

# Animal welfare, etológia és tartástechnológia



## Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 14

Issue 2

Gödöllő  
2018

## ELŐKÍSÉRLETEK HÁZI MÉH (*APIS MELLIFERA*) GENOTIPIZÁLÁSÁRA ÉS SPERMIUM MÉLYHŰTÉSÉRE

Tokár Alexandra<sup>1,2</sup>, Stéger Viktor<sup>2</sup>, Heltai Botond<sup>2</sup>, Szepesi Kinga<sup>2</sup>,  
Debnár Viktória Johanna<sup>3</sup>, Kerekes Andrea<sup>2</sup>, Antal Anita<sup>1,2</sup>, Bodó Szilárd<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Állattenyésztés-  
tudományi Intézet, Gödöllő, Páter Károly u. 1.

<sup>2</sup>NAIK Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet, Gödöllő

<sup>3</sup>NAIK Állattenyésztési, Takarmányozási és Húsipari Kutatóintézet, Herceghalom  
\*bodo.szilard@abc.naik.hu

Received – Érkezett: 14. 11. 2017.  
Accepted – Elfogadva: 02.07. 2018.

### Összefoglalás

A krajnai méh Kárpát-medencei állomány genetikai diverzitásának és tisztaságának felmérését kezdtük el genomikai alapon fejlesztett DNS markerek segítségével. A különböző családokban az anyák genotípusait STR markerek segítségével tudjuk meghatározni, és kiválasztani, mit érdemes hosszútávon *ex-situ* tárolni. A felolvasztott spermiumokkal méhanyák mesterségesen termékenyíthetők és visszaállíthatók, illetve irányított keresztezésekbe állíthatók az eltárolt vonalak. Ezért a herék spermiumainak kinyerésére és mélyhűtésére egy jól használható módszert kell kidolgoznunk. Kifejlesztettünk egy saját, sztereomikroszkópos preparálási módszert, az ivarsejteket a *szeminális vezikulumból* nyertük ki. A spermiumokat tartalmazó médiumot 2 percig 700g-vel centrifugáltuk, a felülúszót eltávolítottuk, és a csapadékot meghatározott mennyiségre hígítottuk, majd 3:2 arányban kevertük össze a krioprotektív anyagokkal (CPA): DMSO25%+BSS+tojássárgája; DMSO10%+BSS+tojássárgája, DMSO25%+Harbo+tojássárgája, DMSO10%+Harbo+tojássárgája. Megállapítottuk, hogy a DMSO-s keverék nem toxikus a spermiumok számára. A 10 $\mu$ l-nyi CPA-val kevert spermiumot 80 $\mu$ l hígítót, 10 $\mu$ l CPA-t tartalmazó 0,25 $\mu$ l-es műszalmákba töltöttük. Tört jégen történő inkubáció után a minták egyik felét közvetlenül a folyékony nitrogén tartalmazó tartályba helyeztük, a másik felét pedig programozható fagyasztógéppel 3°C/perc sebességgel, -40°C-ig hűtöttük. A felolvasztást 38,5°C-os vízfürdőben végeztük, majd a mintákat 38,5°C-on inkubáltuk 10 percig, majd a motilitást fázis kontraszt mikroszkóppal újból megvizsgáltuk. A 10%-os töménységű DMSO-s oldattal kevert spermiumok kivétel nélkül elpusztultak a fagyasztás során, míg a 25%-os koncentrációjú DMSO-s oldattal kevert spermiumok 80%-a (amelyeket programozott lassú hűtéssel fagyasztottunk) túlélte a kezelést, de a felolvasztást követően gyengébb motilitást mutattak.

**Kulcsszavak:** Mézelő méh, krajnai méh, mélyhűtés, sperma preparálás, genotipizálás

## Abstract

### Preliminary experiments for the genotyping of domestic bee (*Apis mellifera*) and sperm freezing

We started to chart the genetic diversity and purity of the Carpathian honeybee substance by using genomic DNA markers. In different families, genotypes of queen bee can be determined by using STR markers and we can choose which the best for long-term *ex-situ* storage is. We can use the frozen-thawed semen for artificial insemination of the queen bees and restore or use the stored lines in directional crossings. Therefore, we must devise a new, simply method for the extraction and frozen of the semen. We have developed a stereo-microscopic method of preparation; the gametes were obtained from the seminal vesicle. The medium containing the sperm was centrifuged at 700g for 2 min, the supernatant was removed and the precipitate diluted to a specific amount and mixed with cryoprotectant agents (CPA) 3: 2: DMSO25%+BSS+egg yolk; DMSO10%+BSS+egg yolk, DMSO25%+Harbo+egg yolk, DMSO10%+Harbo+egg yolk. We found that the DMSO mixture is non-toxic for sperm. 10 $\mu$ l of the semen mixed with CPA was filled into a 0.25 $\mu$ l of straw with 80 $\mu$ l of diluent and 10 $\mu$ l of CPA. After incubation on ice, one half of the samples were placed directly in the liquid nitrogen container and the other half was cooled to -40°C with a programmable freezer at 3°C/min. The thawing was done in a 38.5°C water bath. The samples were incubated at 38.5°C for 10 minutes and then the motility was re-examined by phase contrast microscopy. Semen mixed with 10% DMSO solution were killed by freezing, while 80% of sperm mixed with 25% DMSO solution frozen by programmed slow cooling survived the treatment but exhibited a lower motility after thawing.

**Keywords:** Honeybee, Carpathian bee, semen collection, cryopreservation, genotyping

## Bevezetés

Magyarországon 1985-ben törzskönyvezték a krajnai méhet (*Apis mellifera carnica*), majd állami elismerést kapott 2001-ben. 1994 óta a tenyésztői rendelet szerint szabályozottan folyik a kereskedelmi forgalomba kerülő méhanyák és méhek fajtabélyeg- és teljesítményvizsgálata (Horváth és mtsai. 2013). Komoly veszélynek van kitéve a mézelő méh-populációk biológiai diverzitása, mivel nemzetközileg kereskednek a méhanyákkal és méhcsaládokkal, aminek következtében a fajok eredeti élőhelyén idegen genetikai anyag jelenik meg (Wegener, Bienefeld 2012). Előfordul, hogy a méhészek külföldi méhtenyésztőktől vásárolnak méhanyákat. Az idegen genetikai anyagot hordozó olasz és buckfast hibrid méhanyák veszélyeztetik a krajnai méh fenntartását. Az olasz méh könnyen keveredik a krajnai méhkel, mivel genetikailag közel állnak egymáshoz. Ettől eltérően a buckfast hibrid különböző tájegységekről és klímájú helyekről származik, közel-keleti és afrikai fajtákat is felhasználtak létrehozása során (Pritsch 2005), ezért a krajnai fajtához képest sok idegen tulajdonságot hordoz.

A hazánkban honos kiváló termelési és viselkedési tulajdonságokkal rendelkező krajnai méhfajta (*Apis mellifera carnica pannonica*) fenntartása és génmegőrzése nemzeti érdek (Zajác és mtsai. 2017).

Cikkünkben bemutatott kísérleteink a krajnai méh *ex-situ* fajvédelmét szolgáló módszerek fejlesztésére irányultak. A spermabank kialakítása céljára elsőként kidolgoztunk egy sztereomikroszkópos preparációs módszert, hogy minél tisztább és jobb minőségű örökítő anyaggal tudjunk dolgozni. A sperma minták minőségét szubjektív alapon bíráltuk el, továbbá adaptáltuk egy méhspermán még nem alkalmazott fénymikroszkópos festési eljárást is, amellyel jól vizsgálható a spermiumok morfológiája (Čeřovský 1976). Azon heréket, melyeket kiválasztottunk a mélyhűtési eljárás kidolgozására genetikai vizsgálatnak vetettük alá, hogy tisztában legyünk vele, milyen genetikai anyagot tárolunk el. A kipreparált méh sperma mélyhűtésére Hopkins módszerét adaptáltuk (Hopkins 2010).

## Anyag és módszer

### *A kísérleti állatok begyűjtése*

A kísérleti állatok Gyömrőről származtak, egy őstermelői méhészetből. Alkalmanként a 30-50 db herét minden alkalommal délelőtt, a kísérlet napján gyűjtöttük be. A méheket, a kaptár megbontása után a keretekről szedtük össze a lehető legkíméletesebb módon, kézzel, egyedenként, és szállítódobozban szállítottuk őket a laboratóriumba.

### *A spermiumok preparálásának kidolgozása*

A preparálás során eltávolítottuk a here fejét, majd torát. A potroh háti oldalán hosszában felvágtuk a szelvényeket, így a belső szervek láthatóvá váltak. Jól elkülöníthető a *mucosa gland* (MG) - nyálkamirigy, és az ahhoz szorosan kapcsolódó *szeminális vezikulum* (SV) - ondóhólyag, amely a spermiumokat tartalmazza. A kiemelt SV-t párosával, egy Petri-csészében előkészített 50µl-nyi 38,5°C-os spermahígító (BSS -Bee Semen Solution, Harbo) cseppbe helyeztük. Ezt követően a Petri-csésze körkörös mozgatásával homogenizáltuk az elegyet, végül pipettával felszívtuk és egyedileg, PCR csőben tároltuk el a mintákat. Motilitásukat fáziskontraszt mikroszkóppal ellenőriztük.

### *Sperma mélyhűtés, felolvasztás*

Hopkins (2010) méhsperma gyors, illetve programozott fagyasztási módszerét kíséreltük meg adaptálni, ahol ugyanazt a CPA koncentrációt alkalmazva hasonlítottuk össze a két különböző hűtési sebesség hatását. A kipreparált spermiumokat tartalmazó médiumot 2 percig 700 g-vel centrifugáltuk, a felülúszót eltávolítottuk, és a csapadékot 30µl-re hígítottuk. Az ily módon előkészített, hígított spermiumokat 3:2 arányban kevertük össze a CPA-val. A következő CPA-kat használtuk:

1. DMSO25%+BSS+tojássárgája
2. DMSO10%+BSS+tojássárgája
3. DMSO25%+Harbo+tojássárgája
4. DMSO10%+Harbo+tojássárgája

A 10µl-nyi CPA-val kevert spermát 80µl hígítót, 10µl CPA-t tartalmazó 0,25ml-es műszalmákba töltöttük, majd a szalmákat tört jégre helyeztük 10mp-re. Ezt követően a minták egyik felét közvetlenül a folyékony nitrogént (LN<sub>2</sub>) tartalmazó tartályba helyeztük; a másik felét

pedig először egy programozható fagyasztógépbe (Bio-Cool IV40 - Controlled Rate Freezer), ami 0°C-ról, 3°C/perces sebességgel, -40°C-ig hűtötte a spermiumokat.

A felolvasztás során 38,5°C-os vízfürdőbe helyeztük a szalmákat. A tartalmukat egy-egy PCR- csőben gyűjtöttük össze, majd termosztátba (38,5°C) helyeztük őket 10 percre.

### Čerovský festés

A spermiumok megfestése révén vizsgálhatjuk fénymikroszkóppal a spermiumok morfológiáját. Čerovský festési eljárás során először kenetet készítettünk egy tárgylemezen. A fixáláshoz három különböző eljárást alkalmaztunk:

1. a sperma sósav nélküli fixálása
2. a sperma fixálása sósavval 1 percig
3. a sperma fixálása sósavval 2 percig

A következő lépésben 20 másodpercre kongóvörös oldatba, majd 2 másodpercre vizes kristályibolya oldatba helyeztük a lemezeket. Végezetül leöblítettük desztillált vízzel és levegőn megszáritottuk.

### Genetikai vizsgálatok

Az anya genotipizálásához egy-egy anyától 20 db here lábait preparáltuk ki, majd teljes genomi DNS-t izoláltunk belőlük Genomic DNA Mini Kit (Tissue) (Geneaid Biotech Ltd, Tajvan) segítségével. Az egy kaptárból származó herék lábait egy 1,5 ml-es eppendorf csőbe tettük, majd mikro mozsártörővel összetörtük ezeket. Az így kapott törmelék képezte a DNS kivonás kiinduló anyagát. Az izolált DNS mennyiségét és minőségét ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., USA) spektrofotométerrel ellenőriztük.

A mikroszatellitiek felsokszorosításához multiplex PCR reakcióban egy optimalizált recept alapján, fluoreszcensen jelölt primereket használtunk. A reakciókat 20µl végtérfogatban mértük össze és LifeECO PCR készülékben (Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd, Kína) történt a reakció (1. ábra).

**1. ábra: PCR program összetétele, hő profilja**

Apis plex I	konc.	1 reakció (µl)
Templát	50ng/ul	3
Multiplex Master Mix	2×	10
A7 primer mix	10 µM	0,1
A88 primer mix	10 µM	0,08
A113 primer mix	10 µM	0,06
B24 primer mix	10 µM	0,2
Ap28 primer mix	10 µM	0,2
Ap43 primer mix	10 µM	0,5
Ap55 primer mix	10 µM	0,55
Ap66 primer mix	10 µM	0,05
A35 primer mix	10 µM	1
Desztillált víz		4,26
Végtérfogat		20

Apis plex II	konc.	1 reakció (µl)
Templát	50ng/ul	3
Multiplex Master Mix	2×	10
A25 primer mix	10 µM	0,2
Ac011 primer mix	10 µM	0,1
Ap90 primer mix	10 µM	0,2
Ap103 primer mix	10 µM	0,06
Ap226 primer mix	10 µM	0,06
Ap238 primer mix	10 µM	0,5
Ap243 primer mix	10 µM	0,2
Ap249 primer mix	10 µM	0,1
A14 primer mix	10 µM	0,35
A28 primer mix	10 µM	0,06
A107 primer mix	10 µM	0,25
Desztillált víz		4,92
Végtérfogat		20

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

Figure 1: PCR program, the programmed heat profile



Az eredményeként kapott PCR termékek méretét kapilláris elektroforézissel határoztuk meg (ABI 3100 Genetic Analyzer ; Applied Biosystems Group, USA) készüléken. A kapott allélméretek Microsoft Excel táblázatban rögzítettük. Az allélméretek felhasználásával tudtuk elvégezni a populációgenetikai elemzést, STRUCTURE szoftverrel (Pritchard és mtsai. 2000).

## Eredmények és értékelés

### *Spermiumok preparálása és mélyhűtése*

A spermiumok preparálása során megállapítottuk, hogy megfelelő minőségű és mennyiségű spermium nyerhető ezzel a módszerrel, amely alkalmas a fagyasztásra. Előnye, hogy ezzel a módszerrel a még nem teljesen ivarérett méhektől (amiknél nem sikerülhet még a provokált ejakuláció) is kinyerhetünk spermát. A módszer időigényesebb mintha a hagyományos provokált ejakulációval szeretnénk spermát nyerni, viszont a sperma sokkal tisztább, mentes a nyálkától (*mucosa*).

A mélyhűtés előkészítése során megállapítottuk, hogy a hígítás során, ha óvatosan szuszpendáljuk a spermát, nem veszít a motilitásából. A motilitási eredmények alapján a 700g-vel történő 2 percig tartó centrifugálás sem károsítja a sejteket, így ez megfelelő módszer arra, hogy az általunk meghatározott mennyiségűre tudjuk hígítani a spermát.

A gyors mélyhűtés során a Hopkins cikkéből adaptált módszer - bár az *in vitro* toxicitási teszt alapján a sejtek motilisak maradtak, hűtőben tárolás után - nem járt pozitív eredménnyel. A fagyasztási kísérlethez 8 db mintát készítettünk ebből 4db 10%- és 4db 25%-os DMSO-t tartalmazott. Azonban a felolvasztás után egyik minta sem tartalmazott élő spermiumot.

A lassú fagyasztás során fagyasztás előtt, közvetlenül a fagyasztás után, és 10 perc 38,5°C-os temperálás után is megvizsgáltuk a különböző mintákban különböző koncentrációjú CPA-t tartalmazó minták motilitását (1. táblázat).

Eredményeink szerint a 10% DMSO-t tartalmazó minták nem éltek túl a fagyasztást. Ezzel szemben a 25% DMSO-t tartalmazó minták 80%-a túlélte a fagyasztást, ennek a fele közepes, a másik fele pedig gyenge motilitást mutatott. Néhány minta esetében a felolvasztás után közvetlenül nem mozogtak a sejtek, azonban 10 perces temperálást követően elkezdtek mozogni.

### **1. táblázat: Spermiumok motilitása fagyasztás előtt és felolvasztás után**

Egyed	Friss	Motilitás	
		Fagyasztás után	
		10% DMSO	25% DMSO
1	4	0	0
2	4	0	2
3	4	0	3
4	4	0	3
5	3	0	2

1. table: Motility of sperm cells before and after freezing

Sikeresen adaptáltuk a Čerovský festési eljárást a méh spermiumokra. Megállapítottuk, hogy a mintát 2 percig kell sósavas kezeléssel fixálni, így kapjuk a legtisztább képet. Ezt a festési eljárást a már lefagyasztott, majd felolvasztott mintákon optimalizáltuk. Megállapítottuk, hogy amíg a BSS alapú fagyasztó médium esetében a minél hosszabb ideig tartó sósavas kezelés az értékelés szempontjából tisztább képet eredményezett, a Harbo alapú oldat esetében nem történt semmilyen változás. Tehát a festési eljárás során érdemes figyelembe venni, hogy milyen médiumban volt hígítva és mély hűtve a sperma. Ez a festési eljárás lehetővé teszi a spermiumok részeinek (akroszóma, fej, farok közép része, farok) morfológiai megkülönböztetését (2. ábra).

**2. ábra: Méh spermium részei: 1. akroszóma, 2. nukleusz, 3. farok középrésze, 4. farok**

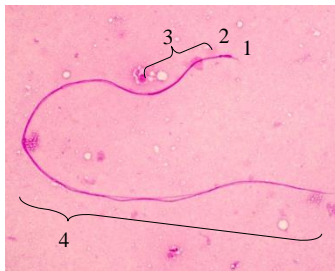


Figure 2: Parts of honey bee sperm cell: 1. acrosome, 2. nucleus, 3. midpiece, 4. tail

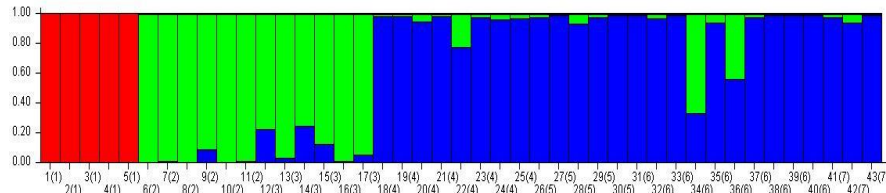
### Genetikai vizsgálatok

Tiszta genomi DNS-t sikerült izolálnunk. Előzetes tesztek alapján bizonyítottuk, hogy 20 heréből származó DNS elegendő ahhoz, hogy meghatározzuk az anya teljes genotípusát. Ehhez az anya csonkított szárnyából izoláltunk DNS-t, majd az így meghatározott genotípusát hasonlítottuk össze a here fiasításából meghatározott genotípussal.

A markerekkel amplifikált allélméreték megfelelően polimorfnak bizonyultak az egyedazonosításhoz.

A méh minták STRUCTURE analízise során, minden méh minta számításba vétele esetén, a három csoportra bontást támogatta ( $K=3$ ), amely esetben az ázsiai méh és az olasz méh vált külön az összes többi méh mintától (3. ábra). Az általunk gyűjtött mintákról tudtuk, hogy feltételezhetőleg melyik fajhoz tartoznak, ezt hasonlítottuk össze a kapott DNS profilokból származó eredményekkel. A hazai méhészetekben is előfordulnak nem tisztán krajnai méhre jellemző genotípusok, mert az anyanevelők méhei is keverednek olasz és buckfast méhekkal, amiket a genetikai vizsgálatokkal ki tudunk mutatni. Hibridnek akkor nevezzük, ha 25% felett van a két genotípus keveredése. Az általam gyűjtött három mintáról megállapítottuk, hogy krajnai genotípussal rendelkeznek. Az *ex-situ* tárolás során ez a módszer lehet a segítségünkre abban, hogy tudjuk milyen genetikai anyaggal rendelkező spermiumokat fagyasztunk le.

### 3. ábra: Genetikai profil alapján prediktált méhfélék, egyedi bontásban



K1. *A. cerana* (piros) (1-5: Ázsiai méhek Japánból), K2. *A. m. ligustica* (zöld). (6-11: buckfast méhek 2016, 12-17: olasz méhek 2016) K3. *A. m. carnica* (kék) (18-40: hazai méhészetekből származó méhek, 40-43: az általam gyűjtött minták)  
*Figure 3: Predicted bees in Apidae according to the genetic profile (shown individually)*

K1. *A. cerana* (red) (1-5: Asian bees from Japan), K2. *A. m. ligustica* (green). (6-11: buckfast bees 2016, 12-17: italian bees 2016) K3. *A. m. carnica* (blue) (18-40: samples from local breeders, 40-43: samples collected by oneself)

### Következtetések és javaslatok

Sikeresen kidolgoztunk egy spermiumpreparálási módszert, amivel a *szeminális vezikulumból* életképes, mozgó spermiumok nyerhetők ki. A minta nem kevert a nyálkával, a hímivarsejtek morfológiája jól vizsgálható fénymikroszkópos festés során, a sejtek fluoreszcens festékekkel jelölve áramlásos citometriával is vizsgálhatók. A mozgóképes sejtek alkalmasak hűtve és mély hűtve tárolásra.

Szemben a Hopkins ejakulált spermiumokkal végzett mélyhűtési kísérleti eredményeivel a 10% és 25%-os DMSO-t tartalmazó CPA-val végzett gyors mélyhűtés és a 10% DMSO-t tartalmazó CPA-val végzett programozott mélyhűtés a *szeminális vezikulumból* származó spermiumok esetén sikertelen volt.

A DMSO25%+Harbo+tojássárgája CPA-val történő programozott mélyhűtési eljárással a *szeminális vezikulumból* kinyert méh spermiumok sikerrel mély hűthetőek, a felolvasztás után mozgóképesek maradtak a spermiumok.

Megvizsgáltuk, hogy az emlős spermiumok morfológiai értékelésére alkalmas Čerovský festés alkalmas-e méh spermiumok értékelésére. A kísérleteinkben módosított fixálású Čerovský festést találtuk a gyakorlat számára ajánlhatónak.

Sikeresen genotipizáltuk a fagyasztás során felhasznált méheket, mely során megállapítottuk, hogy a krajnai méh fajtához tartoznak.

A herefiasításon keresztül az anya megölése nélkül meg tudjuk állapítani az anya genotípusát. A sikeres felolvasztás után lehetőségünk nyílik irányított keresztezések elvégzésére.

A *szeminális vezikulumból* származó spermiumok termékenyítőképességét mesterséges termékenyítés segítségével szükséges igazolni.

A membrán integritás kiértékelhetőségét a spermiumfej mérete jelentősen megnehezíti, még 100x objektív használata esetén is, ezért fluoreszcens, akroszóma épséget, illetve élő állapotot kimutató festékek használata indokolt lehet. Az ezekkel a fluoreszcens festékekkel jelölt hímivarsejtek alkalmasak lehetnek majd áramlásos citometriai vizsgálatokra is.

A mélyhűtési módszerrel tárolt hímivarsejtek termékenyítőképességét mesterséges termékenyítés segítségével szükséges igazolni.



A felolvasztást követően a mesterséges termékenyítés során a női nemi útba kerülő krioprotektív anyagoknak az anyára gyakorolt toxikus hatását is szükséges megvizsgálni.

Javasoljuk, hogy minden esetben határozzuk meg a fagyasztani kívánt méhanyák genotípusát.

### **Köszönetnyilvánítás**

Köszönjük Salvó Szidóniának, Magyar Andreának, Frank Krisztiánnak a segítségét.

A kutatást támogatta: Új Nemzeti Kiválósági Program 2017

### **Irodalomjegyzék**

- Čeřovský J. (1976): Metoda barvení kančích spermií pro morfologické hodnocení. Živoč. Vyr., 21, 361–366.
- Hopkins, B. K., C. Herr (2010): Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa. *Apidologie* 41: 548-556.
- Horváth J., Szalai T., Szalainé M. E. (2013): Hazai Pannon méhünk 2. *Méhészet* 61 (5): 10-11.
- Pritchard J., K., Stephens M., Donnelly P. J. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Pritsch, G. (2005): Kaposvári Méhésznepok. Szóbeli közlés
- Zajác E., Donkó K. S., Harka L., Hidas A., Horváth J., Szalainé M. E., Szalai T. (2017): A pannon méh (*Apis mellifera carnica pannonica*) hazai génmegőrzése., 203.-205.o., Génbanki kutatások régi használlataink védelmében Műhelytanulmányok a tudományos génmegőrzés tárgyköréből, Gödöllő
- Wegener, J., Bienefeld, K. (2012): Toxicity of cryoprotectants to honey bee semen and queens. *Theriogenology* 77(3): 600-607.