

SZAKDOLGOZAT

Bakonyi Réka
2017

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Ökológia Tanszék

A HÁZI MÉH (*Apis mellifera*) VARROA SZENZITÍV HIGIÉNIKUS VISELKEDÉSÉHEZ
KAPCSOLT DNS MARKEREK FEJLESZTÉSE GENOMIKAI ADATOK ALAPJÁN

Készítette:
Bakonyi Réka

Témavezető:
Dr. Stéger Viktor
tudományos főmunkatárs
Nemzeti Agrárkutatói és Innovációs Központ,
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet

Belső Konzulens:
Dr. Pásztory-Kovács Szilvia
tudományos munkatárs
Állatorvostudományi Egyetem,
Biológiai Intézet

Budapest, 2017

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
1.1. Bevezető	5
1.2. Házi méh genom program	6
1.3. A házi méh klasszikus genetikája	6
1.4. A méhek Varroa atka szenzitív higiénikus viselkedése	7
1.6. A genetikai vizsgálatokhoz használt STR markerek	10
2. CÉLKITŰZÉS	11
2.1. A csoport célkitűzései	11
2.2. A saját feladataim	11
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	12
3.1. Méh minták	12
3.2. DNS izolálás, kvantifikálás	12
3.3. Markerek adaptálása, primertervezés	12
4. EREDMÉNYEK.....	14
4.1. DNS izolálás	14
4.2. Markerek adaptálása, primertervezés	14
4.2.1. STR markerek tervezése	14
4.2.2. Multiplex PCR optimalizálása	15
4.2.3. A fejlesztett markerek tesztelése	17
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	20
7. ÖSSZEFOGLALÁS	21
8. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	23
9. IRODALOM.....	28

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

bp	Bázispár
IGV	Integrative Genomics Viewer
LOD	logarithm of odds
MAS	Marker Assisted Selection/ Marker asszisztált szelekció
PCR	Polymerase Chain Reaction/ Polimeráz Láncreakció
SNP	Single Nucleotide Polymorphism/ Egy Nukleotidos Polimorfizmus
SSR	Simple Sequence Repeat
STR	Short Tandem Repeat
VSH	<i>Varroa</i> Sensitive Hygiene/ <i>Varroa</i> szenzitív higiénias viselkedés
QDD	Quick Disability Determination
QTL	Quantitative Trait Loci/Mennyiségi tulajdonságokért felelős lokuszok

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Bevezető

A házi méh (*Apis mellifera* Linnaeus 1758) a hártýásszárnyúak (Hymenoptera) rendjén belül a méhfélék (Apidae) családjába tartozik.

A házi méhek a fő pollinátorok világszerte, és így nélkülözhetetlenek számos mezőgazdasági termés számára és a természetes biodiverzitás megőrzésében. Delaplane és Mayer (2000) becslése szerint az emberi étel-miszer-fogyasztás körülbelül 35%-a függ közvetlenül vagy közvetetten a rovarok általi pollinációtól. 1961 és 2006 között a mezőgazdaság beporzóktól való függése 50 és 62 %-kal nőtt a fejlett és a fejlődő országokban (Aizen és mtsai, 2009). Globálisan a rovar-pollináció körülbelül 9.5 %-át adja a mezőgazdasági termelés összértékének (Gallai és mtsai, 2009).

A *Varroa destructor* nevű atka manapság a legkomolyabb parazitája a házi méhnek (*Apis mellifera*), és már szinte az egész Földön elterjedt (Zakar és mtsai, 2014). Nem csak azzal okoz kárt, hogy a méhek hemolimfájával táplálkozik, hanem vírusokat is terjeszt ezáltal, amelyek szerepet játszanak a kolóniák tömeges csökkenésében. Az atkák világszerte elterjedtek, és méhkolóniák százazreit pusztították el. A méhészkedés Európában lehetetlen lenne kémiai atkaölők használata nélkül, pedig ezekre a szerekre az atkák könnyen rezisztenssé válnak, ami csökkenti a hatékonyságukat (Pettis, 2004). A kontroll kezelések gyakran a méz és a pollen kontaminálódását okozzák, az atkaölők maradványai később is megtalálhatóak ezekben (Martel és mtsai, 2007). A *Varroa*-toleranciát valószínűleg nagyon különböző jellegek okozzák, mert a gazda és az atka közötti kölcsönhatás igen összetett. Számos viselkedés csökkentheti a *Varroa destructor* túlélési esélyét és szaporodási sikerét, ezek közé tartozik a VSH (*Varroa* szenzitív higiénikus viselkedés) és a Grooming (szociális tisztogató viselkedés) (Evans és Spivak, 2010). A VSH viselkedés esetén a méhek higiénikusan távolítják el a *Varroa destructor* atkával fertőzött fiasítást (Fiasítás = a teljes átalakulással fejlődő rovarok petéinek, lárváinak, bábjaiknak közös neve) a sejtekből: felnyitják és eltávolítják a lárvákat vagy bábokat. A Grooming a méhek egy olyan csoportos viselkedése, mely során eltávolítják egymásról vagy magukról a *Varroa* atkákat (Peng, 1988). Házi méh kolóniákban fizikai sérüléseket találtak az atkák testén, amiket a méhek mandibulája okozott (Ruttner és Hanel, 1992). A méhek tehát „beleharapnak” az atkába, amik így elpusztulnak és lehullanak róluk. (Zakar és mtsai, 2014).

1.2. Házi méh genom program

Wallberg és munkatársai (2014) 8,3 millió SNP-t (Single Nucleotide Polymorphism/Egy nukleotidos polimorfizmus) vizsgáltak; 140 dolgozó méh egyed genomját szekvenálták meg, amelyek összesen 14 populációból származtak a világ különböző pontjairól. Ez 634-szeres lefedettséget jelentett. Az európai és az afrikai méhek között meghatároztak számos különbséget az immunitásért felelős gének esetében. Ezek magyarázatot adhatnak a betegségekkel szembeni rezisztenciájukban megnyilvánuló eltérésekre, hiszen az afrikai méhek nagyobb ellenállóságot mutatnak a *Varroa destructor* atkával szemben, a nagyobb rajzási hajlamuk és a fokozottabb agressziójuk mellett.

Elsik és munkatársai (2014) leírtak egy továbbfejlesztett háziméhs genomillesztést (Amel_4.5) egy új gén annotációs rendszerrel (OGSv3.2). Megállapították, hogy a háziméhs genom számos közel azonos gént tartalmaz más rovarok génjeivel, ellentétben a 2006-os illesztéssel (OGSv1.0) (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006). Ez az új genomillesztés sokkal összefüggőbb és teljesebb. Az új génkészlet körülbelül 5000-rel több fehérje kódoló gént tartalmaz, ami a korábban közzétettnél 50%-kal több.

1.3. A házi méh klasszikus genetikája

Már a 1960-as években is el tudták különíteni a különböző méhfajtákat biometriai módszerek segítségével fenotípusuk alapján. A használt morfológiai bélyegek pl.: testméret, potrohszín, szipókahossz, szőrözet, szárnyerezet, szárnyhorgok. Később aztán a mendelien öröklődő fenotípusos tulajdonságokat is elkezdtek vizsgálni. 1968-ban Rothenbuhler foglalkozott a házi méh mutációival részletesebben. Munkájuk során már leírják azt a két gént, amelyeket az említett tisztogató viselkedésért tettek felelőssé. Az egyik ilyen gén a „removing”, amiről úgy gondolták, hogy a sejtekből való kitakarításért felel, a másik pedig az „uncapping”, amit a sejtfedél lerágásért felelős génnek feleltettek meg. Mindkét fő gén esetében úgy gondolták, hogy recesszívek, és azon állatok, amelyek mutatják az adott viselkedést homozigóták (Gere, 1985).

1.4. A méhek *Varroa* atka szenzitív higiénikus viselkedése

A méhek számos kihívással állnak szemben, mint például a peszticidok, a kórokozók és a paraziták (Evans és Schwarz, 2011; Johnson és mtsai, 2010; Le Conte és mtsai, 2010). A házi méhek *Varroa* parazitáltsága tekinthető az egyik legsúlyosabb fenyegetésnek a méhészek számára, és világszerte ez vezetett jelentős kolóniaveszteségekhez is (Currie és mtsai, 2010; Dahle, 2010; Vanengelsdorp és mtsai, 2012). Ezek az obligát ektoparaziták a méhek kaptárában élnek, és fertőzik az egyedeket.

A *Varroa destructor* a háziméh (*Apis mellifera*) ektoparazitája. Sokáig a *Varroa jacobsoni* néven volt ismert. Azonban az eddig *Varroa jacobsoni*-ként számon tartott fajról kiderült, hogy két jól elkülönülő fajból áll. Az Ázsiában honos *Apis cerana* méhen terjedt el a mai értelemben vett *Varroa jacobsoni*, míg Európában az *Apis mellifera* parazitája a *Varroa destructor*. A nőstény hossza 1,1 milliméter, szélessége 1,6 mm. A fedett fiasításban szaporodik. A kifejlett atka 1,5-2 mm széles, 1-1,8 mm hosszú, laposgomb alakú. Sok esetben a méhek potrohának kitinlemezei közé húzódik, így a felnőtt méheken nem könnyű észrevenni. Mivel többnyire a fiasításban tölti életét, ezért már csak jelentős fertőzöttség esetén állapítható meg jelenléte. Fejtora kicsi, felülről osztatlan, szklerotizált, vörösesbarna kitinpáncél fedi. A szájszervében a csáprágó szolgál a táplálék felvételére, egy páros tapogató pedig érzékelésre. Az atka a csáprágó utolsó, mozgatható és fogazott ízével kapaszkodik a gazdájába. Lábai erősek, rövidek, nincsenek rajta karmok, helyettük apothélák, speciális struktúrák rögzítik. 10 napos a reprodukciós ideje, exponenciális dinamikájú. Minden fejlődési alakja parazita. Nimfaállapotban a nőstények a fedett fiasításban élnek, később is csak ők hagyják el a sejtet, a hímek nem (Delfinado és Baker, 1974).



1. ábra: Varroa atkával fertőzött bábok

Az atkáknak fejlődő méhekre van szükségük a szaporodásukhoz (1.ábra). A megtermékenyített nőtény a fiasítás sejtjeibe rakja a petéket, egy hím és akár öt nőtény kel ki egy dolgozó fiasítás sejtjéből (Schultz, 1984). Ezek az utódok a fejlődő méhlárvák hemolimfájával táplálkoznak, és az egy „fészekaljából” származó atkák egymással párosodnak. Később az atkák a felnőtt méhegyedek hemolimfájával kezdenek el táplálkozni, miközben fizikai és fiziológiai károkat is okoznak bennük, ami miatt akár a méhek fejlődése is abnormális lehet (Sammataro és mtsai, 2000). A legrosszabb hatása az atkáknak azonban az, hogy sok méhvírus vektoraként is szolgálnak (Chen és mtsai, 2006). A kezeletlen, *Varroa* atkával elárasztott méhkolóniák általában egy, legfeljebb négy-hat év múlva elpusztulnak (Spivak és Reuter, 2001).

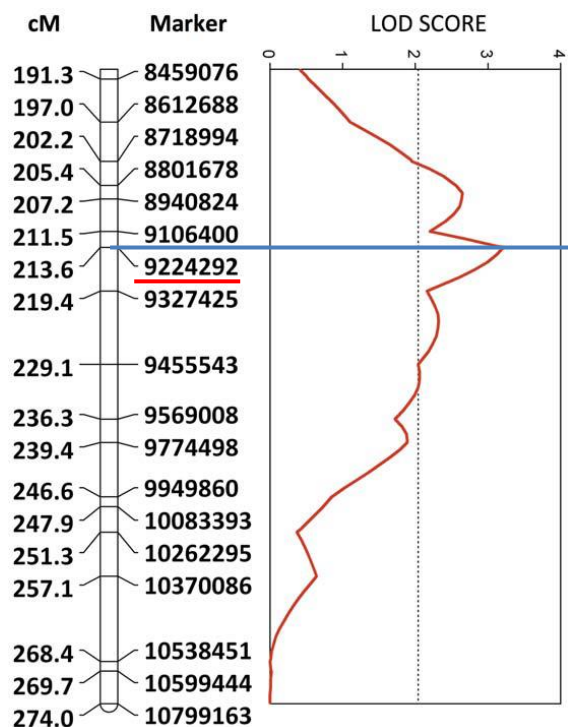
A méhek néhány viselkedési mintázata képes csökkenteni a *Varroa* atkák számát. Az egyik ilyen fontos jellemvonás a *Varroa* szenzitív higiénikus viselkedés (VSH). A higiénikus tulajdonság javítható, ha azokat a méhvonalakat szaporítjuk, amelyek hatásosan távolítják el az elpusztult lárvákat. A jól tisztító méhek több *Varroa* atkát távolítanak el, mint a rosszabbul tisztítók (Boecking és Spivak, 1999; Spivak, 1996). A VSH a higiénikus viselkedés olyan formája, amikor a méhek a *Varroa* atkára sokkal érzékenyebbek, intenzívebben reagálnak rá. A fokozott atka-eltávolítás lehetővé teszi a VSH méheknek, hogy hatásosan lassítsák a *Varroa* atka populáció növekedését (Ibrahim és Spivak, 2006; Harbo és Harris, 2005). Ha egy hétre berakunk egy atkákkal borított fiasítást olyan méhek közé, amelyek magas fokú VSH viselkedést mutatnak, akkor az atkák szaporodása lecsökken (Harbo és Harris, 2005), mert az éretlen atkákat elpusztítják a „felnyitó és eltávolító” (uncap, remove) viselkedéssel, hiszen a fertőzött lárva eltávolításával együtt a lárván lévő atkákat is eltávolítják (Harris és mtsai, 2012).

1.5. A *Varroa* érzékenység genetikai háttere

Tsuruda és munkatársai (2012) a VSH genetikai hátterét vizsgálták. A vizsgálat célja az volt, hogy QTL térképezés alapján elkülönülő kromoszóma régiókat keressenek a VSH jellegre. Az eddigi szelekció a VSH kolóniaszinten történő mérésére támaszkodott, ilyen például a fiasításban megfigyelhető atkák számának csökkenésének észlelése, vagy a sejtekben lévő atkák reprodukív sikerének mérése (Harris, 2007; Villa és mtsai, 2009). A résztvevő gének azonosítása segítene a viselkedések genetikájának és neurobiológiájának megértésében, amelyek hozzájárulnak a méhek atka elleni rezisztenciájához. Továbbá hatásosabb eszközöket biztosítana a szelektív szaporításhoz, valamint a marker asszisztált szelekcióhoz (MAS).

Munkájuk során 1340 informatív SNP-t használtak egy nagy felbontású genetikai térkép létrehozására, és a VSH viselkedést mutató méh egyedek összehasonlítására azokkal, amelyek nem mutatták a jelleget. 127 VSH és 111 nem VSH egyedeket vontak be a vizsgálataikba. Az interval térképezés elemzésével azonosítottak egy 3.21-es LOD csúcsot a 9-es kromoszómán, ami a 9.224.292. bázispárnál lévő SNP-hez tartozik (2. ábra). Általában azok egyedek, amelyek homozigóták voltak a VSH allélra nézve, azoknál volt inkább megfigyelhető a VSH viselkedés.

2. ábra. Az intervallum térképezés eredményeként kapott LOD score értékek, és a VSH viselkedéssel kapcsolt régió genomi pozíciója (Tsuruda és mtsai, 2012).



Spötter és munkatársai (2016) Affymetrix 44K SNP chipet használtak olyan SNP-k keresésére, amik a VSH viselkedéssel kapcsolatosak. A kísérlet során 22.000, egyesével jelölt dolgozót figyeltek meg videókamera segítségével, közülük 122 higiénikus és 122 kontroll egyed lett begyűjtve és elemezve, hogy meghatározzák az SNP-k kapcsoltságát a higiénikus és nem-higiénikus viselkedéssel. Hat SNP marker volt szignifikánsan kapcsolatos a vizsgált tulajdonsággal. A 6 SNP körüli genomi régiók ellenőrzése lehetséges gének felfedezéséhez vezetett. Négy funkcionális kandidáns gén lett azonosítva 4 SNP szomszédságában, amik szignifikánsan kapcsolatosak a tisztogató viselkedéssel.

1.6. A genetikai vizsgálatokhoz használt STR markerek

A mikroszatelliták (STR: Short Tandem Repeat, SSR: Simple Sequence Repeat) 2-6 bp hosszú ismétlődő DNS szakaszok, melyek nagy polimorfizmust mutatnak és a genomban szóróan helyezkednek el (Hajósne Novák, 1999; Fésüs és mtsai, 2000). A mikroszatellita teljes hosszúsága 50-500 bp között változhat, az ismétlődések száma akár több tucat is lehet. A polimorfizmusuk (allélváltozatok) az ismétlődések számának eltéréseiből adódnak (Armour és mtsai, 1994; Kurjáné Korom, 2013).

A mikroszatelliták jelenleg a leghatékonyabb genetikai markereknek tekinthetőek populációgenetikai vizsgálatok esetén, és használatuk széles körben elterjedt a genomikában, populációgenetikában valamint a kvantitatív tulajdonságok genetikai vizsgálatában. Solignac és munkatársai (2003) a házi méh genomját vizsgálták és 552 mikroszatellita lokuszt azonosítottak, melyek polimorfak voltak. Közülük számos mikroszatellitát sikeresen amplifikáltak más *Apis* fajokban.

2. CÉLKITŰZÉS

A tervezett kutatások a hazai méhészeket olyan újonnan kifejlesztett diagnosztikai eljárásokkal támogatná, amelyek alkalmazásával versenyképesebbé és hatékonyabbá tehetik működésüket. A genomikai vizsgálatok lehetőséget adnak a későbbiekben arra, hogy egyes jelentős gazdasági értékmérő tulajdonságokra (pl.: betegség elleni rezisztencia, illetve tolerancia, rajzási hajlam, higiénias viselkedés) DNS markerekkel szelektálni tudjunk.

2.1. A csoport célkitűzései

Hazai méh populációgenetikai vizsgálatok

Az irodalomban eddig leírt leggyakrabban alkalmazott mikroszatellita markereket szeretnénk adaptálni, illetve a hazai genomikai adataink felhasználásával, olyan nagy elválasztó erejű multiplex mikroszatellita marker szetteket készítenénk, amellyel a Kárpát-medencében felmérhető lesz a krajnai méh táj- vagy ökotípusok előfordulása és természetesen a genetikailag távolabb álló *A. m. ligustica*, valamint a Buckfast hibridek kiszűrése is lehetővé válik a hazai méhtenyésztők vonalainak ellenőrzésekor.

Higiénias viselkedéshez kapcsolt markerek fejlesztése

Genomikai, genetikai módszerekkel össze szeretnénk hasonlítani az egyes méhcsaládokat, így lehetőségünk nyílik olyan DNS markerek fejlesztésére, amelyek használatával az előnyös tulajdonságot hordozó vonalak és családok kiválogatása megtörténhet a herefiasítás, illetve a fiasítás DNS alapú vizsgálatával, amellyel a későbbiekben a higiénikus viselkedésre genetikai értékbecslést tudunk adni.

2.2. A saját feladataim

A házi méhek VSH (*Varroa Sensitive Hygiene*) higiénikus viselkedésével kapcsolt mikroszatellita markerek irodalomból való adaptálása és fejlesztése, primerek tervezése, DNS izolálás, a minták minőségi és mennyiségi ellenőrzése, PCR összemérés (markerek tesztelése, multiplexelése, optimalizálása), gélelektroforézis, allélméreték meghatározása.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Méh minták

Összesen 12 méhállományból gyűjtöttünk különböző méh fajtaikat, összesen 72 méh egyedet. Ezek között voltak krajnai méhek (*Apis mellifera carnica*) az ország eltérő pontjairól, a németországi Hohen Neuendorfból származó higiénikus és *Varroa* toleráns egyedek, vizsgáltunk Ázsiából származó méheket (*Apis cerana*) és olasz méhet (*Apis mellifera ligustica*). Egy Uppsalából (Svédország) származó Buckfast állomány egyedeit is vizsgáltuk, illetve a svédországi Gotlandból származó *Varroa* atka-toleráns populációból kaptunk mintát. Minden méh ellenőrzött méhészetből származott.

3.2. DNS izolálás, kvantifikálás

Vizsgálatainkhoz a méhekből teljes genomi DNS-t izoláltunk. Az egyedek repülőizmait kipreparáltuk, melyekből Genomic DNA Mini Kit (Tissue) (Geneaid Biotech Ltd, Tajvan) segítségével izoláltunk teljes genomi DNS-t a gyártó protokollja szerint. Az izolált DNS mennyiségét és minőségét ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., USA) spektrofotométerrel ellenőriztük, és a megfelelő koncentrációjú és tisztaságú DNS mintákat használtuk PCR vizsgálatokhoz.

3.3. Markerek adaptálása, primertervezés

Tsuruda és munkatársai (2012) alapján a kapcsolt SNP marker a 9.224.292. bázispárnál található az Amel 4.0 háziméh genomillesztésen (2. ábra). Az IGV program segítségével, QDD perl script csomaggal (Meglécz és mtsai, 2010) megkerestem a legközelebb eső mikroszatellita ismétlődéseket az általunk használt Amel 4.5 háziméh genomillesztésen. Három ilyen lokuszt találtam, amelyekre később Primer3 (Rozen & Skaleczky 2000) programmal primert is terveztem. A kapott különbségek és polimorfizmusok összevetéséhez különböző shell és python scripteket használtunk. A kapott primereket teszteltük, és multiplex reakcióban (egy reakcióterben több primer összemérése) optimalizáltuk azokat, amelyek detektálható fragmenteket adtak. A reakciókat 20 µl végtérfigatban mértük össze LifeECO PCR készülékben (Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd, Kína).

A mikroszatelliták fluoreszcensen jelölt primerekkel végzett multiplex reakciók eredményeként kapott PCR termékek méretét kapilláris elektroforézissel határoztuk meg ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Group, USA) készüléken. A kapott allélméreteket Microsoft Excel táblázatban rögzítettük, amelyeket a Peak Scanner 1.0 software (Applied Biosystem 2006) program segítségével határoztunk meg előzetesen, majd GenAlEx 6.5 (Peakall és Smouse, 2012) és Arlequin 3.5 (Excoffier és Lischer, 2010) programmal elemeztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. DNS izolálás

A DNS izoláláshoz a méhek tori repülőizmát használtuk. A kiválasztott méhekből izolált genomi DNS mennyiségi és minőségi ellenőrzésének eredménye az 1. táblázatban látható. Minden felhasznált minta tisztasága és mennyisége elérte az optimális értékeket.

4.2. Markerek adaptálása, primertervezés

4.2.1. STR markerek tervezése

A Frank Krisztián munkatársam által lefuttatott mikroszatellita keresés eredményeként, 397 727 tandem ismétlődő szekvenciát találtunk a méh referencia genomszekvencián, amely 236 millió bázisból áll. Ezek közül 138 945 db mono-, 140 684 db di-, 27 236 db tri-, 63 015 db tetra-, 20 763 db penta-, 7 084 db pedig hexanukleotid ismétlődés. A talált ismétlődések alapján 75 560 lokuszra sikerült primert tervezni, így a méh genomban átlagosan 3 785 bázisonként található olyan mikroszatellita, amelyet a jövőben potenciálisan markerként használhatunk.

A 3. ábrán az IGV genom böngésző programban krajnai méh teljes genomok részlete látható a sorokban, ahol a felső részen a lefedettségi értékek oszlopdigramja olvasható bázisonként, alatta a genomszekvenciák stilizált 100bp-os szekvencia darabjai. A program a referenciához képest megjeleníti a különbségeket (SNP, inszerció, delécio). Az ábra alján a kék vonalak 3 körülbelül 2000 bázis hosszúságú szakaszt mutatnak, a középső ilyen vonal közepén helyezkedik el a korábbiakban már említett, Tsurudáék által azonosított SNP marker. Legalul, ezen a genomi lokuszon található összes, a QDD programmal prediktált mikroszatellita helyzete látható. Későbbiekben ezek a mikroszatelliták potenciális markerként használhatóak a VSH viselkedés monitorozására. A mikroszatellita ismétlődések helyzetét összevetettük a VSH viselkedés kialakulásában feltehetőleg fontos szerepet játszó lokuszok elhelyezkedésével. Az így feltárt mikroszatelliták a későbbiekben kapcsolt markerként az előnyös tulajdonságot hordozó vonalak kiválasztásában a gyakorlatban alkalmazhatóak lehetnek.

Az általunk fejlesztett markerek közül egy, a 365-ös marker, egybeesik Estoup és munkatársai (1995) által azonosított 5362-es mikroszatellita markerrel, amelyet ők populációgenetikai markerként azonosítottak.

4.2.2. Multiplex PCR optimalizálása

A markereket sikerült multiplex rendszerre optimalizálnunk. A 2. táblázatban látható a PCR összemérő recept, valamint a PCR program a 3. táblázatban. A reakciót Bioer LifeEco készülékben futtattuk.

Apis VSH plex 20160720-	konc.	1 reakció
Templát	15 ng/μl	3,00
Multiplex Master Mix	2×	10,00
365/5362 primer mix	10 μM	0,30
366FR primer mix	10 μM	0,38
367FR primer mix	10 μM	0,55
Desztillált víz		5,77
Végtérfogat		20,00

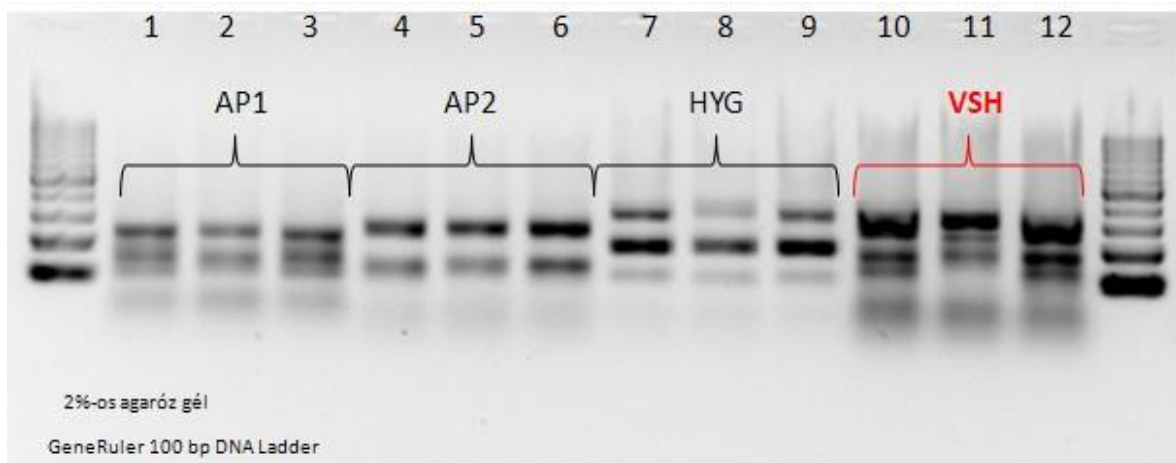
2. táblázat PCR reakció recept

Apis_STR		
95°C	15:00	1x
94°C	0:30	
58°C	1:00	35x
72°C	1:00	
72°C	10:00	1x

3. táblázat PCR program

A csoport a rendszer optimalizálásának érdekében további markereket is hozzáadott az eddig használt multiplexhez, aminek a gélelektroforézis képét alább láthatjuk (4. ábra). Ezen markerek populációgenetikai eltérések (AP1,AP2), illetve a méhek egyéb viselkedési mintázatainak vizsgálatára alkalmasak (HYG).
VSH

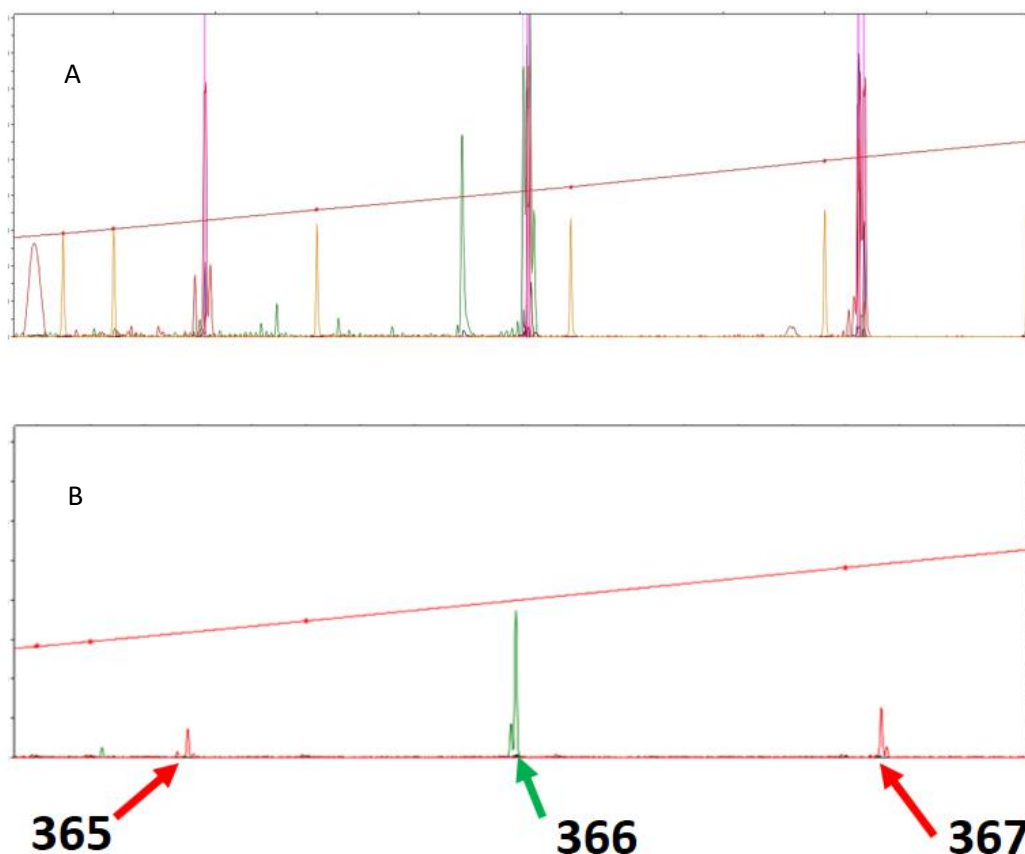
4. ábra Multiplex reakció gélelektroforézis képe.



Pirossal jelöltem három egyed (10,11,12) VSH plex PCR termékeit.

A multiplex reakcióban a primerek mennyiségét optimalizáltuk az egyszerűbb értékelhetőség érdekében, majd Peak Scanner 1.0 software (Applied Biosystem 2006) segítségével leolvastuk az allélhosszakat. A saját fejlesztésű három markeremet jelöltem az optimalizált futtatás elektroferogramján (5. ábra).

5. ábra. A fragmenthossz analízis eredménye (A: optimalizálás előtti, B: optimalizálás utáni elektroferogram).



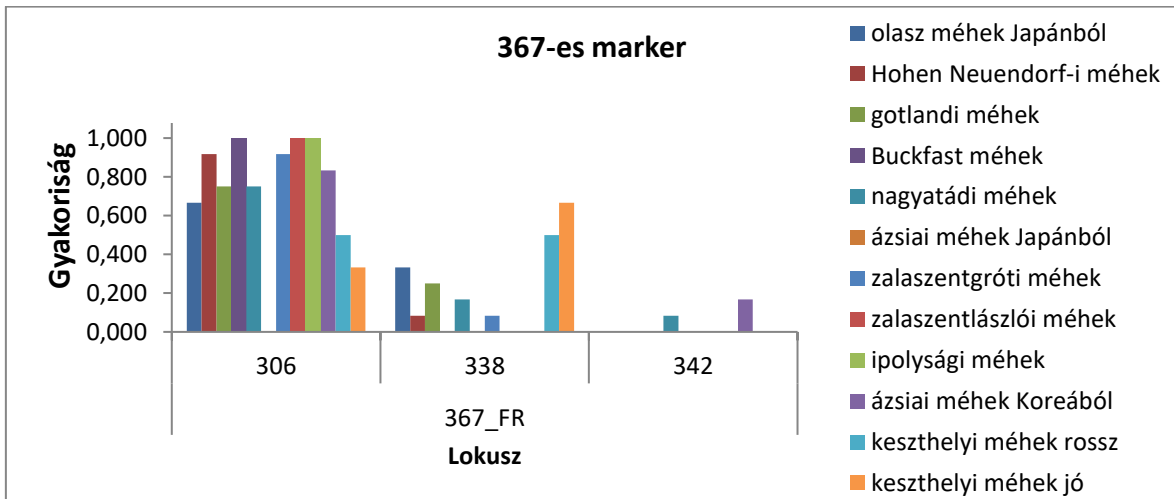
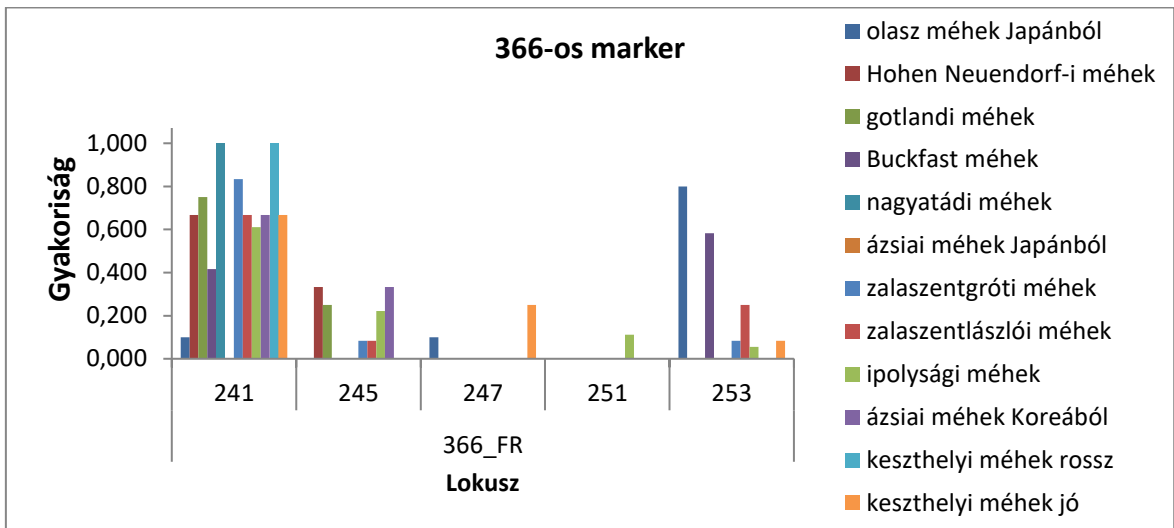
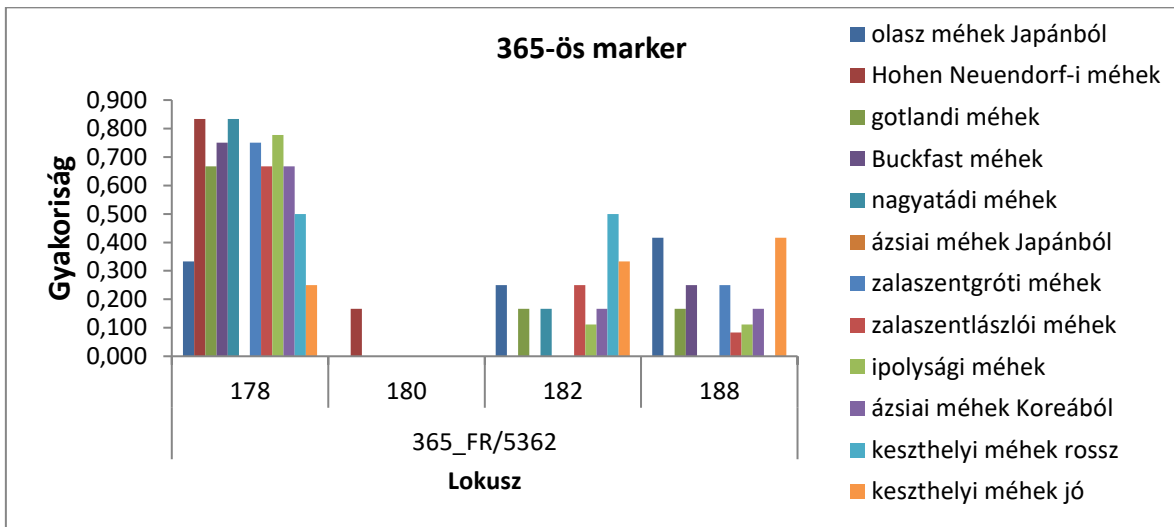
4.2.3. A fejlesztett markerek tesztelése

Az általunk detektált allélméretek és allélgyakoriságok a 4. táblázatban találhatóak. Az allélgyakoriságokból készült diagram az 6. ábrán látható. A markerek polimorfnek bizonyultak, lokuszonként eltérő hosszúságúak voltak az allélek, az egyes csoportokban pedig különböző allélhosszakat kaptunk. A Japánból származó ázsiai méhekben (*Apis cerana*) nem sikerült PCR terméket amplifikálnunk, a markereket európai házi méhre (*Apis mellifera*) adaptáltuk. A 365-ös STR markerrel a 366-os és 367-es STR markerek kapcsolatosak ($P < 0,05$). Az általunk detektált allélméretek száma további minták bevonásával bővíthet, ami a *Varroa*-érzékeny viselkedés azonosítást megbízhatóbbá teheti a továbbiakban.

Lokusz	Allélhossz	olasz méhek Japánból	Hohen Neuendorf-i méhek	gotlandi méhek	Buckfast méhek	nagyatádi méhek	ázsiai méhek Japánból	zalaszentgróti méhek	zalaszentlászlói méhek	ipolysági méhek	ázsiai méhek Koreából	keszthelyi méhek (rosszul tisztító)	keszthelyi méhek (jól tisztító)
365	N	6	6	6	6	6	0	6	6	9	3	6	6
	178	0,333	0,833	0,667	0,750	0,833	0,000	0,750	0,667	0,778	0,667	0,500	0,250
	180	0,000	0,167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	182	0,250	0,000	0,167	0,000	0,167	0,000	0,000	0,250	0,111	0,167	0,500	0,333
	188	0,417	0,000	0,167	0,250	0,000	0,000	0,250	0,083	0,111	0,167	0,000	0,417
366	N	5	6	6	6	6	0	6	6	9	3	6	6
	241	0,100	0,667	0,750	0,417	1,000	0,000	0,833	0,667	0,611	0,667	1,000	0,667
	245	0,000	0,333	0,250	0,000	0,000	0,000	0,083	0,083	0,222	0,333	0,000	0,000
	247	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,250
	251	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,111	0,000	0,000	0,000
	253	0,800	0,000	0,000	0,583	0,000	0,000	0,083	0,250	0,056	0,000	0,000	0,083
367	N	6	6	6	6	6	0	6	6	9	3	6	6
	306	0,667	0,917	0,750	1,000	0,750	0,000	0,917	1,000	1,000	0,833	0,500	0,333
	338	0,333	0,083	0,250	0,000	0,167	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000	0,500	0,667
	342	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000	0,167	0,000	0,000

4. táblázat. Allélhosszak és gyakoriságok lokuszonként.

6. ábra. Allélgyakoriság lokuszonként.



6. KÖVETKEZTETÉSEK

A VSH viselkedéshez kapcsolt genetikai markereket sikeresen adaptáltuk, amelyeket először egyesével teszteltünk, majd multiplex reakcióban optimalizáltuk (3 STR marker). A markerek mindegyike polimorfnek bizonyult, valamint az igazoltan higiénikus szelekcióból származó DNS mintákon (ipolysági méhek, Hohen Neuendorf-i méhek) egyedi, illetve predomináns allélhosszakokat is találtunk, amely a későbbiekben lehetővé teheti, hogy a hazai nagyobb szűrővizsgálatokból genetikai markereink segítségével kiszelektáljuk a jó tisztogató viselkedésű vonalakat.

Célunk egyelőre a markerek fejlesztése és tesztelése volt. A mintákat elsősorban populációgenetikai vizsgálatokhoz használta fel a csoportom ezért azt, hogy a markereink valóban kapcsoltak-e a VSH viselkedéssel még nem tudtuk egyértelműen megállapítani, mivel a mintakészletünkben nem volt elegendő számú VSH egyed.

A VSH viselkedés vizsgálatához egyértelműen nagyobb mintaszámú fenotípusos tesztelés szükséges. Ezek a fenotípusos tesztelések már megkezdődtek a csoport számára mintákat biztosító méhészetekben. Fontos, hogy a jól és gyengébben tisztító családok tisztogató viselkedése jelentősen különbözzön, annak érdekében, hogy a tisztogató viselkedéssel kapcsolt allélméretetek kimutathatóak legyenek. Ennek érdekében a teszteknel a szélsőértékek biztonsággal történő detektálása szükséges.

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az *Apis cerana* (a *Varroa* atka eredeti gazdája) dolgozók egy fertőzött kaptárban az atkák 97%-át kitisztítják a felnyitott sejtekből pár percen belül (Peng és mtsai, 1988), míg az *Apis mellifera* kevesebb elősködőt távolít el ugyanannyi idő alatt (Boecking és Ritter, 1993). Ezt a különbséget alátámasztva az ázsiai méhek a mi vizsgálataink során is elkülönültek, aminek valószínűleg a populációgenetikai különbségek mellett a viselkedésükben megnyilvánuló eltérő genetikai háttér is az okozója lehet.

A jövőben szeretnénk közelrokon, lehetőleg csak hazai, krajnai méheket (*Apis mellifera carnica*) bevinni a vizsgálatokba, hogy elkerüljük a populációgenetikai különbségek miatti eltéréseket az allélméretetek esetén.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A házi méh (*Apis mellifera*) számára az egyik legkártékonyabb kártevője a *Varroa destructor* nevű atka és az általa terjesztett betegségek, amelyek már Magyarországon is egyre fenyegetőbb veszélyt jelentenek a méhészek számára. Ezen paraziták ellen bizonyos méhek az úgynevezett higiénikus viselkedéssel hatékonyan tudnak védekezni, mely során a dolgozók a fertőzött/elpusztult lárvákat és bábokat eltávolítják a kaptárból, megakadályozva ezzel a továbbfertőződést.

Dolgozatom célja, hogy genomikai, genetikai módszerekkel összehasonlítsuk a jól tisztító családokat a rosszul tisztítókkal, így lehetőségünk nyílik olyan DNS markerek fejlesztésére, amelyek használatával az előnyös tulajdonságot hordozó vonalak és családok kiválogatása megtörténhet a herefiasítás/fiasítás DNS alapú vizsgálatával.

Összesen 12 méh állományból gyűjtöttünk különböző méh fajtákat, összesen 72 méh egyedet. TDK munkám során a méhek repülőizmait kipreparáltam, majd megfelelő mennyiségű és minőségű genomi DNS-t izoláltam belőlük. Tsuruda és munkatársai (2012) munkája alapján a *Varroa* atka szenzitív viselkedéssel kapcsolt QTL régióra terveztem három mikroszatellita markert, amelyet multiplex PCR rendszerbe optimalizáltam.

A vizsgált markerek jól működnek és polimorfnak bizonyultak a vizsgált méh egyedekben. A későbbiekben szeretnénk kizárólag krajnai méheket (*Apis mellifera carnica*) bevonni a vizsgálatokba, hogy kizárjuk a populációgenetikai különbségek miatti eltéréseket.

A méhészeti genomikai kutatások hosszú távú célja az, hogy a hazai méhanyanevelőket genetikai adatokkal (genetikai profilokkal) támogassa, amelyek segítségével rövidebb idő alatt értékesebb állományok hozhatók létre, amelyek a leggyakoribb méhbetegségekkel szemben ellenállóak.

SUMMARY

The honeybee's (*Apis mellifera*) most harmful pest is the *Varroa destructor* mite, which is becoming a more and more impending danger to beekeepers in Hungary. Some bees can effectively defend themselves against this parasite showing hygienic behaviour where through honeybee workers remove the infected/dead pupae and larvae from the hive, thus preventing further infection.

The aim of my thesis is to compare the hygienic honeybee hives with the non-hygienic ones using genomic and genetic methods, so we are able to develop DNA markers for selecting the advantageous lines and families using DNA-based testing on drone brood/brood.

A total of 72 honeybees were collected from different species and from 12 different bee populations. During my work I dissected the flying muscles from the thorax of these honeybees after what I isolated genomic DNA from these and the DNA was of adequate quantity and quality for further usage. Based on the work of Tsuruda et al. (2012) I designed three microsatellite markers for the QTL region which is linked to the varroa mite sensitive behaviour and I optimized them for multiplex PCR system.

The tested markers are working properly and they were proved to be polymorphic in the tested individuals. Later we would like to involve only Carniolan bees (*Apis mellifera carnica*) in our assay to exclude the aberrances caused by the population genetic differences.

The long-term goal of this honeybee genomics survey is to support the domestic beekeepers with genetic data (genetic profiles) thus could improve the breeding of bee families and bee disease resistant populations.

8. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ volt és jelenlegi főigazgatójának, Dr. Somogyi Norbertnek és Dr. Gyuricza Csabának, a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet igazgatójának, Dr. Olasz Ferencnek, valamint a Mezőgazdasági Genomikai és Bioinformatikai Csoport vezetőjének, Dr. Barta Endrének, hogy lehetővé tették számomra a dolgozatom elkészítéséhez szükséges kísérleti munka elvégzését.

Köszönettel tartozom Bross Péternek és az Országos Magyar Méhészeti Egyesületnek, hogy a Magyar Nemzeti Méhészeti Program keretében lehetővé tették a vizsgálat létrejöttét.

Köszönet illeti munkatársaimat a sok segítségért: Szepesi Kingát, Heltai Botondot és Frank Krisztiánt.

Köszönettel tartozom Dr. Pásztor-Kovács Szilvia belső konzulensemnek, valamint Dr. Stéger Viktor külső témavezetőmnek és a csoportomnak, az Akalmazott Vad- és Haszonállat Genomikai Csoportnak a munkám, illetve dolgozatom elkészülésében nyújtott segítségükért.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Kolics Baláznak a dolgozatom elkészüléséhez nyújtott segítségért.

Köszönöm családomnak és barátaimnak a sok támogatást és biztatást.

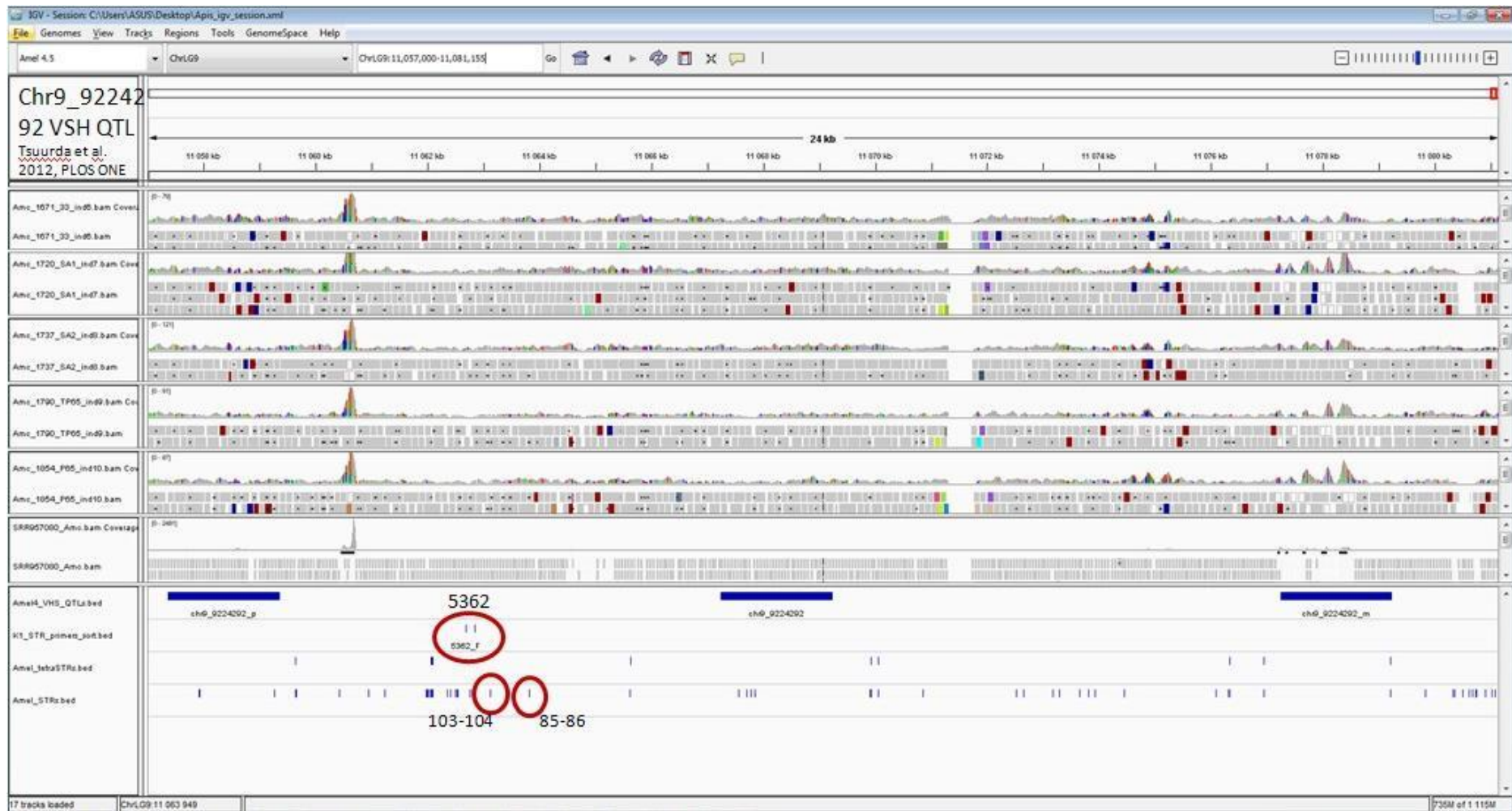
Mellékletek

Azonosító	Koncentráció (ng/ul)	A260	A280	Fehérjetartalom (260/280)	Sótartalom (260/230)
olasz méhek Japánból (<i>Apis mellifera ligustica</i>)					
2106	25,48	0,396	0,167	1,79	0,87
2107	62,83	1,257	0,551	2,28	2,27
2108	92,67	1,853	0,834	2,22	2,42
2109	32,36	0,647	0,3	2,16	2,24
2110	51,76	1,035	0,457	2,26	2,91
2111	28,40	0,568	0,257	2,21	2,61
ázsiai méhek Japánból (<i>Apis cerana</i>)					
2117	23,78	0,476	0,244	1,95	1,28
2118	24,56	0,491	0,201	2,44	3,15
2119	20,52	0,41	0,156	2,64	3,33
2120	30,78	0,616	0,323	1,91	0,99
2121	58,64	1,173	0,53	2,21	2,64
2122	26,18	0,524	0,232	2,25	3,04
Buckfast méhek					
3181	662,47	13,249	6,188	2,14	2,32
3182	549,54	10,991	5,229	2,10	2,35
3183	776,48	15,53	7,372	2,11	2,18
3184	764,62	15,292	7,23	2,12	2,14
3185	554,39	11,088	5,27	2,10	2,32
3186	1292,37	25,847	12,195	2,12	2,26
gotlandi méhek					
3175	517,82	10,356	4,927	2,10	2,34
3176	562,47	11,249	5,163	2,18	2,30
3177	423,11	8,462	4,05	2,09	2,36
3178	344,37	6,887	3,278	2,10	2,32
3179	532,41	10,648	5,085	2,09	2,25
3180	687,76	13,755	6,443	2,14	2,20
ázsiai méhek Koreából (<i>Apis cerana</i>)					
2170	33,54	0,671	0,333	2,02	2,35
2171	31,10	0,622	0,307	2,03	1,87
2172	31,95	0,639	0,316	2,02	1,67

Azonosító	Koncentráció (ng/ul)	A260	A280	Fehérjetartalom (260/280)	Sótartalom (260/230)
Hohen Neuendorf-i méhek (<i>Apis mellifera carnica</i>)					
3113	4,39	0,088	0,012	7,17	1,25
3114	7,14	0,143	0,061	2,35	1,84
3115	13,88	0,278	0,176	1,58	1,83
3142	3,36	0,067	0,002	3,02	0,84
3143	9,49	0,19	0,082	2,31	1,50
3144	28,63	0,573	0,284	2,01	2,51
nagyatádi méhek (<i>Apis mellifera carnica</i>)					
2094	146,93	2,939	1,353	2,17	2,29
2095	242,33	4,847	2,232	2,17	2,38
2096	213,15	4,263	1,981	2,15	2,42
2097	237,95	4,759	2,202	2,16	2,45
2098	227,34	4,547	2,058	2,21	2,39
2099	207,88	4,158	1,936	2,15	2,30
zalaszentgróti méhek (<i>Apis mellifera carnica</i>)					
3264	45,34	0,907	0,477	1,90	0,88
3265	103,07	2,061	0,981	2,10	2,19
3266	46,65	0,933	0,455	2,05	1,69
3267	78,41	1,568	0,786	2,00	1,46
3268	22,64	0,453	0,227	2,00	0,65
3269	123,26	2,465	1,136	2,17	2,00
zalaszentlászlói méhek (<i>Apis mellifera carnica</i>)					
3277	87,50	1,745	0,917	1,90	0,93
3278	39,50	0,79	0,416	2,26	1,38
3279	50,80	1,017	0,631	2,19	1,85
3280	185,40	3,701	1,902	1,92	1,14
3281	48,70	0,976	0,565	2,19	2,05
3282	54,70	1,094	0,594	2,25	1,90
ipolysági méhek (<i>Apis mellifera carnica</i>)					
1666	11,81	0,236	0,139	1,69	0,81
1667	67,31	1,346	0,851	1,58	0,68
1668	19,32	0,386	0,216	2,02	2,02
1692	20,46	0,409	0,223	1,83	1,12
1693	18,22	0,364	0,16	2,28	1,42
1695	18,15	0,363	0,179	2,02	1,29
1696	20,13	0,403	0,214	1,88	1,55
1697	18,36	0,367	0,214	1,72	1,34
1698	21,94	0,439	0,225	1,95	1,46

Azonosító	Koncentráció (ng/ul)	A260	A280	Fehérjetartalom (260/280)	Sótartalom (260/230)
keszthelyi méhek (<i>Apis mellifera carnica</i>) rosszabbul tisztító					
3289	164,58	3,292	1,86	1,77	1,86
3290	268,53	5,371	5,166	1,04	1,08
3291	175,58	3,512	2,526	1,39	1,45
3292	508,75	10,175	7,699	1,32	1,37
3293	97,48	1,95	0,959	2,03	2,23
3294	274,08	5,482	2,62	2,09	2,27
keszthelyi méhek (<i>Apis mellifera carnica</i>) jól tisztító					
3301	271,17	5,423	4,916	1,10	1,14
3302	205,57	4,111	2,12	1,94	2,07
3303	598,47	11,969	5,677	2,11	2,34
3304	601,48	12,03	6,067	1,98	2,24
3305	277,62	5,552	3,483	1,59	1,74
3306	577,01	11,54	5,451	2,12	2,31

1. táblázat (1.melléklet): Vizsgálathoz kiválasztott méhekből izolált DNS minták koncentrációja és tisztasági értékei



3. ábra (2.melléklet) IGV kép mikroszatellita ismétlődések elhelyezkedésével

9. IRODALOM

- Aizen, M. A., Garibaldi, L. A., Cunningham, S. A., Klein, A. M. (2009): How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Annals of botany*.
- Arechavaleta-Velasco, M. E., Guzmán-Novoa, E. (2001): Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie*, 32(2): 157-174.
- Armour, J. A. L., Neumann, R., Gobert, S., Jefferys, A. J. (1994): Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics*, 3: 599–605.
- Boecking, O., & Ritter, W. (1993). Grooming and removal behaviour of *Apis mellifera intermissa* in Tunisia against *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*, 32(3-4), 127-134.
- Boecking, O., Spivak, M. (1999): Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 30: 141–158.
- Bozic, J., Valentincic, T. (1995): Quantitative analysis of social grooming behavior of the honey bee *Apis mellifera carnica*. *Apidologie*, 26(2): 141-147.
- Büchler, R., Drescher, W., Tornier, I. (1992): Grooming behaviour of *Apis cerana*, *Apis mellifera* and *Apis dorsata* and its effect on the parasitic mites *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae*. *Experimental & Applied Acarology*, 16(4): 313-319.
- Chen, Y. P., Pettis, J. S., Collins, A., Feldlaufer, M. F. (2006): Prevalence and transmission of honeybee viruses. *Applied and environmental microbiology*, 72(1): 606-611.
- Currie, R. W., Pernal, S. F., Guzmán-Novoa, E. (2010): Honey bee colony losses in Canada. *Journal of Apicultural Research*, 49(1): 104-106.
- Dahle, B. (2010): The role of *Varroa destructor* for honey bee colony losses in Norway. *Journal of Apicultural Research*, 49(1): 124-125.
- Delaplane, K. S., Mayer, D. R., Mayer, D. F. (2000): *Crop pollination by bees*. Cabi Publishing, New York. 352 p.
- Delfinado, M. D., Baker, E. W. (1974). Varroidae, a new family of mites on honey bees (Mesostigmata: Acarina). *Journal of the Washington Academy of Sciences*, 4-10.
- Elsik, C. G., Worley, K. C., Bennett, A. K., Beye, M., Camara, F., Childers, C. P., Graaf de C. D., Debyser, G., Deng, J., Devreese B., Elhaik E., Evans, D. J., Foster, J. L., Dan Graur, D., Guigo, R., HGSC production teams, Hoff, J. K., Holder, E. M., Hudson, E. M., Hunt, J. G., Jiang, H., Joshi, V., Khetani, S. R., Kosarev, P., Kovar, L. C., Ma, J.,

- Maleszka, R., Moritz, A. F. R., Munoz-Torres, C. M., Murphy, D. T., Muzny, M. D., Newsham, F. I., Reese, T. J., Robertson, M. H., Robinson, E. G., Rueppell, O., Solovyev, V., Stanke, M., Stolle, E., Tsuruda, M. J., Van Vaerenbergh, M., Waterhouse, M. R., Weaver, B. D., Charles W Whitfield, W. C., Yuanqing Wu, Y., Zdobnov, M. E., Zhang, L., Zhu, D. Gibbs, R. A. (2014): Finding the missing honey bee genes: lessons learned from a genome upgrade. *BMC Genomics*, 15(1): 86.
- Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M., Cornuet, J. M. (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(2), 679-695.
- Evans, J. D., Schwarz, R. S. (2011): Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends in microbiology*, 19(12): 614-620.
- Evans, J. D., Spivak, M. (2010): Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: 62-72.
- Excoffier, L., Lischer, H. E. (2010): Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10(3): 564-567.
- Fésüs L., Komlósi I., Varga L., Zsolnai A. (2000): Molekuláris genetikai módszerek alkalmazása az állattenyésztésben. Agroiinform Kiadó és Nyomda Kft., Budapest. 190 p.
- Gallai, N., Salles, J. M., Settele, J., Vaissière, B. E. (2009): Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological economics*, 68(3): 810-821.
- Gere T. (1985): A mézelő méh (*Apis mellifera* L) genetikája és tenyésztése. Gödöllő. 54 p.
- Hajósné Novák M. (1999): Genetikai variabilitás a növénynevelésben. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 117 p.
- Harbo, J. R., Harris, J. W. (2005): Suppressed mite reproduction explained by the behaviour of adult bees. *Journal of Apicultural Research*, 44(1): 21-23.
- Harris, J. W. (2007): Bees with *Varroa* Sensitive Hygiene preferentially remove mite infested pupae aged \leq five days post capping. *Journal of Apicultural Research*, 46(3): 134-139.
- Harris, J. W., Danka, R. G., Villa, J. D. (2012): Changes in infestation, cell cap condition, and reproductive status of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in brood exposed to honey bees with *Varroa* sensitive hygiene. *Annals of the Entomological Society of America*, 105(3): 512-518.

- Honeybee Genome Sequencing Consortium. (2006): Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443(7114): 931-949.
- Ibrahim, A., Spivak, M. (2006): The relationship between hygienic behavior and suppression of mite reproduction as honey bee (*Apis mellifera*) mechanisms of resistance to *Varroa destructor*. *Apidologie*, 37(1): 31-40.
- Johnson, R. M., Ellis, M. D., Mullin, C. A., Frazier, M. (2010): Pesticides and honey bee toxicity-USA. *Apidologie*. 41(3): 312-331.
- kép: By Waugsberg - A feltöltő saját munkája, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4622590>
- Kurjákné Korom E. (2013): Mikroszatellitek adaptálása és izolálása pulyka és lúd állományok vizsgálatához. Doktori (PhD) értekezés. Szent István Egyetem, Gödöllő, 141 p.
- Le Conte, Y., Ellis, M., Ritter, W. (2010): *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie*, 41(3): 353-363.
- Martel, A. C., Zeggane, S., Aurières, C., Drajnudel, P., Faucon, J. P., Aubert, M. (2007): Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar® or Asuntol® 50. *Apidologie*, 38(6): 534-544.
- Megléczy, E., Costedoat, C., Dubut, V., Gilles, A., Malausa, T., Pech, N., Martin, J. F. (2010): QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics*, 26(3): 403-404.
- Moretto, G., Gonçalves, L., DeJong, D. (1993): Heritability of africanized and european honey-bee defensive behavior against the mite *Varroa jacobsoni*. *Revista Brasileira de Genetica*, 16: 71-77.
- Peakall, R., Smouse, P. E. (2012): GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539.
- Peng, Y.S. (1988): The resistance mechanism of the Asian honey bee *Apis cerana* to the mite *Varroa jacobsoni*. In: Needham, G. R., Page, R. E., Delfinado-Baker, M. Bowman, C. E. (eds.) *Africanized Honeybees and Bee Mites*. Ellis Horwood, Chichester.
- Pettis, J. S. (2004): A scientific note on *Varroa destructor* resistance to coumaphos in the United States. *Apidologie*, 35(1): 91-92.
- Rothenbuhler, W. C., Kulinčević, J. M., Kerr, W. E. (1968): Bee genetics. *Annual Review of Genetics*, 2(1): 413-438.
- Rozen S., Skaletsky H. J. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S., Misener S. (eds.): *Bioinformatics Methods and*

Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, USA, 365-368 p.

- Ruttner, F., Hanel, H. (1992): Active defence against *Varroa* mites in a Carniolan strain of honeybee (*Apis mellifera carnica* Pollmann). *Apidologie* 23: 173-187.
- Sammataro, D., Gerson, U., Needham, G. (2000): Parasitic mites of honey bees: life history, implications, and impact. *Annual review of entomology*, 45(1): 519-548.
- Schultz, A. (1984): Reproduction and population dynamics of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. in correlation with the brood cycle of *Apis mellifera*. *Apidologie* 5: 401-419.
- Solignac, M., Vautrin, D., Loiseau, A., Mougel, F., Baudry, E., Estoup, A., Garney, L., Haberl, M., Cornuet, J. M. (2003): Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome. *Molecular Ecology Notes*, 3(2): 307-311.
- Spivak, M. (1996): Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 27: 245-260.
- Spivak, M., Reuter, G. S. (2001): *Varroa* destructor infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behavior. *Journal of Economic Entomology*, 94(2): 326-331.
- Spötter, A., Gupta, P., Mayer, M., Reinsch, N., Bienefeld, K. (2016): Genome-wide association study of a *Varroa*-specific defense behavior in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Heredity*, 107(3): 220-227.
- Stanimirović, Z., Stevanović, J., Aleksić, N., Stojić, V. (2010): Heritability of grooming behaviour in grey honey bees (*Apis mellifera carnica*). *Acta Veterinaria*, 60(2-3): 313-323
- Tsuruda, J. M., Harris, J. W., Bourgeois, L., Danka, R. G., Hunt, G. J. (2012): High-resolution linkage analyses to identify genes that influence *Varroa* sensitive hygiene behavior in honey bees. *PLoS One*, 7(11), e48276.
- Vanengelsdorp, D., Caron, D., Hayes, J., Underwood, R., Henson, M., Rennich, K., Spleen, A., Andree, M., Snyder, R., Lee, K., Roccacacca, K., Wilson, M., Wilkes, J., Lengerich, E., Pettis, J. (2012): A national survey of managed honey bee 2010-11 winter colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership. *Journal of Apicultural Research*, 51(1): 115-124.
- Villa, J. D., Danka, R. G., Harris, J. W. (2009): Simplified methods of evaluating colonies for levels of *Varroa* Sensitive Hygiene (VSH). *Journal of apicultural research*, 48(3): 162-167.

- Wallberg, A., Han, F., Wellhagen, G., Dahle, B., Kawata, M., Haddad, N., Simones, P. L. Z., Allsopp, H. M., Kandemir, I., De la Rúa, P., Pirk, W. C., Webster, M. T. (2014): A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Genetics*, 46: 1081–1088.
- Zakar, E., Jávora, A., Kusza, S. (2014): Genetic bases of tolerance to *Varroa destructor* in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insectes sociaux*, 61(3): 207-215.

Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott Dr. Stéger Viktor igazolom, hogy Bakonyi Réka

„A házi méh (*Apis mellifera*) Varroa szenzitív higiénikus viselkedéséhez kapcsolt DNS markerek fejlesztése genomikai adatok alapján”

című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2017. április 28.

a témavezető neve és aláírása

Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott Dr. Pásztory-Kovács Szilvia igazolom, hogy Bakonyi Réka

„A házi méh (*Apis mellifera*) Varroa szenzitív higiénikus viselkedéséhez kapcsolt DNS markerek fejlesztése genomikai adatok alapján”

című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2017. április 28.

a belső konzulens neve és aláírása

HuVetA - SZIA

ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név:

Elérhetőség (e-mail cím):

A feltöltendő mű címe:

.....

A mű megjelenési adatai:

Az átadott fájlok száma:

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA és a SZIA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédtől PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA és a SZIA egynél több (csak a HuVetA és a SZIA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban/SZIA-ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- a Szent István Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a SZIE Állatorvos-tudományi Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

* Jelen nyilatkozat az 5/2011. számú, *A Szent István Egyetemen folytatott tudományos publikációs tevékenységgel kapcsolatos adatbázis kialakításáról és alkalmazásáról* című rektori utasításhoz kapcsolódik, illetve annak alapján készült. Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**

Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA/SZIA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban/SZIA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2017. április 28.

aláírás
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetA Magyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvos-tudományi Kar és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*

A SZIA Szent István Archívum a Szent István Egyetemen keletkezett tudományos dolgozatok tára.