-es évben, míg a külföldi minták gyűjtése 2011-2012-ben történt. Hat méhészetből, méhészetenként négy családból, családonként egy-egy 5-7 napos dolgozó álca került begyűjtésre, melyeket eppendorf csövekbe helyeztünk, és 4 °C-on hűtve tároltunk a genomiális DNS kivonásáig.

A minták begyűjtése a következő helyekről történt:

- Budapest
- Dinnyeberki
- Fertőszentmiklós
- Kiskunfélegyháza
- Nyírcsaholy
- Perkupa

További mintákat kaptunk különböző külföldi méhészetektől illetve egy magyar méhészettől, mely Buckfast vonalat tart, melyeket kontroll mintaként használtunk fel:

- Bialowieza /Lengyelország/
- Krakkó /Lengyelország/
- Wrocław /Lengyelország/
- Bydgoszcz /Lengyelország/
- Jiblo /Libéria/
- Hajdúvid /Magyarország/
- Bologna /Olaszország/
- Galícia /Spanyolország/
- Cantabria /Spanyolország/
- Murcia /Spanyolország/
- Navarra /Spanyolország/

3.2. Genomiális DNS izolálás

Az 5-7 napos álcákból vontuk ki a genomiális DNS-t Latorre módszere alapján (Latorre et al., 1986). Az izolált DNS-t -20°C -on tároltuk a további felhasználásig.

3.3. Primertervezés

Primer 3 programot használva a mtDNS két régiójába (COI és a 16s rRNS régiókba) terveztünk primereket.

3.4. Polimeráz láncreakció (PCR)

Az amplifikálást a Debreceni Egyetem Állatgenetika Laboratóriumában végeztük az Applied Biosystems gép segítségével. A PCR módszer során használatos primer szekvenciáját a 2. táblázat mutatja be.

PCR reakcióelegy 10 μl reakció közegben:

- desztillált víz
- 10 X puffer /Applied Biosystem/
- 3 mM MgCl_2 (25mM) /Promega/
- 200 μM dNTP mix (2 mM) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) /Fermentas/
- 0,75 U GoTaq enzim (5U/ μl) /Flexi Buffer/
- 20 μM genomiális DNS
- 1 pmol/ μl reverse primer (10pmol/ μl) /SIGMA/
- 1 pmol/ μl forward primer (10pmol/ μl) /SIGMA/

2. táblázat: A PCR analízis során alkalmazott primer jellemzői

Primer	Forward primer szekvencia (5'-3')	Reverse primer szekvencia (5'-3')	Amplifikált termék hossza (bp)	Feltapadási hőmérséklet (°C)
COI	CTGATATAGCATTCCCCC GAATA	AGAATTGGATCTCCACC TCCTA	421	63

A PCR reakció körülmények a következők voltak:

92 °C	2:00 perc	}	35 X
92 °C	0:30 másodperc		
63 °C	0:30 másodperc		
63 °C	2:00 perc		
63 °C	10:00 perc		
10 °C	∞		

A PCR reakcióhoz szükséges vegyszerekkel és körülményekkel amplifikált terméket állítottunk elő a genomiális DNS-eket használva.

3.5. Nukleinsavak elválasztása elektroforézissel

Az amplifikált terméket ellenőrzés céljából agaróz gélen 30 percig futtattuk 100 V-os feszültségen, majd UV fény alatt tettük láthatóvá.

Az elektroforézishez szükséges vegyszerek:

- 2 %-os Seakem agaróz
- 1 X TAE puffer
- 0,5 mg/ml Gelred vagy Grsafe

3.6. A minták szekvenáláshoz való előkészítése

A PCR termékek tisztítása szekvenáláshoz Viogene DNA/RNA Extraction (PCR-M Clean up System) kittel történt. A kithoz tartozó felhasználási útmutatót követtük minden lépésnél.

A tisztított PCR termék koncentrációját NanoDrop készülékkel mértük le. A Eurofins MWG Operon cég szekvenáláshoz szükséges követelményének megfelelő mennyiséget szárítottunk be minden mintából, majd Németországba postáztuk a primerrel (2 pmol/μl) együtt.

3.7. Szekvenciák elemzése

A szekvenálás elvégzése után elektronikus formában megkaptuk a beküldött mintáink szekvenciáit, majd a leolvasott nukleotidok helyességét a BioEdit programmal ellenőriztük.

Ezt követően ClustalW programmal összehasonlítottuk a szekvenciákat, majd mentettük a kapott fület.

A statisztikai értékelések során a MEGA (Tamura et al., 2007), DnaSp 4.50.2 (Rozas et al., 2003) és a Network version 4.6.0.0. (Bandelt et al., 1999) programcsomagokat használtuk.

4. Eredmények

A rendelkezésünkre bocsátott minták 7 hazai és 10 külföldi méhészetből származtak, melyek laboratóriumi vizsgálatát a Debreceni Egyetem Állatgenetika Laboratóriumában végeztük el.

4.1. Primertervezés

A teljes mitokondriális genomból régiókat jelöltünk ki variabilitásuk szerint. A két kiválasztott régió a COI és a 16s rRNS szakaszok voltak, melyek egyes szakaszaira 1-1 primerpárt terveztünk a Primer 3 tervező program segítségével. A program használatánál az általános primerekkel szemben támasztott követelményeket vettük alapul:

- a választott minimum szekvencia hossz értéke 300-400 bp
- az optimális GC%-os aránya 55% volt
- a 3' végen nagyfokú legyen a cél DNS szekvenciával való komplementaritás
- a primerpár tagjai ne legyenek egymással komplementerek és a Tm értékük közel essen egymáshoz

A különböző színekkel jelölt tervezett primerpárok pozíciói a 6. ábrán láthatóak:

- **COI:**

forward primer: CTGATATAGCATTCCCCGAATA

reverz primer: AGAATTGGATCTCCACCTCCT

Az amplifikált termék hossza: 421 bp

- **16s rRNS:**

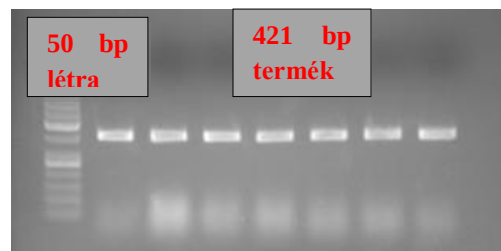
forward primer: ACATCGAGGTCGCAACATC

reverz primer TTAGGTCGATCTGCTCAATGAA

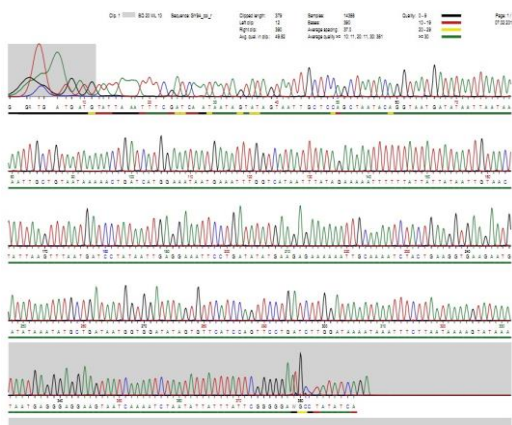
Az amplifikált termék hossza: 425 bp

[illegible]

Majd a mintákat újra ellenőriztük 2%-os agaróz gélen (7. ábra) és lemértük a koncentrációjukat NanoDrop készülék segítségével. Az eredményekből meghatároztuk a koncentráció alapján a szekvenálást elvégző cég számára kellő mennyiséget.



7. ábra: Tisztított PCR



8. ábra: Egy (nyírcsaholyi) minta szekvenciája

A kért mennyiség beszárlását követően postáztuk a mintáinkat a német Eurofins MWG Operon cégnek, a COI reverz primerrel együtt.

A 8. ábrán a cég által küldött nyírcsaholyi minta értékelhető szekvenciája tekinthető meg.

A kapott szekvenciákat ClustalW számítógépes programmal egymás alá rendeztük. E program segítségével egy mutációt detektáltunk a magyar méhészetek között, mely a nyírcsaholyi 2B mintában jelent meg. A 9. ábrán ezt a mutációt jelöljük meg.

Fertoszentmiklos2B	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	289
Fertoszentmiklos2C	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	289
Kiskunfelegyhaza5A	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	290
Fertoszentmiklos10A	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	294
Fertoszentmiklos3A	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	294
Kiskunfelegyhaza5B	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	294
Perkupa2B	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	294
NYírcsaholy2B	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	295
Budapest9B	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	295
Budapest9C	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	295
Budapest9A	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	295
Budapest2B	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	295
Perkupa6B	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	295
Perkupa2C	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	295
Perkupa2A	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	295
NYírcsaholy9A	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	295
NYírcsaholy2C	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	295
NYírcsaholy2A	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	295
Kiskunfelegyhaza5C	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	295
Kiskunfelegyhaza4B	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	295
Dinnyeberki9A	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	295
Dinnyeberki3B	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	295
Dinnyeberki2A	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	295
Dinnyeberki1C	GTGGATATACTGTTTCATCCAGTTCCTGGTCTTGGATAAAATAAAATTTCTTAATAAAAAGTA	295

9. ábra: A ClustalW programmal kapott egymás alá rendezett szekvenciák egy részének bemutatása

4.4. Genetikai diverzitásmutatók

A magyar méhészetek és az országok közötti különböző diverzitás értékeket, a haplotípus, a variabilis pozíciók számát, a nukleotid gyakoriság, valamint az In/Del pozíciók értékeit a 3. táblázatban foglaltuk össze.

3. táblázat: A vizsgálati minta mtDNS szekvenciáinak statisztikai alapadatai (n=24 és n=32):

	magyar méhészetek között (n=24)	országok között (n=32)
variabilis pozíciók száma:	1	14
összes mutáció száma:	1	14
haplotípusok száma (h):	2	10
haplotípusok diverzitás értéke (Hd):	0,071±0,065	0,534±0,079
nukleotid diverzitás (Pi):	0,000±0,000	0,006±0,001
In/Del pozíció:	0	0

A vizsgált összes mintában 10 haplotípust különítettünk el és 14 variabilis pozíciót találtunk. A haplotípus és nukleotid diverzitás értékek igen alacsonyak voltak: Hd: 0,534±0,079; Pi: 0,006±0,001.

A magyar mintákban két haplotípust detektáltunk, melyeknek nagyon alacsony a genetikai variabilitása: Hd: 0,071±0,065, és a nukleotid diverzitás: Pi: 0,000±0,000.

Az országok méhmintáinak szekvenciáiban inszerciót és deléciót nem találtunk.

A genetikai távolság értékeket a 4. és 5. táblázatban láthatók az egyes országok és csak a magyar méhészetek között.

4. táblázat: Genetikai távolság értékek országok között (*Jelmagyarázat: [1] Magyarország, [2] Olaszország, [3] Lengyelország, [4] Afrika (Libéria), [5] Spanyolország*):

	1	2	3	4	5
1	0	0.000	0.002	0.005	0.004
2	0.000	0	0.002	0.005	0.004
3	0.007	0.007	0	0.005	0.003
4	0.011	0.011	0.015	0	0.004
5	0.011	0.010	0.010	0.013	0

Az országoként csoportosított méhészetek egymástól számított genetikai távolsága (átló feletti érték) és az ezekhez tartozó p értékek (átló alatti érték) láthatók a 4. táblázatban ($p < 0,05$).

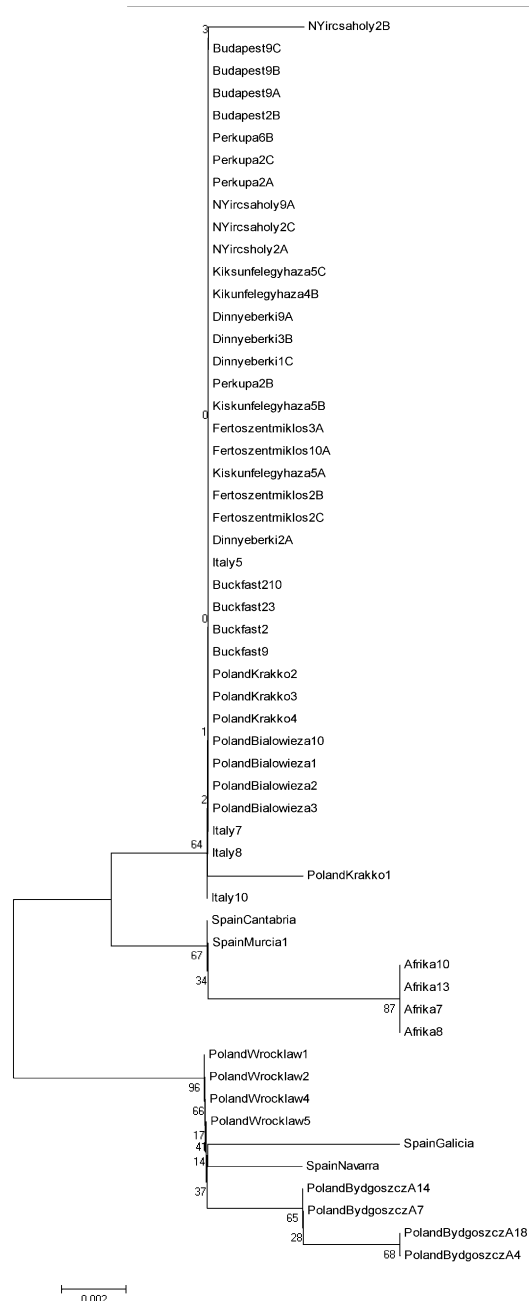
Az afrikai minták a vártakkal összhangban jelentős genetikai távolságban vannak a magyar mintáktól, melyet a táblázatban megjelölt értékek alátámasztanak. Továbbá látható, hogy a spanyolországi minták is jól elkülönülnek a magyar mintáktól, melynek oka, a fajta különbözősége és a jelentős földrajzi távolság. Genetikailag a magyarországi méhpopulációhoz az olasz és lengyel méhcsaládok állnak legközelebb.

5. táblázat: Genetikai távolság értékek magyar méhészetek között (*Jelmagyarázat: [1] Fertőszentmiklós, [2] Dinnyeberki, [3] Kiskunfélegyháza, [4] Nyírcsaholy, [5] Perkupa, [6] Budapest*):

	1	2	3	4	5	6
1						
2	0.000					
3	0.000	0.000				
4	0.001	0.001	0.001			
5	0.000	0.000	0.000	0.001		
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	

Az 5. táblázatban a magyar méhészetek közötti genetikai távolságot mutatjuk be. Minden esetben szignifikáns értéket kaptunk ($p < 0,05$). A genetikai távolság értékek a legtöbb esetben 0,000, mely arra utal, hogy az egyes méhészetek általunk vizsgált egyedei igen kis genetikai távolságban vannak egymással. A távolsági értékekben is megmutatkozik a nyírcsaholyi méhészetben detektált mutáció (pirossal jelölt, 5. táblázat). A földrajzi távolság ellenére a magyar minták genetikai állománya igen hasonló.

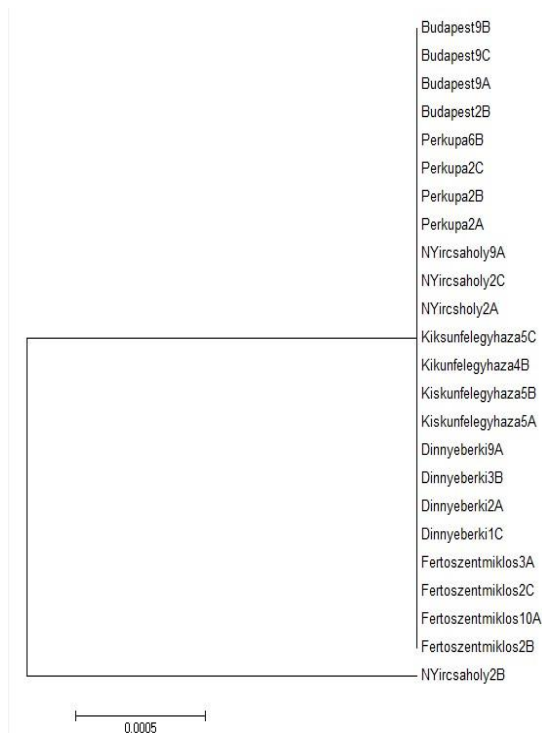
A vizsgált állományok genetikai kapcsolatát Neighbor-Joining klaszterező módszer alapján szerkesztett filogenetikai fákön mutatjuk be (10. és 11. ábra).



10. ábra: Neighbor-Joining módszer alapján szerkesztett filogenetikai fa a különböző országokból származó méhészetekkel

A 10. ábra az országok közötti méhcsaládok elkülönülését szemlélteti. A törzsfá elemzésekor látható, hogy a minták két fő ágba csoportosulnak. Az egyik fő egyik ágán az összes magyar méhészet, Buckfast méhek, olasz (*Apis mellifera ligustica*) és a lengyel bialowiezai (*Apis mellifera mellifera*) és krakkói (*Apis mellifera carnica*) minták tartoznak. A másik ágon két spanyol (*Apis mellifera iberica*) és a vizsgált afrikai minták (*Apis mellifera adansonii*) találhatóak. A fa másik fő ágán két lengyelországi mintavételi hely egyedei (*Apis mellifera mellifera*) és két spanyol minta (*Apis mellifera iberica*) található.

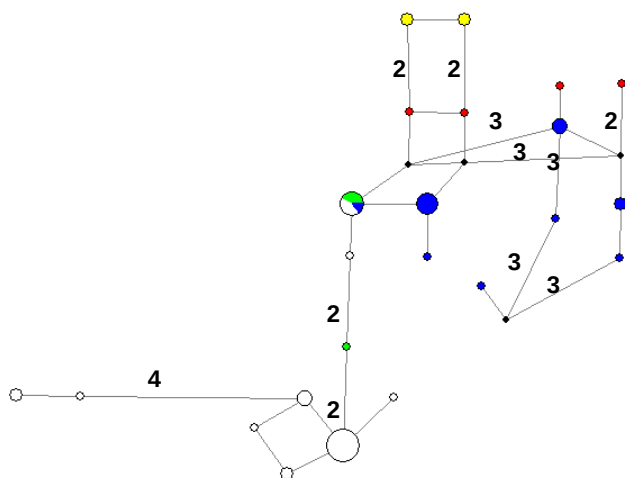
A Buckfast méh egy hibrid melyet vonalként is említene. 1916-ban több fajta *A. m. ligustica* (olasz fajta), *A. m. mellifera* (Angliából származó sötét méh), *A. m. mellifera* (Franciaországból származó sötét méh), *A. m. anatolica* (török fajta) és az *A. m. cecropia* (görög fajta) keresztezésével hozta létre elsőként Adam testvér az angliai Buckfast kolostorban (Internet 5).



A 11. ábrán csak a magyar méhészeteket vizsgálva, jól látszik, hogy a filogenetikai fán újra két ág különböztethető meg. Az egyikén csak az önálló haplotípust is alkotó nyírcsaholyi egyed, míg a másik ágon az összes többi magyar egyed található.

11. ábra: Neighbor-Joining módszer alapján szerkesztett filogenetikai fa magyar méhészetek között

A Network median joining analízissel készített ábrán is a vizsgált egyedek haplotípusait és azok országokénti megoszlását mutatjuk be



12. ábra: Network analízissel készített filogenetikai fa országok közötti méhészeteknél
(*jelmagyarázat*: fehér: Magyarország, sárga: Afrika, piros: Spanyolország, zöld: Olaszország, kék: Lengyelország)

azok országokénti megoszlását mutatjuk be (12. ábra). A különböző színek az országokat, a körök mérete az egyedek számát, a számok a mutációk számát jelölik. Az Afrikából (sárga) és Spanyolországból (piros) származó egyedek láthatóan jól elkülönülnek a Magyarországról (üres) gyűjtött egyedektől. A többféle színnel jelölt kör jelöli, hogy az adott haplotípusban a magyar karnika fajta mellett az olasz (kék) (*Apis mellifera ligustica*), és lengyel (zöld) (*Apis mellifera mellifera*) fajta is megjelenik, mely összhangban van a Neighbour-Joining módszerrel szerkesztett filogenetikai fa eredményével.

5. Következtetések és javaslatok

A teljes mtDNS vizsgálata és szakaszainak amplifikálása PCR segítségével ismert és alapvető technika a házi méhek származási vonalainak illetve fajtáinak megkülönböztetésére.

Eredményeink alapján azt kaptuk, hogy a magyarországi házi méh populációban az általunk vizsgált egyedek alapján más fajták jelenléte is megfigyelhető, mint a Lengyelországban, Bialowieza környékén honos *Apis mellifera mellifera*, Krakkó környékén előforduló *Apis mellifera carnica* és az Olaszországban jellemző *Apis mellifera ligustica* fajták. A vizsgálatba vont kontroll minták közül az afrikai és spanyol minták várhatóan jól elkülönültek a magyar populációktól. Igazoltuk hipotézisünket, miszerint a határ menti területekről beáramló fajták miatt a magyar állomány fokozottan kitett a génszennyezésnek.

Mindezek alapján a krajnai fajta homogenitásának fenntartása céljából, a természetvédelmi célokkal összhangban javasoljuk a mesterséges termékenyítés országos szintű alkalmazását, ezáltal fajtatiszta méhanyákkal történő szaporítást. A hazánk jellegzetes ökológiai viszonyaihoz alkalmazkodott krajnai fajta megőrzése az egész méhészeti társadalomnak közös érdeke, ezért javasoljuk az importból származó méhanyák ellenőrzésének szigorítását. Továbbá szorgalmazzuk a méhészeknek a méhanyák hivatalos méhanya nevelőktől történő vásárlását.

Az importált fajták beáramlásának megakadályozása korlátozott, ám a mesterséges termékenyítés a fajtatisztság megőrzésének hatékony módszere lehet.

Kutatásaink további céljai között szerepel annak kimutatása, hogy az elemszám növelésével és több méhészet bevonásával eredményeink eltérést mutatnak-e.

6. Összefoglalás

A méhek az emberiség számára és az ökoszisztémában egy rendkívül fontos szerepet töltenek be. Alapvető fontosságúak az egyre inkább növekedő élelemszükséglet miatt, a beporzás legnagyobb hányadát végzik a rovarok között illetve természetes édesítőszerként biztosítanak számunkra. Magyarország őshonos méhfajtája a krajnai méh (*Apis mellifera carnica*), mely fajnak elterjedési területe Ausztria, Szlovénia, Horvátország, Bosznia-Hercegovina, Albánia, Szerbia, Magyarország és Románia. Az alpesi, a pannon és a földközi-tengeri zónákon nyugat-keleti irányba terjednek. Az intenzív tenyésztés, a migrációs méhészet illetve a hibridizáció lehetősége okozhatott változást a krajnai méh genetikai állományában.

Választ szeretnénk volna kapni arra a kérdésre, hogy a hazánkban élő krajnai méh fajta genetikailag mennyire egységes és mennyire különül el az *Apis* nemzetségbe sorolt más fajtáktól.

Mitokondriális DNS (mtDNS) vizsgálattal elemeztük a házi méh (*Apis mellifera*) genetikai struktúráját, összesen 56 egyed bevonásával. A minták 7 magyar méhészetből (Budapest, Dinnyeberki, Fertőszentmiklós, Kiskunfélegyháza, Nyírcsaholy, Perkupa, Hajdúvid) és 10 külföldi méhészetből (Bialowieza, Krakkó, Wrocław, Bydgoszcz, Bologna, Galizia, Cantabria, Murcia, Navarra, Jibloo) lettek begyűjtve, méhészetenként 4 családból, családonként egy-egy 5-7 napos dolgozó álca vizsgálatával.

A mtDNS egyik legvariabilisabb -citokróom oxidáz I- régióját választottuk ki, melynek 426 bp hosszúságú részét elemeztük. A vizsgált összes mintában 10 haplotípust találtunk 14 variábilis pozícióval, a haplotípus és nukleotid diverzitás értékek alacsonyak voltak: Hd: $0,534 \pm 0,079$; Pi: $0,006 \pm 0,001$. A magyar minták 2 haplotípusba tartoznak és nagyon alacsony genetikai variabilitás jellemzi őket ($0,071 \pm 0,065$). A nukleotid diverzitás $0,000 \pm 0,000$. Az előbb említett mutatókon kívül az állományok közötti genetikai elkülönülés hiányát bizonyítja a Neighbor-Joining modell és a Network median-joining alapján szerkesztett filogenetikai fa is.

Összességében megállapíthatjuk, hogy a Magyarországon található krajnai méh populációk még genetikailag egységesek. Az általunk vizsgált mintákban idegen hatás nem vagy csak csekély mértékben jellemző.

Szakirodalmi jegyzék

- ARIAS, M. C.-SHEPPARD, W. S. (2004): Phylogenetic relationships of honey bees (*Hymenoptera: Apinae: Apini*) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *Mol. Evol.* 37, 25-35. p.
- AVISE, J. C. (1994): *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. New York Chapman and Hall.
- BANDELT, H. J., FORSTER, P., RÖHL, A., (1999): Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16:37-48.
- BOUGA, M., HARIZANIS, P. C., KILIAS, G., ALAHOTIS, S. (2005): Genetic divergence and phylogenetic relationships of honey bee *Apis mellifera* (*Hymenoptera: Apidae*) populations from Greece and Cyprus using PCR-RFLP analysis of three mtDNA segments. *Apid.* 36, 335-344. p.
- BROWN, W. M., GEORGE, M. J., WILSON, A. C. (1979): Rapid evolution of animal mitochondrial DNA., *PNAS* 76: 1967-1971.
- CARRECK, N. L. (2008): Are honey bees (*Apis mellifera* L.) native to the British Isles? *J. Apic. Res.* 47, 318–322.
- CLARY, D. O.–WOLSTENHOLME D. R. (1987): Drosophila mitochondrial DNA: conserved sequenced in the A+T-rich region and supporting evidence for a secondary structure model of the small ribosomal RNA. *J. Mol. Evol.* 25: 116-125.
- CORNUET, J. M., GARNERY, L., SOLIGNAC, M. (1991): Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. *G.* 128: 393-403.
- CROZIER, R. H.-CROZIER, Y. C. (1993): The Mitochondrial Genome of the Honeybee *Apis mellifera*: Complete Sequence and Genome Organization *Gen.* 97-117.
- DALL'OLIO, R., MARINO, A., LODESANI, M., MORITZ, R.F.A. (2007): Genetic characterization of Italian honeybees, *Apis mellifera ligustica*, based on microsatellite DNA polymorphisms, *Apid.* 38, 207–217.
- DE LA RUA, P., SIMON, U. E., TILDES, A. C., MORITZ, R. F. A., FUCHS, S. (2000): MtDNA variation in *Apis cerana* populations from the Philippines. *Heredity.* 84: 124-130. p.

- DE LA RUA, P., GALIÁN, J., SERRANO, J., MORITZ, R. F. A. (2001): Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands. *Mol. Ecol.* 10, 1733-1742. p.
- DEZSŐ, P.-NAGY, J. (2005): A polimeráz láncreakció (PCR) és a gyógyszerkutatási alkalmazásai 111 évfolyam, 4. szám.
- FÉSŰS, L., KOMLÓSI, I., VARGA, L., ZSOLNAY, A. (2000): Molekuláris genetikai módszerek alkalmazása az állattenyésztésben. Bp. AGROINFORM Kiadó és Nyomda Kft., 12-51.p.
- FRANCK, P., GARNERY, L., SOLIGNAC, M., CORNUET, J. M. (1998): The origin of the west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evol.* 52,4. 1119-1134. p.
- FRANCK, P., GARNERY, L., CELEBRANO, G., SOLIGNAC, M., CORNUET, J. M. (2000): Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*), *Mol. Ecol.* 9, 907–921.
- FRANCK, P., GARNERY, L., CELEBRANO, G., SOLIGNAC, M., CORNUET, J.M. (2001): Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*), *Mol. Ecol.* 9, 907–921.
- GENNIS, R. B. (1992): Site-directed mutagenesis studies on subunit I of the aa3-type cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*: a brief review of progress to date. *Bioch. Bioph. Act.* 1101: 184-187.
- HALMÁGYI, L.-KERESZTESI, B. (1991): A méhlegelő Budapest 11-15.
- JENSEN, A. B.-PEDERSEN B. V. (2005): Honeybee Conservation: a case story from Læsø island, Denmark, in: Lodesani M., Costa C. (Eds.), *Beekeeping and conserving biodiversity of honeybee. Sustainable bee breeding. Theoretical and practical guide.* Northern Bee Books, Hebden Bridge, pp. 142–164.
- JOHNSTON, J. (2011): How important are Honey Bees? <http://www.the9billion.com/2011/02/10/how-important-are-honey-bees-was-fake-einstein-right/>
- KANDEMIR, I., PINTO, A. M., MEIXNER, D. M., SHEPPARD, S. W. (2006): Hinf-I digestion of cytochrome oxidase I region is not a diagnostic test for *A. m. lamarckii* Gen. and Molecular Biology, 29, 4, 747-749.
- KOCHER, T. D., THOMAS W. K., MEYER, A., EDWARDS, S. V., PÄÄBO, S., VILLABLANCA, F. X. - A. C. (1989): Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *USA.* (16): 6196-200.

- KOTICS, J. (2002): Parasztgazdaság modernizáció A méhészet szerepe a paraszti gazdálkodás rendszerében Debrecen 19-24; 24-45.
- KOZMUS, P., JEVROSIMA, S., STANIMIROVIC, Z., STOJIC, V., KULISIC, Z., MEGLIC, V. (2007): Analysis of mitochondrial DNA in honey bees (*Apis mellifera*) from Serbia, Acta Vet. Beograd 57, 465–476.
- LAMPEITL, F. (2004): Méhészkedés Budapest HOGYF EDITIO 35-38; 80-82.
- LATORRE, A., MOYA, A., AYALA, F. J. (1986): Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83. 8649-8653. p.
- LUNT, D. H., ZHANG, D.-X., SZYMURA, J. M., HEWITT, G. M. (1996): The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies Ins. Mol. Biol. 5(3), 153-165.
- MÁRTON, A. (2010): Méhészet Budapest Szaktudás Kiadó Ház
- MÁTRAY, E. (2002): Gazdasági állataink-Fajtatan Méh 37-55.
- MÁTRAY, E. – SZÉL, ZS. (2000): Magyarországi méhlegelők Szolnok Apinform Kft. 68-70.
- MUNOZ, I. - DE LA RUA, P. (2012): Temporal analysis of the Genetic diversity In a honey Bee mating area of an Island population (La Palma, Canary Islands, Spain) Vol. 56 No. 1 Journal of Apicultural Science 41-49.
- NATHAN, M. S., SHEPPARD, W. S. (1995): Southeastern United States honey bee. J. Econ. Entomol. 88(5), 1216-1220. p.
- OLDROYD, B. P., CORNUET, J. M., ROWE, D., RINDERER, T. E., CROZIER, R. H. (1995): Racial admixture of *Apis mellifera* in Tasmania, Australia: similarities and differences with natural hybrid zones in Europe. Heredity. 74. 315-325. p.
- OMLAND, K. E. (1997): Correlated rates of molecular and morphological evolution. Evol. 51(5): 1381-1393.
- ÖZDİL, F., YILDIZ, A. M., HALL, G. H. (2009): Molecular characterization of Turkish honey bee populations (*Apis mellifera*) inferred from mitochondrial DNA RFLP and sequence results Apid. 40 570-576.
- ÖZDİL, F.-İLHAN, F. (2012): Phylogenetic relationship of Turkish *Apis mellifera* subspecies based on sequencing of mitochondrial cytochrome C oxidase I region

- DE LA RUA, P., JAFFE, R., DALL'OLIO R., MUNOZ, I., SERRANO, J. (2009): Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees 263-284 p.
- PRIGLI, M. (2000): Méhélettani ismeretek Szolnok 75 p.
- RÉVAY, T., TÖRÖK, É., BODZSÁR, N., ZAJÁCS, E., BÉKÉSI, L., MÁTRAY, SZ. E., HIDAS, A. (2008): Méhcsaládok diverzitása fajtajelleg bélyegek és RAPD markerek alapján Gödöllő, Méhészet
- ROZAS, J., SA'NCHEZ-DELBARRIO, J. C., MESSEGUER, X., ROZAS, R. (2003): DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinf. 19: 2496–2497
- RUTTNER, F. (1988): Biogeography and Taxonomy of Honeybees, Springer Verlag, Berlin.
- SARASTE, M. (1990): Structural features of cytochrome oxidase. Q Rev. Biophys 23: 331-366.
- SCHEFFLER, I. E. (1999) Mitochondria. New York: John Wiley & Sons In
- SHAO, R., NICK, J. H., CAMPBELL, EVAN, R., SCHMITT., STEPHEN, C. B. (2001): Letter to the Editor Increased Rate of Gene Rearrangement in the Mitochondrial Genomes of Three Orders of Hemipteroid Insects 1828-1832.
- SMITH, D. R.-HAGEN, R. H. (1996): The biogeography of *Apis cerana* as revealed by mitochondrial DNA sequence data. Journal of the Kansas Entomological Society. 69 (4) 294-310. p.
- SUSNIK, S., KOZMUS, P., POKLUKAR, J., MEGLIC, V. (2004): Molecular characterization of indigenous *Apis mellifera carnica* in Slovenia. Apid. 35, 623-636. p.
- SZALAI, T. (2001): Hol tart a magyar bioméhészet? Biokultúra XII. évfolyam 6. szám
- SZALAY, T. (2008): Gondok a méhészetben
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M., KUMAR, S. (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24: 1596-1599.
- URI, CS., PROKISCH J., SÁNDOR, E., GYŐRI, Z. (2007): Növényi minták GMO-tartalmának kvalitatív meghatározása Agrártudományi Közlemények 26. szám
- VICZE, E. (1997): Tanuljunk méhészkedni Magyar Méhészek Egyesülete 8-10; 32-33; 49-52; 86-87.
- WHITFIELD, C. W., BEHURA, S. K., BERLOCHER, S. H., CLARK, A. G., JOHNSTON, J. S., SHEPPARD, W. S., SMITH, D. R., SUAREZ, A. V., WEAVER, D., TSUTSUI, N. D. (2006): Thrice out of Africa: Ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*, Science 314, 642–645.
- WOLSTENHOLME, D. R. (1992): Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. Int. Rev. Cytol. 141.

YUKUHIRO, K., SEZUTSU, H., ITOH, M., SHIMIZU, K., BANNO, Y. (2002): Significant Levels of Sequence Divergence and Gene Rearrangements have Occurred Between the Mitochondrial Genomes of the Wild Mulberry Silkmoth, *Bombyx mandarina*, and its Close Relative, the Domesticated Silkmoth, *Bombyx mori*

Internetes hivatkozások:

INTERNET 1.: <http://www.lepesmez.com/mezfajta.htm>

INTERNET 2.: <http://www.biolib.cz/en/taxonimage/id108440/> (1. kép)

INTERNET 3.: <http://www.biolib.cz/en/taxonimage/id108440/> (2. kép)

INTERNET 4.: <http://www.dave-cushman.net/bee/textlinks.html> (3. kép)

INTERNET 5.: http://en.wikipedia.org/wiki/Buckfast_bee

MAGYAR MÉHÉSZETI NEMZETI PROGRAM (2010):

http://www.kormany.hu/download/9/e5/70000/MR_2010_047_%28XII_31%29_VMrendelet.pdf

SEMMELWEIS EGYETEM ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR (SEÁOK): Igazságügyi és Biztosítás- orvostani Intézet: <http://igor.diogenes.hu/laborok/dns/vizsgalatrol>

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Kusza Szilviának, hogy értékes, minőségi és sokoldalú szakmai segítséget nyújtott.

Köszönetet mondok Zakar Erikának az alkalmazott molekuláris módszerek elsajátításában nyújtott segítségéért, a türelméért és hogy munkám során mindvégig támogatott.

Köszönöm Dr. Oláh Jánosnak a nyírcsaholyi minták begyűjtését és minden méhésznek a minták rendelkezésemre bocsátását.

Külön köszönöm az Állatgenetika Laboratórium összes dolgozójának a segítőkészségüket és a kitartó türelmüket.

Köszönöm a Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar/Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet, Állatgenetikai Laboratóriumnak, hogy lehetővé tette számomra a laboreshozók használatát.

A dolgozat a TÁMOP-4.2.2/b-10/1-2010-0024 azonosító számú „A Debreceni Egyetem tudományos képzési műhelyeinek támogatása” című pályázat keretein belül készült.

Nyilatkozat

Tóth Bianka Mónika büntetőjogi és fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem és aláírással igazolom, hogy a diplomadolgozat saját munkám eredménye. A felhasznált irodalmat korrekt módon kezeltem, a diplomamunkára vonatkozó jogszabályokat betartottam.

.....
Aláírás

Születési idő: 1988.12.24.