

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ  
ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ  
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΚΕΤΥΛΟ -  
ΣΥΝΕΝΖΥΜΟΥ ΤΗΣ ΑΚΕΤΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ 1 ΚΑΙ ΤΟΥ  
ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΗΣ ΑΥΞΗΤΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ ΣΕ ΦΥΛΕΣ ΠΡΟΒΑΤΩΝ»**

**ΜΑΝΟΥΣΗ ΔΟΜΝΙΚΗ**

**ΥΠΕΥΘΥΝΟΙ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ :**

**ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΧΑΤΖΗΠΛΗΣ**

**ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΛΟΥΚΟΒΙΤΗΣ**

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2018**

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

---

Πρόλογος	
.....	
.....4	
Περίληψη ..	
.....	
.....5	
Abstract	
.....	
.....7	
Εισαγωγή	
.....	
.....8	
1.Βιβλιογραφική Ανασκόπηση	10
.....	
1.1 Περιγραφή	
είδους.....	
.....10	
1.1.1 Φυλή	
Χίου.....	
.....10	
1.1.2 Φυλή Φλωρίνης Πελαγονίας	
.....	
.....13	
1.2 Νόμος Διαχωρισμού του Mendel (Mendel's Law of Segregation)	
.....	
.....16	
1.3 Ισοζύγιο Hardy-Weinberg (Hardy-Weinberg equilibrium)	
.....	
.....17	
1.4 Μοριακή Βιολογία και Γενετική	
.....	
.....19	
1.5 Εφαρμογές Μοριακής Γενετικής	
.....	
.....19	
1.5.1 Απομόνωση	
.....	
.....19	
1.5.2 Ενίσχυση	
.....	
.....20	

1.5.3 Μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης	20
1.5.4 Ανάλυση Πρωτοδιάταξης (Sequencing Analysis)	23
1.6 Γονίδια και Πολυμορφισμοί.....	25
1.6.1 Πολυμορφισμοί DNA (DNA Polymorphisms)	25
1.6.1.1 Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNP- Single Nucleotide Polymorphisms)	26
1.6.1.2 Βραχείες διαδοχικές επαναλήψεις - Μικροδορυφόροι ( Short Tandem Repeats (STR)-Microsatellites)	27
1.6.2 Γονιδιακοί τόποι ποσοτικών χαρακτηριστικών (QTL - Quantitative Trait Loci)	28
1.6.3 Γονίδιο του ακέτυλο-Coa-συνενζύμου της ακετυλοτρανσφεράσης 2 (ACAA2)	29
1.6.4 Γονίδιο του ακέτυλο-Coa-συνενζύμου της ακετυλοτρανσφεράσης 1 (ACAA1)	29
1.6.5 Γονίδιο του υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης (GHR)	30
2. Ερευνητικό Μέρος	32
2.1 Ερευνητικός σκοπός	32
2.2 Υλικά και μέθοδοι	33
2.3 Επιλογή του δείγματος	33
2.3.1 ACAA1	33

2.3.2				<i>GHR</i>
.....				
.....	34			
		2.4	Επιλογή του γενετικού τύπου	
.....				35
2.4.1				<i>ACAA1</i>
.....				
.....	34			
2.4.2				<i>GHR</i>
.....				
.....	35			
2.5				Απομόνωση DNA
.....				
.....	36			
		2.6	Εφαρμογή Ηλεκτροφόρησης	
.....				38
2.7				Ενίσχυση γονιδίων με την μέθοδο PCR και θερμοκρασιακές δοκιμές
.....				40
		2.8	Πρώτη PCR αλληλούχισης	
.....				44
		2.9	Καθαρισμός πρώτης PCR	
.....				45
		2.10	Δεύτερη αντίδραση PCR	
.....				45
		2.11	Καθαρισμός δεύτερης αντίδρασης PCR	
.....				47
2.12				Ανάλυση πρωτοδιάταξης με χρήση αυτόματου αναλυτή ABI
.....				47
		3.		Αποτελέσματα-Συζήτηση
.....				
49				
		4.		Συμπεράσματα
.....				
.....	51			
		5.		Βιβλιογραφία
.....				
.....	53			

5.1 Έντυπη Βιβλιογραφία	
.....	
53	
5.2 Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία	
.....	58
5.3 Πρωτόκολλα και Οδηγοί χρήσεως	
.....	59
5.4 Βιβλιογραφία Εικόνων	
.....	
59	

## **Πρόλογος**

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2017-2018 στο Εργαστήριο Αγροβιοτεχνολογίας και Ελέγχου Αγροτικών Προϊόντων, στο Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Δημήτριου Χατζηπλή και του επιστημονικού συνεργάτη του Εργαστηρίου Δρ. Δημητρίου Λουκοβίτη

Κύριο αντικείμενο της διπλωματικής αυτής εργασίας ήταν η ανίχνευση μονονουκλεϊκών πολυμορφισμών σε γενετικούς τόπους των γονιδίων:

- i. *Ακέτυλο – Coa - συνενζύμου της Ακετυλοτρανσφεράσης 1 (ACAA1) σε πρόβατα της φυλής Χίου.*
- ii. *Υποδοχέας αυξητικής ορμόνης (GHR) σε πρόβατα των φυλών Χίου και Φλωρίνης*

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου, Δημήτριο Χατζηπλή καθώς και τον εργαστηριακό συνεργάτη και μεταδιδακτορικό ερευνητή Δρ. Δημήτρη Λουκοβίτη για την πολύτιμη καθοδήγηση που μου παρείχαν καθώς και για την υπομονή και επιμονή που υπέδειξαν καθ'όλη την διάρκεια διεξαγωγής της παρούσας έρευνας.

## Περίληψη

Οι πολυμορφισμοί που βρίσκονται σε συγκεκριμένους γονιδιακούς τόπους, μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά οργανισμών που συνδέονται με αυτούς. Η μελέτη και βελτίωση των παραγωγικών ιδιοτήτων, αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην αιγοπροβατοτροφία αφού υψηλότερες αποδόσεις αποτελούν έναν από τους κύριους οικονομικούς στόχους της παραγωγής. Η σύνδεση των γονιδίων ACAA1 και GHR με την ποσότητα και την ποιότητα (αντίστοιχα) της γαλακτοπαραγωγής σε δύο εγχώριες φυλές, αποτέλεσε το αντικείμενο μελέτης της συγκεκριμένης έρευνας.

Από το σύνολο της αλληλουχίας του γονιδίου ACAA1, στο 19<sup>ο</sup> χρωμόσωμα του προβάτου επιλέχθηκε για διερεύνηση της αλληλουχίας μόνο το 4<sup>ο</sup> εξόνιο, σε 40 προβατίνες της φυλής Χίου γνωστής γενεαλογίας - τμήμα ευρύτερου πληθυσμού που προηγουμένως είχε αναλυθεί ως προς το γονίδιο του Ακέτυλο - συνενζύμου της Ακετυλοτρανσφεράσης 2 (ACAA2) - με σκοπό τη διερεύνηση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών και των κατ' επέκταση πιθανών σχέσεων μεταξύ των ευρημάτων και προηγούμενων ερευνών στο γονίδιο ACAA2. Για το γονίδιο GHR, οι διαθέσιμοι πόροι επέτρεψαν την μελέτη μεταξύ των δύο φυλών με μόνο 12 προβατίνες φυλής Πελαγονίας (Φλωρίνης) και 12 από τα προεπιλεγμένα 40 Χιώτικα πρόβατα, σε μια μικρής κλίμακας συγκριτική έρευνα πολυμορφισμών στο 10<sup>ο</sup> εξόνιο του χρωμοσώματος 16, μεταξύ των δύο φυλών. Όπως για τον επιλεγμένο πληθυσμό της φυλής Χίου, το σύνολο των επιλεγμένων προβάτων φυλής Φλωρίνης αποτελούταν από άτομα μη- συγγενικά, γνωστής γενεαλογίας. Για την εργαστηριακή ανάλυση των δειγμάτων, έγινε χρήση των μεθόδων της Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR και Gradient PCR), της Ηλεκτροφόρησης και της ανάλυσης Πρωτοδιάταξης τμημάτων DNA (Sequencing).

Τα αποτελέσματα της διερεύνησης στο 4<sup>ο</sup> εξόνιο των ζώων για το γονίδιο της *Ακετυλοτρανσφεράσης 1* απέδειξαν ότι δεν εμφανίζονται πολυμορφισμοί στο συγκεκριμένο γενετικό τόπο, ενώ μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (G>A) εντοπίστηκε στο 10<sup>ο</sup> εξόνιο του 16<sup>ου</sup> χρωμοσώματος για το γονίδιο του GHR και στις δύο υπό εξέταση φυλές. Λόγω του μικρού μεγέθους του δείγματος του δεύτερου τμήματος της έρευνας, η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι ενώ παρατηρήθηκε ένα έντονο γονοτυπικό μοτίβο μεταξύ των δύο ακραία επιλεγμένων πληθυσμών, η διαφορά τους

δεν φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντική. Η έρευνα θα πρέπει να συνεχιστεί σε μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος από τις δύο ή και περισσότερες φυλές έτσι ώστε να επιτευχθεί η απαραίτητη στατιστική ισχύς που θα δώσει και δυνατότητες ερμηνείας τυχόν γονιδιακών επιδράσεων σε χαρακτήρες με οικονομικό ενδιαφέρον.

## **Abstract**



Mutations located in specific loci throughout the genome, can significantly affect phenotypic traits of individuals. The study and improvement of phenotypic and therefore productive traits is a key factor in sheep breeding, as higher yields constitute one of the main financial targets/aims of the production. The relationship between the genes - namely ACAA1 and GHR - and quantity and quality (respectively) of milk yield in two different sheep breeds, has been the subject of the following study.

Concerning the ACAA1 gene, the 4<sup>th</sup> exon of ovine chromosome 19 was studied on 40 Chios breed ewes of known genealogy (pedigree) - part of a larger population from a previous research on the effect of single nucleotide polymorphisms of *Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2* on milk yield. Concerning the *GHR* gene, the resources available allowed the study of two separate populations, consisting of only 12 Pelagonia breed ewes and 12 of the formerly mentioned Chios breed population individuals, on a small-scale research and comparison of single nucleotide polymorphisms located in the 10<sup>th</sup> exon of the 16<sup>th</sup> chromosome between the two breeds. As already stated, the ewes from both breeds were not related and were of known genealogy as well.

The results of the study concerning the gene ACAA1, showed that no nucleotide polymorphisms were located on the 4<sup>th</sup> exon of ovine chromosome 19 for the Chios breed only population, whereas an SNP (G>A) was located in the 10<sup>th</sup> exon of ovine chromosome 16 in both breeds. Due to the small sample size of the second part of the study, the statistical analysis of the results showed that while a bold genotypic pattern variance was being observed between the two differently selected populations, the difference was not significant. Nevertheless, further research with larger samples from both breeds could increase the statistical power and give us stronger arguments of any putative gene effects on traits of interest.

## **Εισαγωγή**

Στην Ελλάδα, όπως και σε πολλές χώρες της Μεσογείου, η προβατοτροφία αποτελεί ίσως τον πιο σπουδαίο κτηνοτροφικό κλάδο, καθώς λόγω των γεωμορφολογικών χαρακτηριστικών της χώρας, οι διαθέσιμες βοσκές, κατά το μεγαλύτερο μέρος της έκτασης τους, αξιοποιούνται καλύτερα από μικρά μηρυκαστικά, όπως τα πρόβατα, συγκριτικά με άλλα είδη παραγωγικών ζώων. Κύρια οικονομική πρόσοδο αποτελεί η γαλακτοπαραγωγή καθώς και η παραγωγή υψηλής ποιότητας τυροκομικών προϊόντων ΠΟΠ και ΠΕΓ ( Λάγκα, 2005, Carta et al., 2009). Για τους παραπάνω λόγους, η βελτίωση της γαλακτοπαραγωγής, τόσο ως προς την ποσότητα καθώς επίσης και την λιποπεριεκτικότητα, εξακολουθεί να αποτελεί το πιο σημαντικό κριτήριο βάση του οποίου γίνεται η επιλογή του παραγωγικού πληθυσμού σε μια εκτροφή. (Ramón et al., 2010)

Στην Ευρώπη, η πρώτη εφαρμογή της επιλογής απαντάται τον 18<sup>ο</sup> αιώνα στο Ηνωμένο Βασίλειο όπου ο Sir Robert Bakewell (1725-1795) σύστησε για πρώτη φορά την διατήρηση γενεαλογικών βιβλίων και βιβλίων ατομικών αποδόσεων των ζώων καθώς και τον προγονικό έλεγχο (αν και σε πρώιμο ακόμη στάδιο) στον κτηνοτροφικό κόσμο. Με τα βιβλία γενεαλογίας και αποδόσεων, ήταν εφικτή μια πιο αντικειμενική επιλογή των καλύτερων παραγωγικά ατόμων, ενώ μέσω του προγονικού ελέγχου, μπορούσε να επιτευχθεί η επιλογή του παραγωγικά ικανότερου πατέρα, για χρήση στη δημιουργία των μελλοντικών γενεών. (Simm, 1998)

Αρκετά χρόνια αργότερα, η στατιστική ανάλυση μίας δεκαετίας πειραμάτων (1856-1865) του Gregor Johan Mendel, οδήγησε τον ίδιο στην πρωτοφανή, για τον επιστημονικό κόσμο, διατύπωση του ορισμού «χαρακτήρας» καθώς και στην καθιέρωση νόμων για την περιγραφή του τρόπου και της συχνότητας με την οποία εμφανίζονται οι συγκεκριμένοι χαρακτήρες ανά τις γενεές διασταυρώσεων.

*"We must therefore regard it as certain that exactly similar factors must be at work also in the production of the constant forms in the hybrid plants."*

-Mendel, 1866

Τα ευρήματα του Mendel αποτέλεσαν δοκίμιο για την μελέτη της φαινοτυπικής έκφρασης της γενετικής πληροφορίας και του τρόπου που αυτή κληρονομείται, και έναυσμα για τις γενεές ερευνητών που ακολούθησαν. Ο ίδιος καθιερώθηκε στον επιστημονικό κόσμο ως ο «πατέρας» της γενετικής.

Ο 19ος αιώνας υποδέχθηκε την δημιουργία των πρώτων χρωμοσωμικών χαρτών ,από τον Thomas Hunt Morgan, καθώς και την παρουσίαση του μοντέλου της διπλής έλικας του DNA από τους Watson και Creek. Η κατανόηση και μελέτη του DNA κατάφερε να πραγματοποιηθεί πλέον σε μοριακό επίπεδο, ενώ μέσω της ανακάλυψης μεθόδων ανάγνωσης, κατάτμησης και ενίσχυσης, άτομα που έφεραν συγκεκριμένα ,παραγωγικώς επωφελή, τμήματα στο γονιδίωμα τους, μπορούσαν τώρα να διακριθούν ως ανώτερης γενετικής αξίας υλικό. Η επιλογή των καλύτερων ζώων ως γεννήτορες έφερε ως αποτέλεσμα την γενετική βελτίωση των ειδών και συνεπώς των παραγωγικών τους χαρακτηριστικών.

Παρόλο που η Ελλάδα κατατάσσεται στην τρίτη θέση πανευρωπαϊκά ως προς τον πληθυσμό της σε πρόβατα, οι ατομικές αποδόσεις των ζώων αυτών εξακολουθούν να είναι από τις χαμηλότερες συγκριτικά με τα υπόλοιπα κράτη μέλη. Το γεγονός αυτό οφείλεται τόσο στην ελλιπή έρευνα για την αναγνώριση του γενετικού προφίλ των εδώδιμων φυλών, όσο και στην απουσία εφαρμογής προγραμμάτων επιλογής και γενετικής βελτίωσης των πληθυσμών.

## **1. Βιβλιογραφική ανασκόπηση**

### **1.1 Περιγραφή είδους**

#### **1.1.1 Φυλή Χίου**

##### Προέλευση:

Καταγωγή του Χιώτικου πρόβατου θεωρείται το νότιο πεδινό τμήμα της ομώνυμης νήσου. Πιθανολογείται πως η φυλή έχει προκύψει από διασταυρώσεις ντόπιων ομοιομάλλων λεπτόουρων προβάτων με αναμικτόμαλλα πλατύουρα πρόβατα από την Μικρά Ασία (Δημητριάδης, 1957, Mason, 1967, Brooke and Ryder, 1978, Zervas et al., 1988, Ζυγογιάννης, 1999, Χατζημηνάογλου 2001). Ωστόσο, ο Αριστοτέλης σκιαγραφεί τη φυλή της Χίου το 450 π.Χ. στο σύγγραμμα του *Ιστορία Ζώων*, και συνεπώς είναι πολύ πιθανόν η φυλή της Χίου να προϋπήρχε ως ξεχωριστή φυλή εδώ και πάρα πολλά χρόνια.

Στατιστικά δεδομένα (Αιγαίον, 1935) αναφέρουν ότι το 1935, στο νησί εκτρέφονταν περίπου 13.000 πρόβατα της φυλής, ενώ σύμφωνα με τα δεδομένα του υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, το 1985 , η φυλή αριθμούσε μόνο 1400 ζώα και θεωρούταν ως σπάνια φυλή.

Σήμερα, ο εκτρεφόμενος πληθυσμός στο νησί ανέρχεται περίπου στα 200 ζώα , τα οποία εκτρέφονται ως οικόσιτα (Συνεταιρισμός προβατοτρόφων φυλής Χίου «Μακεδονία», 2018 ). Με την εφαρμογή προγραμμάτων γενετικής βελτίωσης και την συνεργασία εκτροφέων της φυλής Χίου, ο πληθυσμός αυξήθηκε στα 86.000 ζώα εκτρεφόμενα από 322 εκτροφείς στους νομούς Κιλκίς, Μαγνησίας, Πέλλας, Θεσσαλονίκης, Χαλκιδικής, Σερρών, Ημαθίας, Έβρου, Γρεβενών, Βοιωτίας, Πιερίας, Καρδίτσας και Τρικάλων (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και τροφίμων, 2018).

##### Μορφολογικά Χαρακτηριστικά:

Πρόκειται για ένα μεγαλόσωμο ζώο με ευθεία ή ελαφρώς κοίλη νωτιαία γραμμή .Το ύψος ακρωμίου του κυμαίνεται μεταξύ 70-76 εκατοστά για τις προβατίνες και 79-84 εκατοστά για τα κριάρια. Το σωματικό βάρος είναι 50-70 κιλά για τα θηλυκά και 65-95 για τα αρσενικά. Ο χρωματισμός είναι λευκός με μελανές κηλίδες ποικίλης έκτασης

γύρω από τα μάτια, τα αυτιά, τη μύτη, την κοιλιά, τα άκρα, το όσχεο και τον μαστό. Συχνά όλο το πρόσωπο είναι μαύρο. Νύχια και αρθρώσεις είναι μελανά και ως χαρακτηριστικό της φυλής θεωρείται η ακρομελανία. (Συνεταιρισμός προβατοτρόφων φυλής Χίου «Μακεδονία», 2018)

Η κεφαλή του χιώτικου πρόβατου είναι λεπτοφυής, κωνική με σχετικά μακρύ πρόσωπο. Τα αυτιά σχετικά μεγάλα, κατευθύνονται προς τα πλάγια και κάμπτονται ελαφρά προς τα κάτω. Το επιρρίνιο είναι κυρτό. Τα άκρα του είναι ιδιαίτερα υψηλά, λεπτά και ευθύγραμμα, αλλά ευαίσθητα σε ανώμαλες επιφάνειες. Η λεκάνη είναι επικλινή, χαρακτηριστικό προβάτων γαλακτοπαραγωγής. Οι προβατίνες είναι κυρίως ακέρατες με ένα ποσοστό 30% των θηλυκών, στα οποία παρατηρούνται υποτυπώδη κέρατα. Τα αρσενικά φέρουν ισχυρά, ανεπτυγμένα, μαύρα, ελικοειδή κέρατα. Η ουρά είναι κωνοειδής, πλάτους 9-12 εκατοστά στη βάση της και φθάνει μέχρι το ακροτάρσιο. Η διάπλαση τα ουράς αποτελεί μειονέκτημα της φυλής επειδή δυσκολεύει την φυσική οχεία και το άρμεγμα των ζώων. Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων αυτών πολλοί εκτροφείς κόβουν την ουρά των αμνάδων λίγες μέρες μετά την γέννηση τους (3<sup>η</sup> με 4<sup>η</sup> μέρα).

Ο μαστός των θηλυκών είναι κατά κανόνα πολύ αναπτυγμένος, με μικρές θηλές και συχνά δεν παρουσιάζει καλή πρόσφυση με αποτέλεσμα ο μαστός να είναι κρεμάμενος και ιδιαίτερα κατά το τελευταίο στάδιο της κύησης και το πρώτο διάστημα γαλουχίας, να αγγίζει το έδαφος (Ψηφίδη 2010, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων, 2018).



*Εικόνα 1 Πρόβατα της φυλής Χίου*

#### Παραγωγικά χαρακτηριστικά:

Το Χιώτικο πρόβατο αποτελεί ζώο υψηλών αποδόσεων ενώ σε διεθνές επίπεδο η φυλή κατατάσσεται μεταξύ των πιο αξιόλογων φυλών προβάτων αφού η εμπορεύσιμη γαλακτοπαραγωγή κυμαίνεται για τις προβατίνες της 1<sup>ης</sup> γαλακτικής περιόδου από 200 έως 250 kg, ενώ για τα ζώα που βρίσκονται στην 2<sup>η</sup> γαλακτική περίοδο και έπειτα, υπάρχουν καταγραφές έως και 600 kg. Κατά μέσο όρο η διάρκεια της αμελκτικής περιόδου ορίζεται περίπου στις 210 μέρες. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι υπό κατάλληλες συνθήκες και σωστή διαχείριση και αξιοποίηση γενετικού υλικού, η υψηλή απόδοση γαλακτοπαραγωγής μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 6 χρόνια (Συνεταιρισμός προβατοτρόφων φυλής Χίου «Μακεδονία», 2018 ).

Η φυλή Χίου ανήκει στα ομοιόμαλλα πρόβατα. Η ποιότητα του ερίου δεν είναι ιδιαίτερα καλή καθώς ποικίλει από αδρά ομοιόμαλλο έως αναμικόμαλλο αλλά και η ποσότητα του είναι χαμηλή. Το έριο καλύπτει ολόκληρο το σώμα εκτός από το κεφάλι, τα τμήματα του τραχήλου και του κορμού, τα άκρα μέχρι τον καρπό και τον ταρσό. Εμφανίζονται και ζώα με την κοιλιά ελαφρώς καλυμμένη. Παραλλακτικότητα παρουσιάζει, επίσης, η πυκνότητα του πόκου και το μήκος του πλοκάμου ενώ η απόδοση ανά κουρά αγγίζει τα 1,5- 2,2kg μαλλιού κλάσης CD/D.

Σε ότι αφορά την κρεοπαραγωγική ικανότητα, η ποσότητα παραγόμενου κρέατος είναι σημαντική. Οι μονόδυμοι αμνοί κατά την γέννηση έχουν μέσο βάρος 4,5 kg, ενώ οι δίδυμοι 4 kg. Στο στάδιο γαλουχίας διάρκειας 8 εβδομάδων, η μέση ημερήσια αύξηση (Μ.Η.Α) ανέρχεται σε 240 και 215 g, αντίστοιχα. Αρσενικοί αμνοί εντατικά παχυνόμενοι σε ηλικία 3-4 μηνών ζυγίζουν κατά μέσο όρο 30 kg (Μ.Η.Α.= 245 g ). Παρά την κρεοπαραγωγική τους ικανότητα, το σφάγιο δεν είναι ικανοποιητικό αφού έχει μεγάλη εναπόθεση λίπους και κακή σωματική διάπλαση. ( Κάτανος κ.α., 2011, Ζυγογιάννης, 1999)

#### Αναπαραγωγική ικανότητα:

Τα θηλυκά παρουσιάζουν πρώιμη ενήβωση και πολύ μικρή άνιστρη περίοδο παρουσιάζουν έντονη πρωιμότητα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αναπαραγωγή από την ηλικία των 8 μηνών. Οι νεαροί κριοί θεωρούνται κατάλληλοι για είσοδο στην αναπαραγωγική διαδικασία στους 8 μήνες. Η μέση ηλικία του πρώτου τοκετού είναι περίπου 18 μήνες και το 90,5% των θηλυκών γεννάει για πρώτη φορά στο δεύτερο έτος της ηλικίας τους.

Χαρακτηριστικό των προβατίνων αποτελεί ο διφορισμός, η δυνατότητα δηλαδή να γεννήσουν δύο φορές μέσα στο ίδιο έτος. Ο δείκτης πολυδυμίας κυμαίνεται μεταξύ 1,44-1,70 στον πρώτο τοκετό και από 1,70 έως 2,00 στους μετέπειτα και η συχνότητα γέννησης τριδύμων αρνιών είναι υψηλή. (Κάτανος κ.α., 2011 , Ζυγογιάννης, 1999, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2018 )

#### **1.1.2 Φυλή Πελαγονίας (Φλώρινας)**

##### Προέλευση

Η φυλή παρουσιάζει πολλά κοινά με τις φυλές Κύμης και Γλώσσας Σκοπέλου και υπάρχει η άποψη ότι όλα σχεδόν τα ζώα της φυλής Πελαγονίας (Φλώρινας) προέρχονται από τη φυλή Χαλκιδικής, η οποία έχει πλέον εξαφανιστεί. Λόγω των αδικαιολόγητων και ανεπιτυχών προσπαθειών διασταύρωσης των αυτόχθονων φυλών (συμπεριλαμβανομένης και της φυλής Πελαγονίας) με βελτιωμένες, ξενικές φυλές προς αύξηση της εδώδιμης γαλακτοπαραγωγής, το μεγαλύτερο μέρος του καθαρόαιμου πληθυσμού της φυλής έχει αντικατασταθεί. Ως συνέπεια, διατηρήθηκαν πολύ ελάχιστα

ποίμνια, και αυτά με πολύ μικρό πληθυσμό καθαρόαιμων απόμων. Σήμερα, εκτρέφονται περισσότερα από 1000 καθαρόαιμα πρόβατα της φυλής από 2 κύριους εκτροφείς στη Σιάτιστα και στην Λευκοπηγή Κοζάνης και από εθνικούς φορείς όπως το Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Φλώρινας, το Ινστιτούτο Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής στην Παραλίμνη Γιαννιτσών καθώς και το Πρότυπο Κέντρο Κτηνοτροφίας στη Βλάστη Κοζάνης.



Μορφολογικά χαρακτηριστικά:

Εικόνα 2 Πρόβατο φυλής Πελαγονίας (Φλωρίνης)

Το σώμα είναι μετρίου έως μακρού μήκους και μετρίου εύρους με ευθύγραμμη νωτιαία γραμμή. Το ύψος ακρωμίου στις προβατίνες κυμαίνεται από 63-70 εκατοστά, ενώ στους κριούς από 75 έως 82 εκατοστά. Το σωματικό βάρος του ενήλικου θηλυκού ορίζεται στα 55 με 65 kg και των κριών στα 75 με 82 kg. Ο χρωματισμός του σώματος είναι λευκός ενώ ένα μικρό ποσοστό ζώων φέρει και μαύρες κηλίδες. Τα περισσότερα πρόβατα φέρουν μελανό δακτύλιο γύρω από τους οφθαλμούς, ο οποίος δεν είναι πάντοτε ολοκληρωμένος και ποικίλλει σε μέγεθος, ενώ πολλά από αυτά φέρουν μαύρες κηλίδες στα αυτιά και ορισμένα στην άκρη του στόματος και στα άκρα. Μικρό ποσοστό ζώων είναι εξολοκλήρου λευκά.

Το κεφάλι του προβάτου είναι μεσαίου έως μεγάλου μεγέθους, τριγωνικό με ελαφρά κυρτή μύτη και αυτιά μετρίου μεγέθους με πλάγια κατεύθυνση. Τα άκρα είναι μέτρια μέχρι υψηλά, λεπτά και ισχυρά με μαύρες χηλές.



Τα αρσενικά φέρουν στην πλειοψηφία τους μεγάλα και ισχυρά κέρατα. Οι προβατίνες σε ποσοστό 30% φέρουν μικρά και αδύναμα κέρατα. Έχουν ουρά λεπτή, με χαμηλή έκφυση, πλούσια σε μαλλί και μήκος που φτάνει τα 33 εκατοστά. Το πλάτος της ουράς είναι 6.5 εκατοστά.

Ο μαστός είναι κανονικός, με καλή πρόσφυση, πολλές φορές σφαιρικός, συνήθως με κατακόρυφες θηλές, σωστά τοποθετημένες. Είναι ανοιχτού χρώματος και σπανιότερα καστανός ή ανοιχτόχρωμος με καστανές κηλίδες.

#### Αναπαραγωγικές Ιδιότητες:

Η φυλή Φλώρινας χαρακτηρίζεται ως πρώιμη φυλή. Η περίοδος των οχειών ξεκινά τον μήνα Ιούλιο και διαρκεί μέχρι το τέλος Οκτωβρίου. Οι αμνάδες της φυλής ενηβώνονται σε μεγάλο ποσοστό (96,92%) κατά το πρώτο έτος της ηλικίας τους και μπορούν σε ηλικία 8 μηνών να μπουν στην αναπαραγωγή. Ο δείκτης πολυδυμίας κυμαίνεται από 1,2-1,5 αρνιά ανά τοκετό. Οι τοκετοί των ενήλικων ζώων κατανέμονται με μεγαλύτερη συχνότητα στον μήνα Ιανουάριο, ενώ οι τοκετοί των αμνάδων κατανέμονται σε ένα μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, από τον Δεκέμβριο μέχρι και τον Μάρτιο. Η φυλή παρουσιάζει αρκετά υψηλό ποσοστό γονιμοποίησης, ανερχόμενο στο 84,4%. Τα ζώα της φυλής εμφανίζουν οίστρο σε διάστημα περίπου  $88,51 \pm 66,88$  ημερών μετά τον τοκετό. Το διάστημα αυτό ελαχιστοποιείται για τις προβατίνες που γεννούν πρώιμα (Νοέμβριο - Δεκέμβριο) και αυξάνεται για τα όψιμα θηλυκά.

#### Παραγωγικά Χαρακτηριστικά:

Το σωματικό βάρος των αρνιών κατά τον απογαλακτισμό που γίνεται σε ηλικία 42 ημερών είναι περίπου 13 κιλά. Από τα στοιχεία του ΕΛΓΟ, ο μέσος όρος της πραγματικής γαλακτοπαραγωγής (εμπορεύσιμης) κυμαίνεται στα  $198,96 \pm 56,61$  kg. Κατά το διάστημα αυτό, η μέγιστη γαλακτοπαραγωγή που παρατηρήθηκε σε ποίμνιο της φυλής ήταν 257,76 kg σε 180 ημέρες. Αναλύσεις γάλακτος, έδειξαν ότι η μέση λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος της φυλής ανέρχεται στο 6,73%.

Όσον αφορά την κρεοπαραγωγική της ικανότητα, η φυλή έχει καλή αυξητική ικανότητα καθώς και καλή απόδοση σε σφάγιο. Τα ζώα φυλής Φλωρίνης έχουν άριστη μυϊκή ανάπτυξη και ελάχιστη εναπόθεση υποδόριου λίπους, για αυτό και μπορούν να

σφαγούν σε ανώτερο των 15 κιλών σωματικό βάρος. Τα δεδομένα αυτά καταστούν την εκτροφή της συγκεκριμένης φυλής μεταξύ των επωφελέστερων, ως προς την κρεοπαραγωγική κατεύθυνση. (Χριστοδούλου et al, 2006)

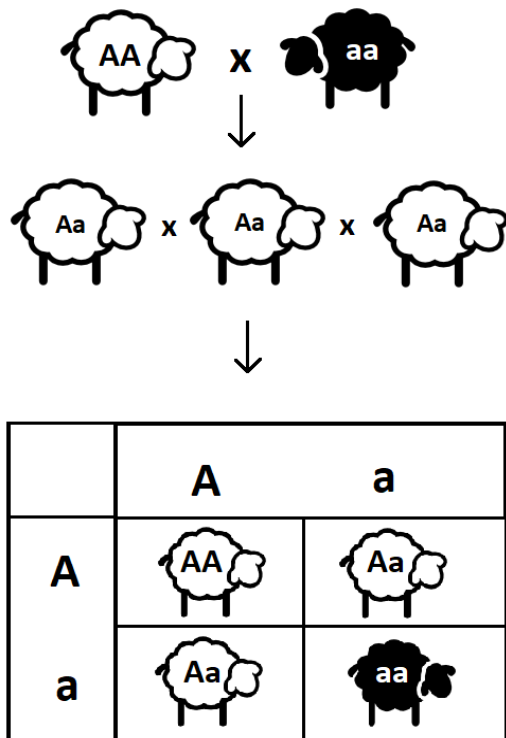
#### Ιδιαιτερότητες φυλής:

Η φυλή αυτή εκτρέφεται σε πεδινές περιοχές με πλούσιους βοσκότοπους όπου ταυτόχρονα εκτρέφονταν και άλλες πιο παραγωγικές φυλές γεγονός που υπήρξε και αιτία της συρρίκνωσης της φυλής. Παρόλα αυτά, τα πρόβατα της φυλής Πελαγονίας χαρακτηρίζονται ως ζώα λιτοδίαιτα και είναι πολύ ανθεκτικά στις δυσμενείς εδαφοκλιματικές συνθήκες. Μπορούν να αξιοποιήσουν τους ορεινούς και ημιορεινούς βοσκοτόπους με μεγάλη εργονομία και επιδεικνύουν σημαντική αντοχή αφού μπορούν να διανύσουν μεγάλες αποστάσεις για την εύρεση της τροφής τους. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις, ότι το πρόβατο της φυλής Πελαγονίας είναι σημαντικά ανθεκτικό σε μεταδοτικά νοσήματα, όπως μελιταίο πυρετό, ποδοδερματίτιδα, κοινούρωση (βούρλα), μαστίτιδα, κ.λπ. Σύμφωνα με τα στοιχεία της εφαρμογής προγράμματος εξυγίανσης των ποιμνίων προβάτων του Ινστιτούτου Κτηνοτροφίας Γιαννιτσών, από την Προϊούσα Πνευμονία (*Maedi Visna*), το πρόβατο της φυλής Πελαγονίας παρουσιάζεται αρκετά ανθεκτικό έναντι αυτής της νόσου. Με βάση τα αποτελέσματα των διαδοχικών ορολογικών εξετάσεων στα ποίμνια προβάτων του Ινστιτούτου Κτηνοτροφίας Γιαννιτσών, η φυλή συγκριτικά με τη φυλή Χίου και τις διασταυρώσεις της με το πρόβατο Φριςλανδίας, παρουσίασε σημαντικά μικρότερο ποσοστό προσβολής, 25,2% έναντι 52,8% (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2018).

### **1.2 Νόμος του διαχωρισμού του Mendel (Mendel's Law of Segregation)**

Σύμφωνα με τον νόμο του διαχωρισμού του Mendel (Mendel's Law of Segregation), ένα διπλοειδές άτομο φέρει δύο ξεχωριστά αντίγραφα για κάθε αυτοσωμικό γονίδιο (ένα αντίγραφο από κάθε μέλος ενός ζεύγους ομολόγων χρωμοσωμάτων). Κάθε γαμέτης που παράγεται από ένα διπλοειδές άτομο, λαμβάνει ένα μόνο αντίγραφο κάθε γονιδίου, το οποίο επιλέγεται τυχαία. Υπό τον νόμο του διαχωρισμού, καθένα από τα δύο αντίγραφα έχουν ίσες πιθανότητες να συμπεριληφθούν στον γαμέτη στο βαθμό που

αναμένεται το 50% των γαμετών ενός ατόμου να διαθέτει το ένα αντίγραφο και 50% των υπολοίπων γαμετών, να διαθέτει το άλλο.



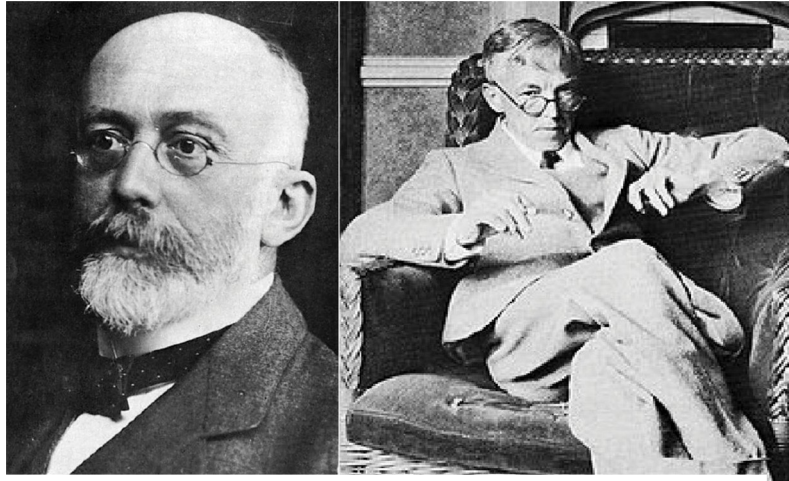
Εικόνα 3 " καθένα από τα δύο αντίγραφα έχουν ίσες πιθανότητες να συμπεριληφθούν στον γαμέτη "   
 Παράδειγμα του νόμου του διαχωρισμού (Μανούση 2018)

Ως γονότυπος ενός ατόμου ορίζεται ο συνδυασμός των αλληλομόρφων που εντοπίζονται στο άτομο αυτό, σε κάποιο συγκεκριμένο γενετικό τόπο. Εάν υπάρχουν δύο αλληλόμορφα σε έναν πληθυσμό, στον γενετικό τόπο A (A και a), τότε οι πιθανοί γονότυποι στον πληθυσμό θα είναι AA, Aa και aa. Άτομα με γονότυπο AA και aa ονομάζονται ομοζύγωτα (έχουν δύο αντίγραφα του ίδιου αλληλομόρφου) , ενώ άτομα με γονότυπο Aa ονομάζονται ετεροζύγωτα (έχουν δύο διαφορετικά αλληλόμορφα). Εάν το ετεροζύγωτο άτομο εμφανίζει φαινότυπο ίδιο με το ομοζύγωτο, τότε το ζεύγος αλληλομόρφων του ενός ομοζύγωτου ατόμου καταλογίζεται ως κυρίαρχο , και το άλλο ως υποτελής (Andrews, 2010).

### 1.3 Ισοζύγιο Hardy-Weinberg (Hardy–Weinberg equilibrium)

Παρόλο που ο νόμος του διαχωρισμού των αλληλομόρφων αντίκρισε μεγάλη απήχηση από το επιστημονικό κοινό , εντούτοις προκάλεσε σύγχυση όσον αφορά τη διατήρηση της γενετικής παραλλακτικότητας στους φυσικούς πληθυσμούς. Την μενδελιανή αυτή προσέγγιση αντίκρουε το πρόβλημα πως κυρίαρχοι γονότυποι θα έπρεπε σταδιακά να αυξάνονται σε συχνότητα εμφάνισης (και αντίστοιχα υποτελείς χαρακτήρες σταδιακά να εξαφανίζονται), πράγμα που δεν παρατηρείται όμως σε πραγματικούς πληθυσμούς.

Την αμφισβήτηση του νόμου του Mendel κατεύνασαν οι G.H. Hardy και W. Weinberg σε δημοσιεύσεις τους, θεμελιώνοντας έτσι τον τομέα της πληθυσμιακής γενετικής. (Crow, 1999, Edwards, 2008 )



Εικόνα 4 Οι Wilhelm Weinberg και Godfrey H. Hardy

Ο νόμος της ισορροπίας των Hardy-Weinberg αντιμετωπίζει την μενδελιανή γενετική στα πλαίσια διπλοειδών, σεξουαλικά αναπαραγόμενων πληθυσμών, βασίζεται σε ορισμένες παραδοχές και σύμφωνα με αυτόν:

1. Οι συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων δεν μεταβάλλεται από γενιά σε γενιά
2. Αν θεωρηθεί πως οι συχνότητες αλληλομόρφων ενός διπλοειδούς πληθυσμού σε έναν γενετικό τόπο είναι  $p$  και  $q$ , τότε οι αναμενόμενες γονοτυπικές συχνότητες θα είναι  $p^2$ ,  $2pq$  και  $q^2$ . Η αναλογία αυτή των συχνοτήτων δεν πρόκειται να μεταβληθεί από γενιά σε γενιά όσο ο πληθυσμός βρίσκεται υπό το ισοζύγιο Hardy-Weinberg και το άθροισμά τους θα ισούται με ένα (όπως πρέπει και για κάθε γονοτυπική συχνότητα σε οποιονδήποτε πληθυσμό)

Προκειμένου να ισχύουν τα ανωτέρω συμπεράσματα των Hardy και Weinberg, χρειάζεται να ισχύουν συγκεκριμένες παραδοχές:

1. Οι πληθυσμοί δεν υπόκεινται σε φυσική επιλογή (δεν υπάρχουν συνεχείς διαφορές στις πιθανότητες επιβίωσης και πολλαπλασιασμού μεταξύ των διαφόρων γονοτύπων).
2. Εντός των πληθυσμών δεν υφίστανται μεταλλάξεις ή μεταναστεύσεις που να προκαλούν την εισαγωγή νέων αλληλομόρφων (ή εξαφάνιση των προγενέστερων).

3. Το μέγεθος των πληθυσμών θεωρείται άπειρο. Στην πραγματικότητα, οποιοσδήποτε πραγματικός πληθυσμός θεωρείται περατός, το θεώρημα όμως στηρίζεται στην έννοια ότι πρέπει σε έναν πληθυσμό να μην προκαλούνται γενετικές παρεκκλίσεις που να μεταβάλλουν την συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων και κατά συνέπεια να προκαλούνται σφάλματα ως προς τη δειγματοληψία. Παρόλο που όλοι οι πληθυσμοί υπόκεινται σε γενετικές παρεκκλίσεις, θεωρείται πως τα αποτελέσματα της γενετικής παρέκκλισης είναι εμφανέστερα σε μικρότερους πληθυσμούς, παρά σε μεγαλύτερους.
4. Τα άτομα που βρίσκονται εντός του πληθυσμού ζευγαρώνουν τυχαία μεταξύ τους. Αν και η μη τυχαία σύζευξη δεν μεταβάλλει την συχνότητα των αλληλομόρφων από την μία γενιά στην επόμενη (δεδομένου πως ισχύουν οι υπόλοιπες παραδοχές), μπορεί να δημιουργήσει αποκλίσεις από την αναμενόμενη γονοτυπική αναλογία και να υποβοηθήσει την φυσική επιλογή να προκαλέσει εξελικτικές αλλαγές.

Αν οι γονοτυπικές συχνότητες σε έναν πληθυσμό παρεκκλίνουν από τις προσδοκώμενες του ισοζυγίου, χρειάζεται μόλις μία γενιά τυχαίων συζεύξεων προκειμένου η ισορροπία να αποκατασταθεί και πάλι, δεδομένου ότι ισχύουν όλες οι παραδοχές, ότι οι αλληλομορφικές συχνότητες είναι ίσες μεταξύ θηλυκών και αρσενικών ατόμων (ή εναλλακτικά ότι παρατηρείται ερμαφροδιτισμός) και ότι ο γενετικός υπό εξέταση τύπος είναι αυτοσωμικός. Αν οι αλληλομορφικές συχνότητες διαφέρουν μεταξύ των δύο φύλων, θα χρειαστούν δύο γενιές τυχαίας σύζευξης για να επιτευχθεί το ισοζύγιο. Φυλοσύνδετοι χαρακτήρες απαιτούν πολλαπλές γενεές προκειμένου να βρεθούν σε ισορροπία καθώς το ένα φύλο διαθέτει δύο αντίγραφα του γονιδίου, ενώ το άλλο φύλο (το αρσενικό), μόνο ένα (Andrews, 2010).

#### **1.4 Μοριακή Βιολογία και Γενετική**

Μοριακή βιολογία είναι ο τομέας της Βιολογίας που μελετά την σύνθεση, τη δομή και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της γενετικής πληροφορίας (DNA) και κυτταρικών μορίων (όπως τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες), τα οποία συμβάλλουν σε βιολογικές

διαδικασίες απαραίτητες για την λειτουργία και την συντήρηση του κυττάρου. (Nature International Journal of Science). Πιο συγκεκριμένα, αντικείμενο της Μοριακής Βιολογίας είναι η σύνθεση, η δομή και η λειτουργία της γενετικής πληροφορίας (DNA) μέσω της μελέτης της αντιγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης του RNA.

Μοριακή γενετική είναι το πεδίο της βιολογίας το οποίο μελετά την δομή και λειτουργία γονιδίων σε μοριακό επίπεδο, μέσω της εφαρμογής στατιστικών μεθόδων της κλασσικής Γενετικής καθώς και της Μοριακής Βιολογίας. Η μελέτη της γονιδιακής και χρωμοσωμικής έκφρασης ενός οργανισμού, μπορεί να μας προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την κληρονομησιμότητα, τη γενετική παραλλακτικότητα και τις μεταλλάξεις που παρατηρούνται σε αυτόν. (Waters, 2007)

## **1.5 Εφαρμογές μοριακής Γενετικής**

### **1.5.1 Απομόνωση**

Ορίζεται ως η μέθοδος απόσπασσης του γενετικού υλικού από δείγμα, μέσω της χρήσης διάφορων φυσικοχημικών εφαρμογών. Η πρώτη απομόνωση DNA πραγματοποιήθηκε από τον Friedrich Miescher το 1869 (Dahm, 2008) . Η απομόνωση έχει ευρεία χρήση στην Μοριακή Βιολογία όπου και θεωρείται πλέον ως διαδικασία ρουτίνας. Βασική αρχή της απομόνωσης είναι η αποδόμηση και απόρριψη των κυτταρικών φραγμών (κυτταρική μεμβράνη, κυτταρικό τοίχωμα, πυρηνική μεμβράνη, πυρηνικός φάκελος). Ανάλογα με το είδος του γενετικού υλικού (DNA, mRNA) και το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα που το περιέχουν (ιστός, σωματικά υγρά κλπ.), διατίθεται στην αγορά ευρύ φάσμα τυποποιημένων πακέτων απομόνωσης (DNA isolation kit), τα οποία φέρουν και τα κατάλληλα πειραματικά πρωτόκολλα.

### **1.5.2 Ενίσχυση Αλληλουχιών DNA**

Προκειμένου να ανιχνευθούν και να μελετηθούν τα ξεχωριστά γονίδια, οι συγκεκριμένες περιοχές στο DNA καθώς και οι πολυμορφισμοί, είναι συχνά απαραίτητο να συγκεντρωθεί μεγάλη ποσότητα νουκλεοτιδίων για την πραγματοποίηση της ανάλυσης. Αντί λοιπόν να απομονωθεί ένα μεμονωμένο αντίγραφο του DNA στόχου από έναν

μεγάλο αριθμό κυττάρων, είναι συχνά πιο χρήσιμο να παραχθούν πολλαπλά αντίγραφα της αλληλουχίας στόχου από ένα μόνο μόριο DNA ή mRNA, μέσω εργαστηριακών μεθόδων. (New England Biolabs)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) καθώς και η κλωνοποίηση με την χρήση βακτηριακών πλασμιδίων, βρίσκονται μεταξύ των πιο κοινών μεθόδων ενίσχυσης στην Μοριακή Βιολογία .

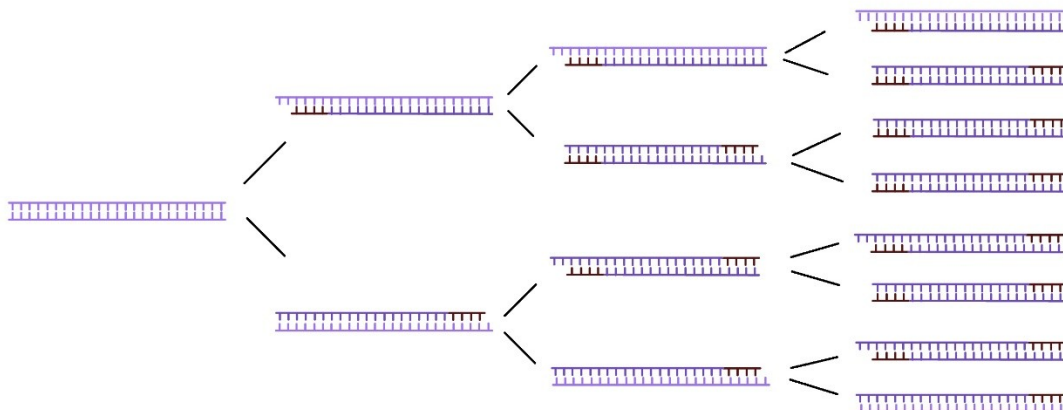
### **1.5.3 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction(PCR))**

Η PCR είναι ικανή να συνθέσει εκατομμύρια αντίγραφα μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA με μία απλή, γρήγορη και αυτοματοποιημένη αντίδραση. Η ικανότητα της ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων DNA από ένα περίπλοκο δίκλωνο μόριο DNA , έφερε την επανάσταση στην μοριακή βιολογία καθώς και σε ένα Ευρύ φάσμα Ιατρικών μεθόδων. (Mullis et al, 1987 )

Πρόκειται για μία εργαστηριακή (*in vitro*) μέθοδο ενζυμικής σύνθεσης επιλεγμένων τμημάτων μιας αλληλουχίας DNA, με την χρήση ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων (primers), DNA πολυμεράσης και 5' τριφωσφορικών δεοξυριβουκλεοτιδίων ( dNTPs ) . Οι εκκινήτες (primers) συνδέονται με τους κλώνους, υβριδοποιούνται προς την αντίθετη του καθενός από τους δύο DNA κλώνους κατεύθυνση και πλαισιώνουν την περιοχή -στόχο του επιλεγμένου DNA. Στη συνέχεια προσδένονται στους 2 διαχωρισμένους κλώνους του DNA με φορά 5'-3', ώστε η καρβοξυλική (-OH) 3' άκρη του ενός εκκινήτη - η οποία είναι και η επεκτεινόμενη άκρη για την σύνθεση της συμπληρωματικής αλληλουχίας του ενός κλώνου – πρότυπο ( «μήτρα» ) - να βρίσκεται αντικριστά με την 3' καρβοξυλική άκρη του δεύτερου εκκινήτη στον αντίστοιχο κλώνο.

Αφού προσδεθούν στον κάθε κλώνο της πρότυπης αλληλουχίας, οι εκκινήτες (primers) δεσμεύουν μέσω της DNA πολυμεράσης τα κατάλληλα 5' δεοξυριβονουκλεοτίδια και βάση συμπληρωματικότητας τα τοποθετούν σε σειρά σχηματίζοντας έναν νέο κλώνο. Επειδή τα προϊόντα ενός κύκλου της αντίδρασης αυτής μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν «μήτρα» για τους επόμενους κύκλους, το πλήθος των αντιγράφων ανά κύκλο

διπλασιάζεται. Συνεπώς, μια επαναλαμβανόμενη σειρά κύκλων που περιλαμβάνουν αποδιάταξη - υβριδισμό των κλώνων με εκκινητές, και επιμήκυνση υβριδισμένων εκκινητών μέσω της DNA πολυμεράσης και των dNTPs , έχει ως αποτέλεσμα την εκθετική συσσώρευση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, του οποίου τα άκρα καθορίζονται από τις 5' άκρες των εκκινητών. Είκοσι κύκλοι PCR, υποθέτοντας 100% αποδοτικότητα παράγουν περίπου 1 εκατομμύριο ( $2^{20}$ ) αντίγραφα (Saiki et al., 1988)



Εικόνα 5 "Είκοσι κύκλοι PCR, υποθέτοντας 100% αποδοτικότητα παράγουν περίπου 1 εκατομμύριο ( $2^{20}$ ) αντίγραφα " σχεδιάγραμμα 3 κύκλων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Κάθε κύκλος αποτελείται από 3 βήματα:

Βήμα 1: Θέρμανση του DNA με σκοπό την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA - ( denaturation step )

Βήμα 2: Πτώση της θερμοκρασίας για τον υβριδισμό καθενός από τους δύο κλώνους με ένα από τους δύο ειδικά για την αλληλουχία σχεδιασμένους εκκινητές (primers) - ( annealing step )

Βήμα 3: Επιμήκυνση μέσω της DNA πολυμεράσης, με θέρμανση στην βέλτιστη για τους σχεδιασμένους εκκινητές (primers) θερμοκρασία - ( extension step )

Οι DNA πολυμεράσες είναι ένζυμα που μπορούν να συνθέσουν μια νέα αλυσίδα DNA χρησιμοποιώντας τριφωσφωρικά δεοξυριβονουκλεοτίδια ( dNTPs ), με βάση έναν κλώνο



DNA ως πρότυπο και έναν σχεδιασμένο εκκινητή με επεκτεινόμενη καρβοξυλική 3' άκρη (-OH) ως έναυσμα της διαδικασίας αντιγραφής. Τα ένζυμα αυτά συνήθως λαμβάνονται από βακτηριακές μορφές ζωής και κυρίως από τον μικροοργανισμό *Thermus aquaticus* (*Taq Polymerase*). Ο λόγος που χρησιμοποιείται έντονα το συγκεκριμένο βακτήριο στην αντίδραση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), είναι η θερμοφιλία που παρουσιάζει καθώς η πολυμεράση που βρίσκεται στο DNA του οργανισμού αυτού, είναι συνηθισμένη να προσαρμόζει την λειτουργία της και να αποδίδει σε υψηλές θερμοκρασίες, απαραίτητες για την αντίδραση που σχηματίζεται κατά την διαδικασία της PCR. Όσο υψηλότερη θερμοκρασία επιτυγχάνεται κατά το στάδιο της πρόσδεσης των εκκινητών στον κάθε κλώνο, τόσο περισσότερο αποκλείεται η πιθανότητα πρόσδεσης του εκκινητή σε λάθος θέση εκκίνησης. Προκειμένου το χημικό περιβάλλον της αντίδρασης να είναι κατάλληλο, προστίθεται ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα καθώς και διάλυμα MgCl<sub>2</sub> που διευκολύνει τη δράση της πολυμεράσης (Rabinow, 1996, Tindall et al., 1988).

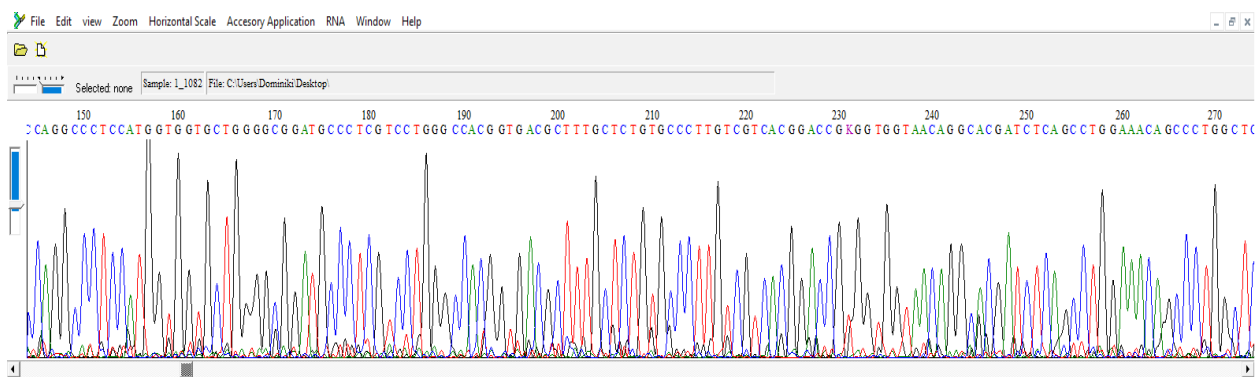
#### **1.5.4 Ανάλυση πρωτοδιάταξης DNA (Sequencing Analysis)**

Οι αρχές του πολλαπλασιασμού του DNA, χρησιμοποιήθηκαν από τον Frederic Sanger (Sanger et al., 1977) και τους συνεργάτες του για την ανάπτυξη μιας διαδικασίας γνωστής ως ανάλυση διδεοξυνουκλεοτιδίων Sanger (Sanger dideoxy analysis). Η διαδικασία αυτή εκμεταλλεύεται την ικανότητα της DNA Πολυμεράσης να ενσωματώνει 2', 3' διδεοξυνουκλεοτιδικά ανάλογα βάσεων, τα οποία υστερούν της 3' καρβοξυλικής ομάδας που είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού.

Η ανάλυση Sanger προϋποθέτει μια πρότυπη αλληλουχία DNA, έναν σχεδιασμένο εκκινητή για την ανάλυση (primer), DNA Πολυμεράση, δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), σημασμένα διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) καθώς και ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για την αντίδραση. Τέσσερεις διαφορετικές αντιδράσεις παίρνουν μέρος, κάθε μία από τις οποίες περιέχει ραδιενεργά σημασμένα νουκλεοτίδια και είτε ddA, ddC, ddG ή ddT. Τα στάδια υβριδισμού, ταυτοποίησης και τερματισμού, διεξάγονται σε ξεχωριστά heat blocks. Η σύνθεση DNA γίνεται στους 37 °C, θερμοκρασία υπό την οποία η DNA Πολυμεράση έχει άριστη ενζυμική αποδοτικότητα.

Η DNA πολυμεράση, προσθέτει είτε το κατάλληλο δεοξυριβονουκλεοτίδιο ή το 2',3' διδεοξυνουκλεοτίδιο σε κάθε στάδιο της επέκτασης του κλώνου DNA. Η πιθανότητα να τοποθετηθεί είτε δεοξυριβονουκλεοτίδιο είτε διδεοξυνουκλεοτίδιο, εξαρτάται από την σχετική συγκέντρωση των δύο τύπων μορίων στην αντίδραση. Όταν ένα δεοξυριβονουκλεοτίδιο προστεθεί ( Αδενίνη, Κυτοσίνη, Θυμίνη ή Γουανίνη ) στο 3' άκρο του εκκινητή, η επέκταση του συμπληρωματικού κλώνου μπορεί να συνεχιστεί. Όταν όμως ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο προστεθεί ( ddA, ddC, ddT ή ddG ) στο 3' άκρο, η σύνθεση της νέας αλληλουχίας σταματά. Αποτέλεσμα της μεθόδου είναι ο σχηματισμός προϊόντων επιμήκυνσης που διαφέρουν σε μήκος λόγω τερματισμού του 3' άκρου από τα ddNTPs.

Πλέον, οι ραδιενεργές ουσίες που χρησιμοποιούνταν για την σήμανση στο παρελθόν, αντικαταστάθηκαν από φθορίζουσες χρωστικές για την ταυτοποίηση των προϊόντων της αντίδρασης. Η σήμανση επιτυγχάνεται είτε με την χρήση φθορίζοντων ddNTPs, είτε με χρήση σημασμένου εκκινητή (primer). Και στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιούνται τέσσερις διαφορετικές χρωστικές. Τα σημασμένα προϊόντα της αντίδρασης, ηλεκτροφορούνται και στη συνέχεια αναλύονται στον αυτόματο αναλυτή (Sequencer) με την χρήση φωτονικών ομάδων (π.χ. ακτινών laser). Λόγω της διέγερσης της φθορίζουσας σήμανσης καθενός από τα τέσσερα ddNTPs (μπλε χρωστική για ddCTP , πράσινη ddATP, κόκκινη για ddTTP και μαύρη για ddGTP) σε διαφορετικά μήκη κύματος, αποτέλεσμα της ανάλυσεως προκύπτει ένα χρωματογράφημα όπου κάθε βάση απεικονίζεται ως μια ξεχωριστή χρωματιστή κορυφή (Thermofisher Scientific).



*Εικόνα 6 "Κάθε βάση απεικονίζεται ως χρωματιστή κορυφή": Χρωματογράφημα της ανάλυσης της πρωτοδιάταξης στο πρόγραμμα BioEdit (Μανούση 2018)*

## **1.6 Γονίδια και Πολυμορφισμοί**

### **1.6.1 Πολυμορφισμοί DNA (DNA Polymorphisms)**

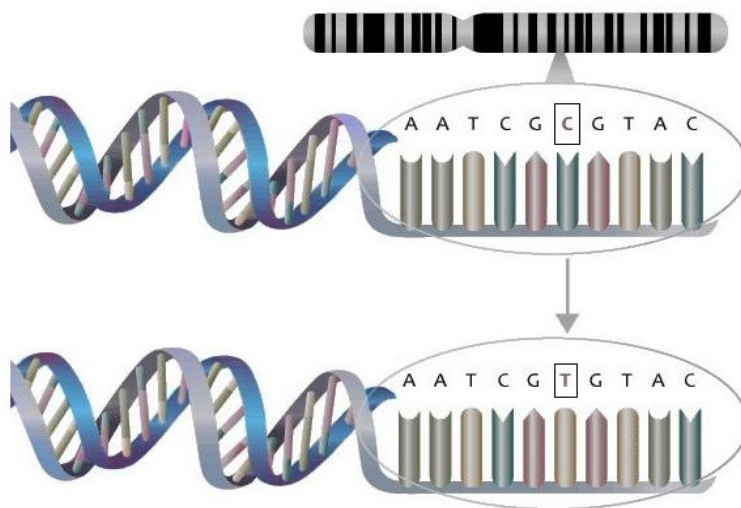
Πρόκειται για παραλλαγές αλληλομόρφων σε χρωμοσωμικούς τόπους, που διαφέρουν ως προς την νουκλεοτιδική αλληλουχία τους. Οι πολυμορφισμοί έχουν πολύ μεγάλη χρησιμότητα στην γενετική χαρτογράφηση (gene mapping) και για αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται και ως γενετικοί δείκτες (genetic markers). Λόγω της μεγάλης συχνότητας εμφάνισης τους στο γονιδίωμα (περίπου κάθε 350 bp) είναι εφικτή η κατασκευή γενετικών χαρτών υψηλής ανάλυσης. Από τις κυριότερες μορφές πολυμορφισμού στο DNA είναι οι Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNP, Single Nucleotide Polymorphisms) και οι βραχείες διαδοχικές επαναλήψεις (STR, Short Tandem Repeats) (Russell, 2009).

#### **1.6.1.1 Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNP- Single Nucleotide Polymorphisms)**

Ως μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός ορίζεται η σημειακή μεταλλαγή ζεύγους νουκλεοτιδικών βάσεων σε ένα γενετικό τόπο στο γονιδίωμα. Οι μεταλλαγές αυτές παρατηρούνται σε κανονικά άτομα ενός - ή περισσότερων - πληθυσμών όπου το λιγότερο συχνά εμφανιζόμενο αλληλόμορφο, συναντάται σε συχνότητα μεγαλύτερη ή ίση του 1%. Σε γενικά πλαίσια, οι πολυμορφισμοί αυτοί μπορούν να είναι δυ-, τρι- ή

ακόμη και τετρά- αλληλικοί παρόλο που στον άνθρωπο οι τρι- και τετρααλληλικές μορφές συναντώνται τόσο σπάνια που θεωρούνται ανύπαρκτες. Για τον λόγο αυτό τα SNPs αναφέρονται πολλές φορές και ως διααλληλικοί (biallelic) δείκτες. Πρόκειται για την πιο συχνή μορφή πολυμορφισμού που εμφανίζεται στο DNA και ευθύνεται για το 90-95% της ποικιλομορφίας του DNA. (Brookes, 1999)

Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί βρίσκονται στο DNA συνήθως μεταξύ γονιδίων, αλλά πολλές φορές και εντός εξονίων γονιδίων, και μπορούν να δράσουν ως βιολογικοί δείκτες, υποδεικνύοντας στους ερευνητές την τοποθεσία γονιδίων που σχετίζονται με ασθένειες. Όταν SNP βρεθούν είτε μέσα σε ένα γονίδιο ή σε κάποια ρυθμιστική περιοχή σε αυτό, μπορούν να έχουν πολύ σημαντική επίδραση στην λειτουργία του, θετική ή αρνητική ( Genetics Home Reference).



Εικόνα 7 Μονονουκλεοτιδικός Πολυμορφισμός (Single Nucleotide Polymorphism)

### **1.6.1.2 Βραχείες διαδοχικές επαναλήψεις - Μικροδορυφόροι ( Short Tandem Repeats (STR)-Microsatellites)**

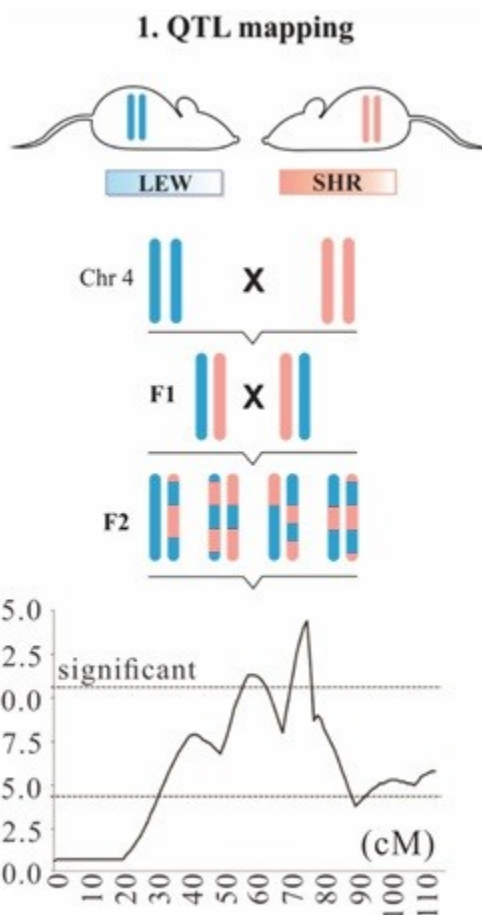
Οι μικροδορυφόροι είναι βραχείες επαναλήψεις 1-6 νουκλεοτιδίων που συναντώνται σε μεγάλη συχνότητα στο πυρηνικό γονιδίωμα των περισσότερων οργανισμών. Λόγω των χαρακτηριστικών τους είναι επίσης γνωστοί και ως απλές επαναλήψεις αλληλουχίας (Simple Sequence Repeats- SSR). Ένας γενετικός μικροδορυφορικός τύπος κυμαίνεται



Οι χρωμοσωμικές περιοχές ή γενετικοί τόποι εντός του γονιδιώματος που περιέχουν συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων στους δείκτες DNA και σχετίζονται με ένα συγκεκριμένο ποσοτικό χαρακτηριστικό είναι γνωστοί ως γονιδιακοί τόποι ποσοτικών ιδιοτήτων (Quantitative Trait Loci ή QTL). Με τον όρο ποσοτικό χαρακτηριστικό, αναφερόμαστε σε φαινοτυπικές ιδιότητες οι οποίες μπορούν να μετρηθούν, όπως για παράδειγμα η γαλακτοπαραγωγή στα ζώα ή η λιποπεριεκτικότητα.

Οι ποσοτικές ιδιότητες συνήθως εξαρτώνται από περισσότερα του ενός γονίδια ή και από το περιβάλλον (Collard et al., 2005, Miles et al., 2008).

Ο βαθμός της σύνδεσης ενός QTL με ένα γενετικό δείκτη καθώς και το ποσοστό της επίδρασης του QTL σε ένα χαρακτηριστικό, προκαλεί φαινοτυπικές διαφορές σε άτομα με τον ίδιο γονότυπο (Russell, 2009). Για το λόγο αυτό, γνωρίζοντας το γενετικό «προφίλ» ενός ζώου, είμαστε σε θέση να αξιολογήσουμε και να επιλέξουμε τα ζώα τα οποία παρουσιάζουν τους γονότυπους που σχετίζονται με τις περισσότερο οικονομικά σημαντικές ιδιότητες (π.χ. παραγωγικότητα, ανθεκτικότητα κλπ.).



Εικόνα 9 "Η στενότητα της σύνδεσης ενός QTL με ένα γενετικό δείκτη καθώς και η ένταση της επίδρασης του QTL σε ένα χαρακτηριστικό, προκαλεί φαινοτυπικές διαφορές σε άτομα με τον ίδιο γονότυπο"

### **1.6.3 Γονίδιο του ακέτυλο-συνενζύμου της ακετυλοτρανσφεράσης 2 (ACAA2)**

Πρόκειται για γονίδιο που κωδικοποιεί το ομώνυμο ένζυμο της οικογένειας των Θιολασών που εμπλέκεται στην επιμήκυνση και την κατάτμηση των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια, αφού καταλύει το τελικό στάδιο της β-οξειδωσης. Το ACAA2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παροχή ενέργειας και υποστρωμάτων άνθρακα, στοιχεία που είναι απαραίτητα για την γαλακτοπαραγωγή. (Miltiadiou et al.,2017). Στο πρόβατο, το συγκεκριμένο γονίδιο βρίσκεται στο 23<sup>ο</sup> χρωμόσωμα και απαρτίζεται από 397 αμινοξέα (Zong et al., 2013). Από έρευνες που έχουν προηγηθεί έχει αποδειχθεί ότι η σημειακή μετάλλαξη της 3' αμετάφραστης περιοχής του 10<sup>ου</sup> εξονίου στο γονίδιο ACAA2 έχει σημαντική επίδραση στην καθαρή γαλακτοπαραγωγή στην Χιώτικη φυλή. ( Chatziplis et al., 2012, Orford et al., 2012)

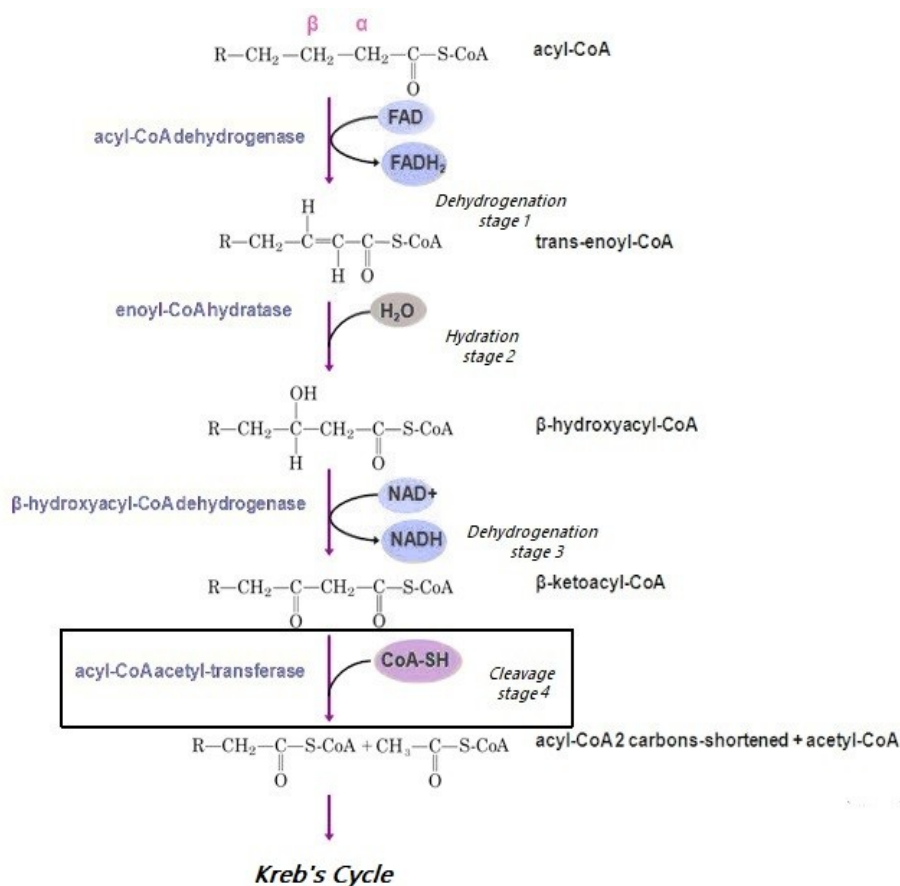
### **1.6.4 Γονίδιο του ακέτυλο-συνενζύμου της ακετυλοτρανσφεράσης 1 (ACAA1)**

Το γονίδιο ACAA1 κωδικοποιεί την σύνθεση του *ακέτυλο-Coa-συνένζυμου της ακετυλο-τρανσφεράσης 1*, (*Acetyl-Coa-Coenzyme acyltransferase 1* ή εν συντομία ACAA1). Το ένζυμο αυτό αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την διαδικασία της Β - οξειδωσης των λιπαρών οξέων στα περοξισώματα (Sordillo et al.,2011)

Παρόλο που το πλήθος των λιπαρών οξέων οξειδώνονται στα μιτοχόνδρια, ο καταβολισμός των μεγάλων αλυσίδων λιπαρών οξέων (LCFAs) στα συγκεκριμένα οργανίδια, δεν είναι εφικτός. Συνεπώς, χρειάζεται να προηγηθεί περικοπή των αλυσίδων μέσω της περοξισωματικής β-οξειδωσης πριν την μετάβαση τους στα μιτοχόνδρια (Hu et al., 2005)

Τα περοξισώματα είναι υποκυτταρικά οργανίδια τα οποία πρακτικά είναι παρόντα σε κάθε ευκαρυωτικό κύτταρο και καταλύουν έναν μεγάλο αριθμό μεταβολικών διαδικασιών. Στις διαδικασίες αυτές περιλαμβάνονται οι Α και Β οξειδώσεις των λιπαρών οξέων, η βιοσύνθεση αιθέριων φωσφολιπιδίων και ο μεταβολισμός τοξινών μέσω του συστήματος αποτοξίνωσης της γλυοξαλάσης (Wanders, 2013)

Συγκεκριμένα το ACAA1, είναι ένα λειτουργικό ένζυμο του συστήματος της Β-οξειδωσης των περοξισωμάτων, το οποίο κατεργάζεται μεσαίες, μεγάλες και πολύ μεγάλες αλυσίδες λιπαρών οξέων καθώς καταλύει το 4<sup>ο</sup> στάδιο της Β-οξειδωσης (Paragrigoriou et al., 2007). Το ένζυμο ACAA1 αρχικά συντίθεται ως ένας μεγαλύτερος πρόδρομος ο οποίος κατακερματίζεται μετά την σύνδεση του με τα περοξισώματα. Τα προϊόντα της παραπάνω οξειδωσης συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος (ή αλλιώς και κύκλο Krebs), που είναι το τελικό στάδιο καταβολισμού υδατανθράκων, λιπών και αμινοξέων που λαμβάνονται με την τροφή. Μέσω της οξειδωσης των παραπάνω, γίνεται αποδέσμευση της αποθηκευμένης ενέργειας που περιέχεται και μετατρέπεται σε διοξείδιο του άνθρακα και τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) (Lowenstein, 1969, Kay, 1987).



Εικόνα 10 " Το ACAA1 καταλύει το 4ο στάδιο της Β-οξειδωσης"



Το γονίδιο *ACAA1* έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό στον άνθρωπο (συσχέτιση με ανάπτυξη όγκων (Lacroix et al., 2005) ) και το ποντίκι (κυρίως σε έρευνες που αφορούν τα ηπατικά κύτταρα (Hu et al., 2005)). Σε αντίθεση όμως με το ανθρώπινο γονίδιο της ακετυλο-τρανσφεράσης το οποίο εμφανίζεται ως ενιαίο περοξισωμικό, στον ποντικό συναντώνται 2 περοξισωμικά γονίδια (Bout et al, 1991). Παρόλα αυτά, η δομική οργάνωση του ανθρώπινου γονιδίου με αυτά του ποντικού είναι παρόμοια.

Το 2008, σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε πληθυσμό βοοειδών από τον Li Heng-De και τους συνεργάτες του, βρέθηκε ότι πολυμορφισμοί στα γονίδια *ACAA1* & *ACAA2*, είχαν σημαντική επίδραση στα παραγωγικά χαρακτηριστικά των ζώων, υποδηλώνοντας κατ' αυτό τον τρόπο την πιθανότητα συσχέτισεως μεταξύ των δύο γονιδίων.

Στα πρόβατα το γονίδιο *ACAA1* βρίσκεται στο 19<sup>ο</sup> χρωμόσωμα, στη θέση 11,530,281 έως 11,554,892 και περιέχει συνολικά 12 εξόνια (NCBI)

#### **1.6.5 Γονίδιο του υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης (*GHR*)**

Ο υποδοχέας της αυξητικής ορμόνης είναι ρυθμιστής της μετεμβρυϊκής αναπτύξεως και, όπως και η αυξητική ορμόνη, έχει σημαντική επίδραση στον μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών (Brooks et al., 2008). Οποιοσδήποτε αλληλομορφικές παραλλαγές στην δομική ή ρυθμιστική αλληλουχία της αυξητικής ορμόνης (Growth Hormone) και του υποδοχέα αυτής, επηρεάζουν παράγοντες που σχετίζονται με τα παραγωγικά χαρακτηριστικά του ατόμου. (Sahu et al., 2017)

Στο πρόβατο, ο υποδοχέας της αυξητικής ορμόνης κωδικοποιείται από το γονίδιο του υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης (*GHR-Growth Hormone Receptor*), το οποίο βρίσκεται στο 16<sup>ο</sup> χρωμόσωμα , περιέχει 10 εξόνια, καλύπτει έκταση 167.5 kb και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη του διαμεμβρανικού υποδοχέα. Το γονίδιο του υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης χρησιμοποιείται στην ταυτοποίηση αρκετών γενετικών δεικτών (Archibald et al. 2010).

Σύμφωνα με έρευνες , πολυμορφισμοί στο γονίδιο *GHR* δεν επηρεάζουν όλα τα είδη και όλες τις φυλές ως προς τα γαλακτοπαραγωγικά χαρακτηριστικά τους το ίδιο. Ενώ οι

αγελάδες και τα πρόβατα επηρεάζονται από το γονίδιο όσον αφορά τα χαρακτηριστικά και των δύο παραγωγικών κατευθύνσεων (ποιότητα κρέατος, περιεκτικότητα σε λίπος και πρωτεΐνες στο παραγόμενο γάλα) στις αίγες τα γαλακτοπαραγωγικά χαρακτηριστικά δεν επηρεάζονται σημαντικά (Pegolo et al. , 2016, Marj et al., 2007 ). Επιπροσθέτως, ακόμη και εντός του ίδιου είδους, το γονίδιο GHR δεν ασκεί την ίδια επιρροή μεταξύ των διαφορετικών φυλών. Ενώ στα πρόβατα Σαρδηνίας (Sarda sheep) οι πολυμορφισμοί του γονιδίου συσχετίζονται με την λιποπεριεκτικότητα και την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (Dettori et al., 2018), στα πρόβατα της φυλής Churra δεν παρατηρείται κάποια συσχέτιση πολυμορφισμών του GHR με χαρακτηριστικά της γαλακτοπαραγωγής.

## **2. Ερευνητικό Μέρος**

### **2.1 Ερευνητικός σκοπός**

Ως σκοπό της παρούσας έρευνας τέθηκε η διερεύνηση πολυμορφισμών σε δύο διαφορετικά γονίδια προβάτων προερχόμενων από δύο διαφορετικές φυλές (Πελαγονίας – Φλωρίνης και Χίου), και ακολούθως την σύγκριση των συχνοτήτων εμφάνισης των γονοτύπων που προκύπτουν και τους πολυμορφισμούς αυτούς τόσο μεταξύ των ζώων της ίδιας φυλής ( διερεύνηση του γονιδίου *ACAA1* στα Χιώτικα πρόβατα), όσο και μεταξύ των δύο φυλών (διερεύνηση του γονιδίου *GHR* μεταξύ Χιώτικων και προβάτων Πελαγονίας).

## **2.2 Υλικά και μέθοδοι**

### **2.3 Επιλογή του δείγματος**

#### **2.3.1 ACAA1**

Συνολικά εξετάστηκαν 40 άτομα φυλής Χίου ως προς το γονίδιο ACAA1. Τα συγκεκριμένα ζώα αποτελούσαν μέρος ευρύτερου πληθυσμού στον οποίο είχε προηγηθεί ανάλυση ως προς το γονίδιο ACAA2.

Βάση προηγούμενης αξιολόγησης και βαθμονόμησης του γονότυπου των διαθέσιμων ζώων (μέσω ελέγχου μικροδορυφόρων και μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών στο γονίδιο ACAA2), χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός μεθόδων για την επιλογή του πιο αντιπροσωπευτικού δείγματος της φυλής. Αρχικά επιλέχθηκαν τα 10 ζώα με την χαμηλότερη παραγωγή καθώς και ίσο αριθμό ζώων που έφεραν τις υψηλότερες αποδόσεις. Στη δεύτερη φάση, επιλέχθηκαν 10 ζώα με την υψηλότερη παραγωγή, που όμως έφεραν γονότυπους με τους χαμηλότερους μέσους όρους ως προς την γονοτυπική κατάταξη και τέλος, δέκα ζώα που ενώ είχαν τους υψηλότερους μέσους όρους αναφορικά με τον γονότυπο τους, η παραγωγικότητά τους ήταν από τις χαμηλότερες των παρατηρήσεων. Εφόσον με το πέρας αυτής της μεθόδου επιλογής δεν επιτεύχθηκε το επιθυμητό μέγεθος πληθυσμού, αφού ζώα που επιλέχθηκαν στη δεύτερη φάση της επιλογής, βρίσκονταν ήδη επιλεγμένα σε ομάδα της πρώτης φάσης, αποτέλεσμα ήταν η διεύρυνση του μεγέθους των υπό εξέταση ομάδων. Επιτράπηκε στις δύο πρώτες ομάδες (καλύτερες – χειρότερες αποδόσεις) να έχουν πλήθος μεγαλύτερο των 10 ατόμων και προστέθηκαν ζώα με ενδιάμεση θέση στην γονοτυπική κατάταξη τα οποία όμως είχαν είτε πολύ υψηλές, είτε πολύ χαμηλές παραγωγικές επιδόσεις, μέχρι το σύνολο των επιλεγμένων ζώων, να φτάσει τον επιθυμητό αριθμό (40 άτομα).

### **2.3.2 GHR**

Όπως και με τον πληθυσμό των Χιώτικων προβάτων, έτσι και με τα άτομα της φυλής Πελαγονίας - Φλωρίνης, γενετικό υλικό υπήρχε διαθέσιμο σε κατάσταση ψύξης στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου. Για τα δείγματα αυτής της έρευνας δεν προηγήθηκε εφαρμογή κάποιας μεθόδου ως προς την επιλογή της φυλής Πελαγονίας, καθώς ο αριθμός των υπό εξέταση δειγμάτων, ήταν πολύ μικρός και στα δείγματα δεν είχε προηγηθεί γονοτύπηση και βαθμονόμηση των γονοτύπων ή αξιολογική κατάταξη ως προς κάποιο φαινοτυπικό χαρακτηριστικό. Από την ομάδα της φυλής Χίου, επιλέχθηκαν τα 12 πιο υψηλό-παραγωγικά άτομα. Τα άτομα της φυλής Πελαγονίας που χρησιμοποιήθηκαν – όπως και αυτά από τον πληθυσμό των Χιώτικων προβάτων – προήλθαν από έναν ευρύτερο πληθυσμό, ο οποίος ήταν γνωστής γενεαλογίας και επιλέχθηκαν ώστε να είναι μη-συγγενή μεταξύ τους.

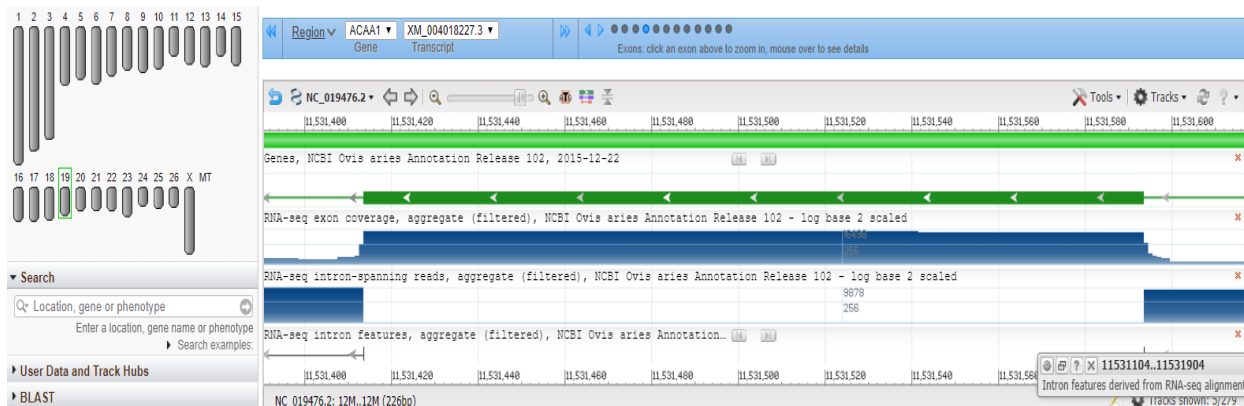
Απομονωμένο DNA των επιλεγμένων, για τη παρούσα μελέτη, ζώων υπήρχε ήδη διαθέσιμο, διατηρημένο σε κατάσταση ψύξης και συνεπώς δεν ακολουθήθηκαν διαδικασίες συγκέντρωσης και απομόνωσης γενετικού υλικού. Ο ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος του συνόλου του γενετικού υλικού, έγινε σε ηλεκτροφόρηση πηκτής Αγαρόζης 1.5% με χρώση Midori green.

## **2.4 Επιλογή του γενετικού τόπου**

### **2.4.1 ACAA1**

Όπως έχει αναφερθεί, το γονίδιο *ACAA1* βρίσκεται στο 19<sup>ο</sup> χρωμόσωμα στο γονιδίωμα του πρόβατου. Ως επακόλουθο λοιπόν, το συγκεκριμένο χρωμόσωμα εξετάστηκε με σκοπό τον εντοπισμό της ακριβούς τοποθεσίας του γονιδίου *ACAA1* (11,530,281... 11,554,892) καθώς και του πλήθους των SNP που περιέχονταν στην περιοχή αυτή (εφαρμογή dbSNP– Short Genetic Variations, NCBI).

Ανατρέχοντας στους πίνακες που περιέχουν όλους τους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς που βρίσκονται κατά μήκος του γονιδίου *ACAA1*, εντοπίστηκε το εξόνιο στο οποίο παρατηρείται και η μεγαλύτερη πυκνότητα συχνά εμφανιζόμενων πολυμορφισμών. Με αυτόν τον τρόπο, επιλέχθηκε το 4<sup>ο</sup> εξόνιο συμπεριλαμβανομένων και τμημάτων του εσονίου που προηγείται καθώς και αυτού που έπεται, προς ενίσχυση της ακρίβειας της επιλογής του εξονίου-στόχου.



Εικόνα 11 "Το γονίδιο *ACAA1* βρίσκεται στο 19ο χρωμόσωμα στο γονιδίωμα του πρόβατου." Προβολή του 4<sup>ου</sup> εξονίου του γονιδίου *ACAA1* στο 19<sup>ο</sup> χρωμόσωμα.

## 2.4.2 GHR

Για την ανάλυση του γονιδίου του υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης χρησιμοποιήθηκε ως υπόμνημα έρευνα η οποία είχε πραγματοποιηθεί για την διερεύνηση πολυμορφισμών στο συγκεκριμένο γονίδιο στην φυλή προβάτων Nilagiri. (Sahu et al., 2017)

Στην συγκεκριμένη έρευνα, είχε γίνει παράθεση των αλληλουχιών των δύο ειδικά σχεδιασμένων ,για το γονίδιο, εκκινητών καθώς και των ρυθμίσεων που απαιτούνταν για την ενίσχυση του τμήματος του 10<sup>ου</sup> εξονίου μέσω της αντίδρασης της PCR. Για τον λόγο αυτό, ενέργειες όπως ο θερμοκρασιακός έλεγχος βέλτιστου υβριδισμού των εκκινητών (Gradient PCR) και η μετέπειτα ηλεκτροφόρηση, δεν ήταν αναγκαίες.

## **2.5 Απομόνωση DNA**

Αν και το σύνολο των δειγμάτων και των δύο αναλύσεων βρισκόταν ήδη απομονωμένο στις εργαστηριακές εγκαταστάσεις, για χάριν πληρότητας της διατριβής, κρίθηκε σκόπιμο να γίνει αναφορά στη διαδικασία της απομόνωσης του γενετικού υλικού απ' όπου προήλθε το DNA που χρησιμοποιήθηκε. Το πρωτόκολλο όπως περιγράφεται έχει χρησιμοποιηθεί από την υπογράφουσα σε άλλα δείγματα που απομονώθηκαν για άλλες μελέτες ή αναλύσεις ρουτίνας του Εργαστηρίου κατά την διάρκεια της πρακτικής της άσκησης στο Εργαστήριο Αγροβιοτεχνολογίας και Ελέγχου Αγροτικών Προϊόντων.

### **Προετοιμασία**

Για την απομόνωση των δειγμάτων DNA χρησιμοποιήθηκε το kit απομόνωσης PureLink™ Genomic DNA Mini Kit της εταιρίας Invitrogen. Το εν λόγω kit ενδείκνυται για βιολογικά υγρά και κατ' επέκταση και για αίμα. Τα δείγματα διατηρούνταν σε κατεψυγμένη μορφή (-40°C) και κάθε ομάδα δειγμάτων αποψύχθηκε ξεχωριστά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα φιαλίδια που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και ο πάγκος εργασίας, καθαρίστηκαν με χρήση αλκοόλης συγκέντρωσης 70% για την αποφυγή επιμολύνσεων.

Κύρια διαδικασία σύμφωνα με τις υποδείξεις του kit :

(Invitrogen)

- Τοποθέτηση 250 μl αίματος σε φιαλίδια (tube) όγκου 1,5 ml
- Προσθήκη 25μl *πρωτεΐνάσης-K* για την λύση του κυτταρικού τοιχώματος και τον ιστονών
- Προσθήκη 200μl Lysis Buffer για την λύση της φωσφολιπιδικής στοιβάδας της κυτταρικής μεμβράνης.
- Ανακίνηση του δείγματος σε συσκευή δίνης (vortex) για 12 με 15 δευτερόλεπτα

- Τοποθέτηση του δείγματος σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 56 °C για 12 λεπτά προκειμένου να προκληθεί επώαση
- Απομάκρυνση των δειγμάτων από το υδατόλουτρο και φυγοκέντριση ταχύτητας 5000 στροφών ανά λεπτό (rpm) για μερικά δευτερόλεπτα.
- Προσθήκη 200 ml απόλυτης αλκοόλης (συγκέντρωσης 100%)
- Ανακίνηση στην συσκευή δίνης για 12-15 δευτερόλεπτα
- φυγοκέντριση στις 5000 rpm για μερικά δευτερόλεπτα
- Μεταφορά του περιεχομένου των φιαλιδίων με τα δείγματα (συνολικού όγκου 675 μl) μεταφέρθηκε σε νέα αριθμημένα φιαλίδια με στήλες- φίλτρα και αποσπώμενο δοχείο συλλογής.
- Φυγοκέντριση των φιαλιδίων στις 16500 στροφές ανά λεπτό, για διάρκεια ενός λεπτού
- Αντικατάσταση των πλέον γεμάτων δοχείων συλλογής και προσθήκη 600 μl από το διάλυμα καθαρισμού BW Buffer
- Εκ νέου φυγοκέντριση στις 10000 στροφές ανά λεπτό για περίπου ένα λεπτό, απόρριψη των δοχείων συλλογής και αντικατάσταση τους με νέα
- Προσθήκη 700 μl διαλύματος καθαρισμού TW Buffer και φυγοκέντριση διάρκειας ενός λεπτού σε ταχύτητα 10000 rpm
- Εκκένωση των δοχείων συλλογής και επαναφυγοκέντριση ενός λεπτού στις 16500 στροφές ανά λεπτό.
- Μεταφορά των στηλών-φίλτρα μεταφέρθηκαν σε απλά, αποστειρωμένα φιαλίδια χωρητικότητας 1,5ml και πρόσθεση 50 μl PureLink™ Elution Buffer στο κέντρο της στήλης.
- Με φυγοκέντριση διάρκειας ενός λεπτού και ταχύτητας 12.000 στροφών ανά λεπτό ώστε το DNA που δεσμεύτηκε στο φίλτρο της στήλης να συγκεντρωθεί στο δοχείο συλλογής.
- Απομάκρυνση των δοχείων συλλογής από την φυγόκεντρο και τοποθέτηση τους στην συντήρηση συμβατικού ψυγείου.

Για την εξακρίβωση της επιτυχίας της απομόνωσης, το περιεχόμενο κάθε φιαλιδίου υποβλήθηκε σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή Αγαρόζης (πυκνότητας 1% ) και τα δείγματα



στα οποία διαπιστώθηκε η επιτυχής απομόνωση, μεταφέρθηκαν σε πλάκες με αριθμημένα βοθρία (plates).

## **2.6 Εφαρμογή Ηλεκτροφόρησης**

### **Παρασκευή Gel Αγαρόζης**

Για την προετοιμασία της πηκτής Αγαρόζης ακολούθησαν τα εξής βήματα:

- Τοποθέτηση 100 ml διαλύματος TBE σε κωνική φιάλη ζέσεως
- Προσθήκη 1g σκόνη Αγαρόζης ( Invitrogen Agarose Electrophoresis Grade) πυκνότητας 1% (w/v)
- Θέρμανση της φιάλης έως ότου η Αγαρόζη διαλυθεί πλήρως και το διάλυμα γίνει διαυγές
- Ήπια ανάδευση και σταδιακή ψύξη του διαλύματος με χρήση τρεχούμενου νερού στα εξωτερικά τοιχώματα της φιάλης μέχρι η θερμοκρασία να μειωθεί στους 50°C
- Προσθήκη 1,1 μl φωτοευαίσθητης ,φθορίζουσας υπό υπεριώδη ακτινοβολία, χρωστικής Midori Green
- Ήπια ανάδευση προς αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων.

### **Τοποθέτηση gel σε εκμαγείο και εφαρμογή της μεθόδου ηλεκτροφόρησης**

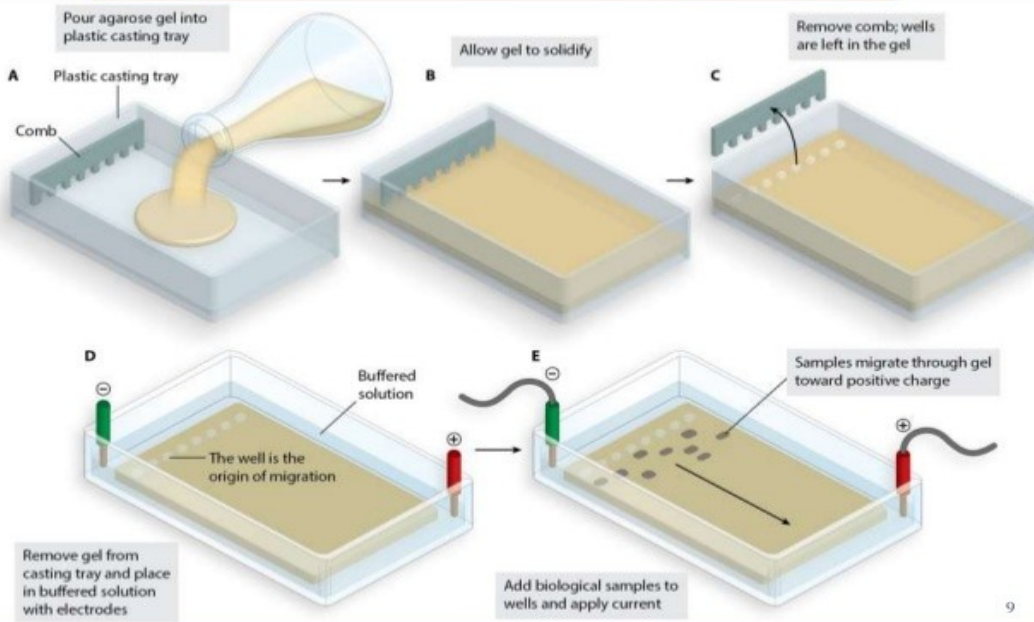
Αφού επιτεύχθηκε πλήρης ομογενοποίηση μεταξύ διαλύματος και χρωστικής, το περιεχόμενο της φιάλης τοποθετήθηκε σε ειδικά κατασκευασμένο εκμαγείο, το οποίο φέρει αποσπώμενα τείχη περιορισμού από σιλικόνη καθώς και εξάρτημα «comb» για τον σχηματισμό των βοθρίων μέσα στα οποία αργότερα θα τοποθετηθεί το προϊόν της ενίσχυσης. Το εκμαγείο παρέμεινε σε σκοτεινό χώρο και θερμοκρασία δωματίου για 35 με 45 λεπτά, προκειμένου το διάλυμα να αποκτήσει συμπαγή μορφή (gel) (Addgene protocols - gel electrophoresis).

Αφού το εξάρτημα comb και τα αποσπώμενα τείχη αφαιρέθηκαν, το εκμαγείο με το στερεοποιημένο πλέον gel τοποθετήθηκε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στη συσκευή προστέθηκε διάλυμα TBE μέχρι τα βοθρία να καλυφθούν. 3,5μl DNA από κάθε δείγμα που βρισκόταν συγκεντρωμένο στα δοχεία συλλογής, αναμείχθηκε με 1,5μl χρωστικής κατάλληλης για ηλεκτροφόρηση DNA (Loading Dye), και στην συνέχεια τοποθετήθηκε με τη χρήση πιπέτας στα βοθρία του gel. Μαζί με τα δείγματα, στο κεντρικό βοθρίο του gel τοποθετήθηκαν 3,5 μl ειδικά διαμορφωμένου διαλύματος τμημάτων DNA προκαθορισμένου μήκους (ladder), με κλιμάκωση μήκους 100 βάσεων. ( 100 bp DNA ladder, GeneOn, Germany)

Η συσκευή ηλεκτροφόρησης υποβλήθηκε σε υψηλή τάση (110 – 120 Volt) για χρονικό διάστημα 25 - 35 λεπτών, προκειμένου τα δείγματα να μεταβούν από τον αρνητικό, στον θετικά φορτισμένο πόλο του gel. Κατά την μετακίνηση του μέσα στην Αγαρόζη , το DNA δεσμεύεται στην χρωστική Midori green, δημιουργώντας σύμπλοκα και συνεπώς επιτρέπει την διάκριση των τμημάτων του, κατά την έκθεση σε ακτινοβολία UV.

Με την παρέλευση του απαραίτητου χρονικού διαστήματος, το gel αφαιρέθηκε από την συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετήθηκε στον θάλαμο ανάγνωσης (UPV, Canada) προκειμένου να εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Εάν η απομόνωση DNA είναι επιτυχής, το γενετικό υλικό θα εμφανίζεται σαν μία φωτεινή ζώνη επάνω στην πηκτή αγαρόζης.

## Preparation & running of gel



Εικόνα 12 Προετοιμασία και χρήση πηκτής αгарόζης

### 2.7 Ενίσχυση γονιδίων με την μέθοδο PCR και θερμοκρασιακές δοκιμές

Για να επιτευχθεί ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος - στόχου του DNA και να ακολουθήσει η αλληλούχιση, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR (Polymerase Chain Reaction). Η διαδικασία της ενίσχυσης έγινε σε θερμικό κυκλοποιητή της εταιρίας Eppendorf (Eppendorf Mastercycler® epgradient S, Hamburg, Germany).

Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε το PCR mix “OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer”, της εταιρίας New England Biolabs.

Εν αντιθέσει με το γονίδιο *GHR*, για το οποίο χρησιμοποιήσαμε γνωστούς και ήδη δοκιμασμένους για τον συγκεκριμένο γενετικό τύπο εκκινητές, για την ενίσχυση του γονιδίου *ACAA1* χρειάστηκε να προηγηθεί προσεγγμένος σχεδιασμός εκκινητών ( και ορισμένες



43  
Εικόνα 13 Θερμικός Κυκλοποιητής Eppendorf Mastercycler® epgradient.

θερμοκρασιακές δοκιμές προκειμένου να βρεθεί η καταλληλότερη, για τους εκκινητές του γονιδίου, θερμοκρασία υβριδισμού.

Οι λεπτομέρειες προετοιμασίας του μείγματος που θα υποβαλλόταν σε ενίσχυση και στα δύο γονίδια συμπωματικά ήταν παρόμοιες (χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος τύπος και όγκος αναλώσιμων και η ίδια ποσότητα γενετικού υλικού), με την διαφορά ότι τα δείγματα του γονιδίου του *υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης* υποβλήθηκαν απευθείας σε ενίσχυση , ενώ μικρός αριθμός δειγμάτων του *ACAA1* υποβλήθηκε πρώτα σε μια επιπλέον αντίδραση ενίσχυσης, στην οποία συμπεριλαμβάνονταν οι προαναφερόμενες θερμοκρασιακές δοκιμές.

### **Προετοιμασία μείγματος ενίσχυσης**

Το PCR mix ανακινήθηκε επαρκώς σε συσκευή δύνης, στις μέγιστες στροφές ανά λεπτό για 20-25 δευτερόλεπτα και ακολούθησε ήπια φυγοκέντριση ταχύτητας 5000 στροφών/λεπτό για 1-2 δευτερόλεπτα.

Ο τελικός όγκος του μείγματος ανήλθε στα 10 μl για κάθε δείγμα, η σύσταση του οποίου ήταν:

- 8 μl PCR mix
- 1 μl primers (0,5μl forward primer, 0,5μl reverse primer)
- 1 μl DNA

Συνεπώς, 9μl Master Mix (PCR mix + primers) για κάθε ένα από τα δείγματα υπολογίστηκαν και ο κατάλληλος όγκος αντιδρώντων παρασκευάστηκε. 1μl DNA από κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε καινούριο plate με αριθμημένα βοθρία.

Το Master Mix αναδεύτηκε με την χρήση πιπέτας 10 - 15 φορές για να επιτευχθεί πλήρης ομογενοποίηση, φυγοκεντρήθηκε στιγμιαία για την απομάκρυνση των

φυσαλίδων και τέλος μοιράστηκε στα βοθρία του νέου plate με το DNA. Το plate σφραγίστηκε και τοποθετήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή.

### **Προγραμματισμός Θερμικού Κυκλοποιητή και έλεγχος βέλτιστης θερμοκρασίας ενίσχυσης με την μέθοδο Gradient PCR**

Η συγκεκριμένη διαδικασία αφορά μόνο το γονίδιο *ACAA1* και όχι αυτό της *GHR*:

Για την διεξαγωγή της αντίδρασης PCR, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Eppendorf Mastercycler® epgradientS® (Hamburg, Germany). Η εν λόγω συσκευή διαθέτει θερμαινόμενη - ψυχόμενη κεφαλή και βάση. Για την αποφυγή εξάτμισης των περιεχομένων του plate με τα δείγματα, η κεφαλή έχει πάντα υψηλότερη θερμοκρασία σε σχέση με την βάση (συνήθως 104°C).

Καθώς κάθε ζεύγος εκκινητών (Forward primer και Reverse primer) που σχεδιάζεται, αποδίδει καλύτερα σε διαφορετική θερμοκρασία, χρειάστηκε να προηγηθούν θερμοκρασιακές δοκιμές σε ορισμένα δείγματα της ανάλυσης του γονιδίου *ACAA1*, για να καθοριστεί η βέλτιστη απόδοση των εκκινητών κατά την πρόσδεση τους στα τμήματα της δεδομένης αλληλουχίας DNA. Για την διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε βάση του πρωτοκόλλου της, η μέθοδος Gradient PCR. (Prezioso et al., 2000)

Προκειμένου να βρεθεί το θερμοκρασιακό πλαίσιο στο οποίο οι δύο primers λειτουργούν καλύτερα, υπολογίσθηκε ο μέσος όρος των θερμοκρασιών που αναγράφονταν στα δοχεία των εκκινητών κατά την παραλαβή τους ( περίπου 57°C ) και ορίστηκε ένα πλαίσιο  $\pm 5^\circ\text{C}$  ως πεδίο δοκιμών. Το θερμοκρασιακό πλαίσιο δοκιμών ήταν το εξής:

- 52°C
- 53,7°C
- 56,1°C
- 57,4°C
- 59,9°C
- 61,9°C

Ο θερμικός κυκλοποιητής προγραμματίστηκε ώστε κάθε θέση δείγματος να διαφέρει θερμοκρασιακά στο στάδιο του υβριδισμού (annealing step) σύμφωνα με τις παραπάνω θερμοκρασίες και η εξής διαδικασία ακολούθησε:

- Προθέρμανση της συσκευής για έναρξη διαδικασίας(η κεφαλή θερμαίνεται στους 104°C και η βάση στους 94°C)
- Είσοδος πλάκας δειγμάτων (plate) στην υποδοχή της προθερμασμένης συσκευής
- Επώαση των δειγμάτων στους 94°C για 5' λεπτά πριν την έναρξη του πρώτου κύκλου της αντίδρασης
- Έναρξη πρώτου κύκλου PCR με θέρμανση στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα προκειμένου η διπλή έλικα DNA να αποδιαταχθεί
- Ψύξη για 1 λεπτό στα διαφορετικά θερμοκρασιακά επίπεδα προκειμένου να διαπιστωθούν οι καλύτερες συνθήκες σύνδεσης των εκκινητών στις θέσεις τους, σύμφωνα με τον κανόνα ομολογίας – συμπληρωματικότητας των βάσεων.
- Σταθερή θέρμανση στους 72°C διάρκειας ενός λεπτού, για την επιμήκυνση των εκκινητών ώστε να επιτευχθεί η ενίσχυση του σημείου – στόχου της αλληλουχίας
- Λήξη πρώτου κύκλου PCR - επανάληψη των παραπάνω βημάτων για τους εναπομείναντες κύκλους της διαδικασίας

Τελευταίο βήμα της αντίδρασης αφού ολοκληρωθούν οι απαραίτητοι κύκλοι της αντίδρασης, είναι μια φάση 5 λεπτών που ακολουθεί, κατά την οποία τα δείγματα παραμένουν στους 72°C με σκοπό την επιμήκυνση ορισμένων ατελών τμημάτων (final extension step). Με την λήξη του δεύτερου κύκλου της PCR, το επιθυμητό τμήμα DNA έχει απομονωθεί από την υπόλοιπη αλληλουχία και ενισχύεται με εκθετικό βαθμό. 30 κύκλοι της αντίδρασης ήταν επαρκείς για να παραχθεί ικανοποιητική ποσότητα προϊόντος της αντίδρασης.

Αφού η αντίδραση ολοκληρώθηκε επιτυχώς, μια νέα ηλεκτροφόρηση έλαβε χώρα με σκοπό την εξακρίβωση κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού. 3μl από κάθε βοθρίο προϊόντος PCR αναμειγμένο με 1 μl Loading dye, τοποθετήθηκε στα σχηματισμένα βοθρία της πηκτής της Αγαρόζης.

Παρόλο που τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά καθ' όλο το θερμοκρασιακό εύρος, από την διαύγεια και την ένταση φθορισμού του δείγματος, ως καταλληλότερη θερμοκρασία κρίθηκαν οι 59°C. Η συγκεκριμένη θερμοκρασία ρυθμίστηκε στον κυκλοποιητή και όλα τα δείγματα της έρευνας μας ενισχύθηκαν βάσει αυτής.

## **2.8 Πρώτη PCR αλληλούχισης**

Αφού καταλήξαμε ως προς την βέλτιστη θερμοκρασία σύνδεσης των εκκινητών στην αλληλουχία-στόχο που είχαμε ορίσει στο γονίδιο της *Ακετυλοτρανσφεράσης 1*, προετοιμάσαμε όλα μας τα δείγματα για ενίσχυση όπως ακριβώς αναφέρθηκε πιο πριν για την διεξαγωγή της Gradient PCR. Καθώς είχαμε διαφορετικά μεγέθη δειγμάτων για δύο διαφορετικά γονίδια (40 άτομα για το γονίδιο *ACAA1* και 24 άτομα για το γονίδιο της *GHR*), πραγματοποιήσαμε 2 ξεχωριστές αντιδράσεις PCR χρησιμοποιώντας τις ανάλογες για τα δύο διαφορετικά γονίδια συνθήκες αντίδρασης καθώς και τους διαφορετικούς forward και reverse primers.

Οι δύο ξεχωριστές αντιδράσεις φέραν ξεχωριστά χαρακτηριστικά:

### ***Growth Hormone Receptor gene:***

Forward primer	<b>GHR-5'- CCCTGATGAGAAGACTGAAGGGT- 3'</b>
Reverse primer	<b>GHR-5'-</b>

		TCAATGGGTAGCTCATGGGAA-3'
Θερμοκρασία	υβριδισμού	60°C
εκκινητών		
Αριθμός κύκλων αντίδρασης		34

### ***Acetyl-Coa-Coenzyme acyltransferase 1:***

Forward primer		ACAA1-5'- TGGAGGCAAAGCACAGGGT-3'
Reverse primer		ACAA1-5'- GCTTGCACTTCTGTCCCAA-3'
Θερμοκρασία	υβριδισμού	72°C
εκκινητών		
Αριθμός κύκλων αντίδρασης		30

## **2.9 Καθαρισμός πρώτης PCR**

Καθαρίζοντας το προϊόν της πρώτης PCR από την περίσσεια νουκλεοτιδίων, τους ελεύθερους εκκινητές, τις μη ειδικές ζώνες και τα τμήματα κατακερματισμένου DNA, εξασφαλίζεται καλύτερη ποιότητα και αποτελεσματικότητα κατά την δεύτερη αντίδραση ενίσχυσης που ακολουθεί.

Για τον λόγο αυτό τα plate με τα ενισχυμένα πλέον δείγματα υποβλήθηκαν σε καθαρισμό. Το προϊόν που χρησιμοποιήθηκε είναι το Kit καθαρισμού «microCLEAN» της εταιρίας Arlegen® gel company και η διεξαγωγή της αντίδρασης έγινε βάση πρωτοκόλλου (Arlegen® gel company, microCLEAN ,part number 2MCL-XX ,version 1.5 protocol).

- Πρόσθεση 10μl διαλύματος microCLEAN
- Ανάδευση με την χρήση πιπέτας
- Τοποθέτηση στη συσκευή δίνης (vortex) για ομογενοποίηση
- Παραμονή του μείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά



- Φυγοκέντριση του plate στις 3600 rpm για 40 λεπτά.
- Απόρριψη της περίσσειας υγρού με ανατροπή της πλάκας σε απορροφητικό χαρτί τοποθετημένο στην υποδοχή της συσκευής φυγοκέντρισης
- Φυγοκέντριση σε χαμηλή ταχύτητα για 30 δευτερόλεπτα. Το ίζημα (πελλέτα) που συγκεντρώθηκε στον πυθμένα καθενός εκ των βοθρίων,
- Επαναιώρηση του ιζήματος (πελλέτα) που συγκεντρώθηκε στον πυθμένα με πρόσθεση 5,5μl TE Buffer
- Παραμονή του διαλύματος για 5 λεπτά ώστε να επιτραπεί στο DNA να ενυδατωθεί.

## **2.10 Δεύτερη αντίδραση PCR**

Σκοπός της αντίδρασης αυτής ήταν η σήμανση των τμημάτων του DNA με φθορίζοντα τροποποιημένα νουκλεοτίδια (ddNTPs) προκειμένου να δημιουργηθούν φθορίζοντα μονόκλινα τμήματα DNA που διαφέρουν κατά μία βάση μεταξύ τους. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ανήλθε στα 6μl και ακολούθησε η παρακάτω διαδικασία (Applied Biosystems):

- Μεταφορά 3μl προϊόντος από την δεύτερη PCR σε πλάκα με αριθμημένα βοθρία της εταιρίας Applied Biosystems.
- Πρόσθεση 0,5μl ενός εκ των δύο σχεδιασμένων για την PCR εκκινητών (στην παρούσα περίπτωση χρησιμοποιήσαμε τον εκκινητή Forward) σε κάθε αριθμημένο βοθρίο
- Πρόσθεση 0,5μl BigDye® Terminator v3.1
- Πρόσθεση 2μl Sequencing Buffer

Μέσα στο αντιδρών BigDye® Terminator v3.1, περιέχονται η πολυμεράση, τα κανονικά νουκλεοτίδια (dNTPs) καθώς και τα τροποποιημένα φθορίζοντα νουκλεοτίδια (ddNTPs) που απαιτούνται για την αντίδραση της PCR. Χρησιμότητα του Sequencing Buffer, είναι η αραίωση του διαλύματος BigDye®.

Ακολούθησε αντίδραση ενίσχυσης όπως ακριβώς συνέβη με την πρώτη αντίδραση ενίσχυσης PCR του δίκλωνου DNA των δειγμάτων:

- Επώαση στους 96°C για 3 λεπτά
- Αποδιάταξη του DNA στους 96°C με διάρκεια 3 λεπτών
- Ψύξη στους 59,9°C για 15 δευτερόλεπτα.
- Θέρμανση στους 60°C για 4 λεπτά
- Επανάληψη των άνωθεν βημάτων για 30 κύκλους αντίδρασης

Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης αυτό που προέκυψε ήταν κλώνοι DNA ποικίλου μήκους, σημασμένοι σε διαφορετικά σημεία από τροποποιημένα φθορίζοντα νουκλεοτίδια. Η διαδικασία που ακολούθησε ήταν ο εκ νέου καθαρισμός των δειγμάτων από την περίσσεια αντιδρώντων.

### **2.11 Καθαρισμός προϊόντος δεύτερης αντίδρασης PCR**

Καθώς ο όγκος της αντίδρασης της δεύτερης PCR καθορίζει τον απαραίτητο τελικό όγκο διαλύματος καθαρισμού, οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που συμμετέχουν, μεταβάλλονται για κάθε περίπτωση.

- Πρόσθεση 0,6μl EDTA (Applichem Panreac, Germany, pH= 8, 0,5M) σε 6μl προϊόντος κάθε δείγματος της δεύτερης PCR
- Πρόσθεση 0,6 μl Sodium Acetate (Fluka, USA, pH= 5,2, 3M)
- Προσθήκη 15μl απόλυτης αιθανόλης (EtOH 100%)
- Τοποθέτηση των δειγμάτων σε συσκευή δύνης (vortex) και ανάδευση
- Επώαση των δειγμάτων σε Κλίβανο για 20 λεπτά
- Φυγοκέντριση στις 3700 rpm για 30 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (+4°C)

- Απόρριψη των καλυπτρών των βοθρίων και ανατροπή του plate σε απορροφητικό χαρτί
- Ήπια φυγοκέντριση στις 600 στροφές/λεπτό για 20 δευτερόλεπτα
- Προσθήκη 18μl αιθανόλης συγκέντρωσης 70% στο plate
- φυγοκέντριση στις 3700 στροφές/λεπτό για 15 λεπτά στην ψυχόμενη φυγόκεντρο (+4°C)
- ανατροπή του plate σε απορροφητικό χαρτί και φυγοκέντριση ξανά στις 600 rpm για 20 δευτερόλεπτα για την απομάκρυνση της περίσσειας αλκοόλης.
- Παραμονή του plate σε θερμοκρασία 37°C για την πλήρη αφαίρεση της υγρασίας από τα δείγματα.

## **2.12 Ανάλυση πρωτοδιάταξης με χρήση αυτόματου αναλυτή ABI**

Στο plate με τα καθαρισμένα προϊόντα της δεύτερης PCR προστέθηκαν σε κάθε βοθρίο 9,5μl φορμαμίδιο (Life Technologies, USA). Το φορμαμίδιο είναι αποδιατακτικός παράγοντας και διατηρεί τα κομμάτια του DNA μονόκλωνα, μεγιστοποιώντας την επιτυχία της αλληλούχισης (Sarkar et al., 1990). Στη συνέχεια το plate τοποθετήθηκε για 5 λεπτά στους 95°C, όπου και επιτυγχάνεται αποδιάταξη των τυχόν δίκλωνων τμημάτων DNA. Έπειτα τα δείγματα είναι έτοιμα να τοποθετηθούν στον αυτόματο αναλυτή ABI 3500 (Applied Biosystems, Life Technologies).

Οι υποδοχείς της συσκευής του αναλυτή, απορροφούν 1μl από το κάθε δείγμα (ως αποτέλεσμα ηλεκτρομαγνητικής δύναμης) και το στέλνουν στα τριχοειδή -capillaries- τα οποία περιέχουν μέσα το πολυμερές της ηλεκτροφόρησης. Τα τριχοειδή σε όλο το μήκος τους έχουν μια αδιαφανή επίστρωση πολυαμιδίου (polyamide), εκτός από το σημείο στο οποίο βρίσκεται το πλαίσιο ανίχνευσης. Κατά την ηλεκτροφόρηση, η ακτίνα laser καθώς και ο οπτικός ανιχνευτής αναλύουν τα δείγματα μέσα από το συγκεκριμένο πλαίσιο στην επίστρωση (DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis, Applied Biosystems Chemistry Guide).

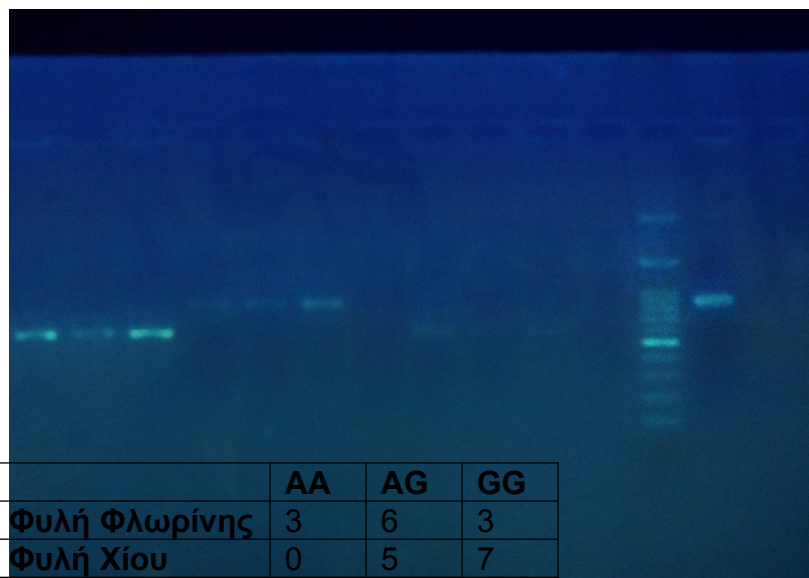
Κατά την ηλεκτροφόρηση στον αναλυτή, το προϊόν της PCR, εισέρχεται σε τριχοειδές μέσω ηλεκτροκινητικής αναρρόφησης. Η υψηλή τάση που εφαρμόζεται στην αντίδραση,

προκαλεί τα αρνητικά φορτισμένα τμήματα DNA να εισέλθουν στα τριχοειδή. Πριν τα αρνητικά φορτία να φτάσουν στον θετικό πόλο του συστήματος, τα φθορίζοντα σημασμένα τμήματα DNA - διαχωρισμένα κατά μέγεθος - περνούν μπροστά από ακτίνα laser. Η ακτίνα αυτή προκαλεί τον φθορισμό των χρωστικών. Οπτικός ανιχνευτής στην συσκευή αναγνωρίζει τον φθορισμό και τον καταγράφει. Το λογισμικό συλλογής δεδομένων που διαθέτει ο αναλυτής ABI, μετατρέπει τον κάθε φθορισμό σε δεδομένο ψηφιακής μορφής και έπειτα τον καταγράφει σε αρχείο τύπου \*.ab1 . Καθότι κάθε χρωστική φθορίζει σε διαφορετικό μήκος κύματος, όταν διεγερθεί από την εκπομπή της ακτίνας laser, καθένα από τα τέσσερα διαφορετικά χρωματισμένα ddNTP (αντίστοιχα των τεσσάρων διαφορετικών βάσεων) μπορούν να διακριθούν ταυτόχρονα σε μία μόνο απορρόφηση από τριχοειδές. Η εξαγωγή του αρχείου από την συσκευή θα αναλυθεί σε μορφή γραφήματος (Electropherogram) έγχρωμων κορυφών σε συγκεκριμένο λογισμικό ηλεκτρονικού υπολογιστή (DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis, Applied Biosystems Chemistry Guide).

Οι ακολουθίες που προέκυψαν από την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής των δειγμάτων αναλύθηκαν με το πακέτο BioEdit (Hall, 1999).

### 3. Αποτελέσματα- Συζήτηση

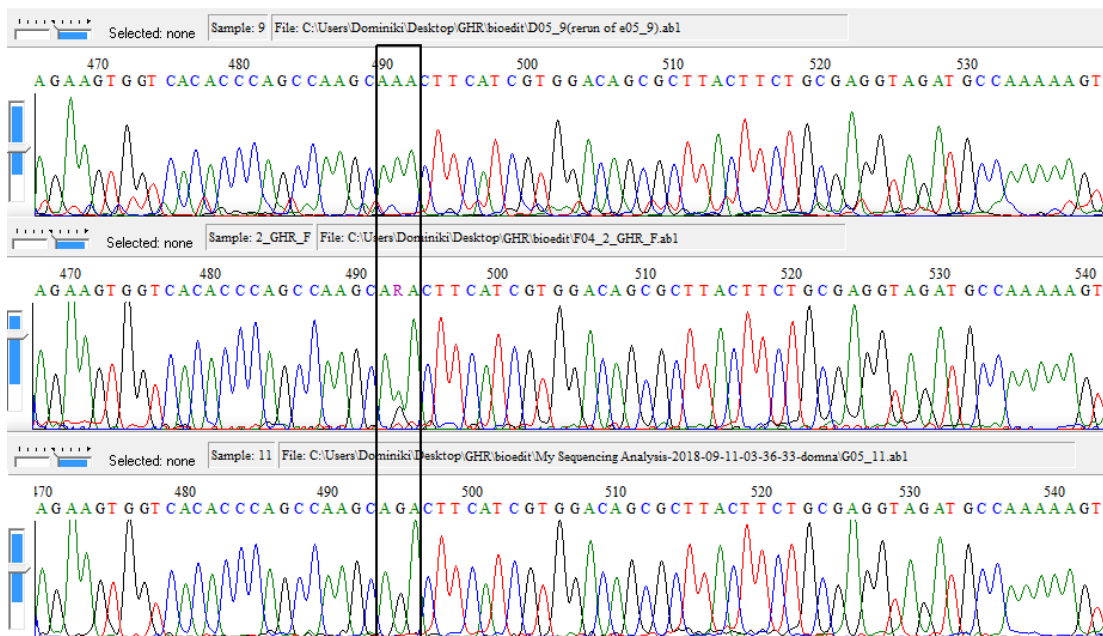
Για την διεξαγωγή της έρευνας εφαρμόστηκε απομόνωση και ενίσχυση γενετικού υλικού από συνολικά 64 ζώα και στην συνέχεια ανίχνευση μονονουκλεοτιδικών



πολυμορφισμών στα γονίδια *ACAA1* και *GHR* .

40 προβατίνες φυλής Χίου αναλύθηκαν ως προς το γονίδιο του ακετυλοσυνενζύμου της

*Ακετυλοτρανσφεράσης 1 (ACAA1)*, ενώ τα 12 πιο υψηλα παραγωγικά ζώα από το προαναφερόμενο σύνολο μαζί με 12 πρόβατα της φυλής Φλωρίνης, αναλύθηκαν ως προς το γονίδιο του *υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης (GHR)*, μέσω της αλληλούχησης και ανάλυσης της πρωτοδιάταξης των γονιδιακών τόπων των εξονίων 4 και 10 (αντίστοιχα), στα χρωμοσώματα στα οποία εντοπίζονται τα συγκεκριμένα γονίδια. Στο 4<sup>ο</sup> εξόνιο του χρωμοσώματος του γονιδίου της *Ακετυλοτρανσφεράσης 1*, δεν εντοπίστηκε κάποιος πολυμορφισμός στις 40 Χιώτικες προβατίνες. Αντίθετα, στο χρωματογράφημα που προέκυψε από τον αυτόματο αναλυτή ABI εντοπίστηκε μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός G>A στο γονίδιο του *υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης* στην περιοχή 490-500 στα δείγματα και των δύο φυλών. Η κατανομή των ζώων των δύο φυλών παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα. Μεταξύ των δύο φυλών παρατηρείται έντονη αλλαγή στο γονοτυπικό μοτίβο αφού ένας γονότυπος δεν εμφανίζεται καθόλου στην μία εκ των δύο φυλών (Φυλή Χίου). Η ανάλυση των γονοτυπικών συχνοτήτων και της μέγιστης πιθανοφάνειας με χρήση του στατιστικού κριτηρίου  $\chi^2$  στο λογισμικό SPSS (IBM SPSS statistics 20) έδειξε οριακά μη στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο φυλών ( $P < 0.05$ ).



Εικόνα 15 "Αντίθετα, εντοπίστηκε μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός G>A στο γονίδιο του υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης ". Ανίχνευση πολυμορφισμού στο λογισμικό Bioedit. (Μανούση 2018)

Breeds \* Genotype Crosstabulation

Count		Genotype			Total
		AA	AG	GG	
Breeds	Pelagonia	3	6	3	12
	Chios	0	5	7	12
Total		3	11	10	24

Breeds \* Population Crosstabulation

Count		Population			Total
		11.00	12.00	22.00	
Breeds	Hardy Weinberg	3	6	3	12
	Chios	0	5	7	12
Total		3	11	10	24

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	4.691 <sup>a</sup>	2	.096
Likelihood Ratio	5.896	2	.052
Linear-by-Linear Association	2.900	1	.089
N of Valid Cases	24		

a. 2 cells (33.3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.50.

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	4.691 <sup>a</sup>	2	.096
Likelihood Ratio	5.896	2	.052
Linear-by-Linear Association	2.900	1	.089
McNemar-Bowker Test	.	.	b
N of Valid Cases	24		

a. 2 cells (33.3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.50.

b. Computed only for a 2x2 table, where P must be greater than 1.

Πίνακες 1 και 2: Αριστερά ανάλυση των γονοτυπικών συχνοτήτων μεταξύ των δύο φυλών και δεξιά μεταξύ της φυλής Χίου και των γονοτυπικών συχνοτήτων σύμφωνα με τον νόμο ισορροπίας Hardy-Weinberg, με χρήση του στατιστικού κριτηρίου  $\chi^2$  στο λογισμικό SPSS ( $P < 0.05$ ) (Μανούση 2018)

#### 4. Συμπεράσματα

##### ACAA1

Όπως προαναφέρθηκε, το γονίδιο που κωδικοποιεί την σύνθεση του *ακέτυλο-συνένζυμου της Ακετυλοτρανσφεράσης 1* περιέχει 12 εξόνια, εκ των οποίων και μελετήθηκε το εξόνιο που παρουσίαζε την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης πολυμορφισμών. Παρόλα αυτά, η ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing) που διεξήχθη στην παρούσα έρευνα έδειξε ότι στο συγκεκριμένο γενετικό τόπο, δεν εντοπίζεται κάποια σημειακή μεταλλαγή. Αυτό είχε ως συνέπεια να μην χρειαστεί καμία περαιτέρω διερευνητική ενέργεια ή χρήση στατιστικού μοντέλου. Το μικρό μέγεθος του δείγματος σε συνδυασμό με την έκταση του γονιδιώματος που αναλύθηκε (1 από τα 12 περιεχόμενα εξόνια) όμως, καθιστά απαραίτητη την καθολική διερεύνηση του συγκεκριμένου γενετικού τόπου (γονίδιο ACAA1).

##### GHR

Η εν λόγω ανάλυση σχεδιάστηκε με επιλογή 12 τυχαίων, μη συγγενικών και γνωστής γενεαλογίας προβάτων της φυλής Πελαγονίας, καθώς και των 12 πιο υψηλαγωγικών ατόμων του δείγματος Χιώτικων προβάτων που χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη του *ACAA1* (ζώα φυλής Χίου πληρούσαν τις ίδιες προδιαγραφές με αυτά της φυλής Πελαγονίας). Ο εντοπισμός ενός μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού, έδειξε ότι στην περιοχή 490-500 των αρχείων \*.ab1 του αυτόματου αναλυτή, οι δύο φυλές παρουσιάζουν τρεις διαφορετικούς γονοτύπους : AA , AG και GG. Υπήρξε ενδιαφέρον ως προς τον τρόπο που οι αλληλομορφικές συχνότητες των δειγμάτων διαμορφώνονταν, αφού η γονοτυπική αναλογία AA:AG:GG στα ζώα φυλής Πελαγονίας διαμορφωνόταν ως 3:6:3 , ενώ στα άτομα της φυλής Χίου ως 0:5:7. Σύμφωνα με τον νόμο του ισοζυγίου Hardy-Weinberg, για να εμφανίζονται τα αλληλόμορφα με συχνότητα  $p^2:2pq:q^2$  , θα πρέπει στον πληθυσμό να μην υφίσταται επιλογή ως προς την σύζευξη, το μέγεθος δε να είναι αρκετά μεγάλο , να μην λαμβάνουν χώρα μεταλλάξεις και εισαγωγές νέων αλληλομόρφων καθώς και να μην παρατηρείται έντονη αιμομιξία μεταξύ των ατόμων. Ενώ τα ζώα Φλωρίνης που επιλέχθηκαν απαντούσαν στις παραπάνω προϋποθέσεις (και συνεπώς παρουσίαζαν συχνότητες πιστές στην αναλογία του ισοζυγίου), τα ζώα φυλής Χίου που χρησιμοποιήθηκαν είχαν δεχθεί επιλογή (επιλεγμένα ως προς την υψηλότερη γαλακτοπαραγωγή) και συνεπώς απέκλιναν από τον νόμο της ισορροπίας. Ζητούμενο της έρευνας ήταν η διερεύνηση της σύνδεσης του γονιδίου του υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης, με τις παραγωγικές ικανότητες των προβάτων. Τα πρόβατα της φυλής Φλωρίνης είναι ζώα μεγαλόσωμα, γνωστά για την ταχύτητα αναπτύξεως τους, την διατροφική τους λιτότητα και χαμηλή γαλακτοπαραγωγή καθώς και για την καλή ποιότητα σφαγίου που προσφέρουν. Από την άλλη πλευρά, τα πρόβατα φυλής Χίου είναι ζώα εξίσου μεγαλόσωμα, με πολύ σύντομη (έως ανύπαρκτη) άνοιστρη περίοδο, παρουσιάζουν την υψηλότερη γαλακτοπαραγωγή μεταξύ των ελληνικών φυλών , ενώ το σφάγιο τους δεν θεωρείται ιδιαίτερα εμπορεύσιμο ( Κάτανος et al, 2011, Ζυγογιάννης, 1999). Σε αντίθεση με την φυλή της Χίου, η οποία επί χρόνια υπόκειται σε βελτιωτικές ενέργειες, η εκτροφή της φυλής Πελαγονίας παραμελήθηκε από τους Έλληνες προβατοτρόφους με αποτέλεσμα να μην έχει ακολουθήσει την εξελικτική πορεία που η Χιώτικη φυλή γνώρισε. Λαμβάνοντας λοιπόν δείγματα από δύο διαφορετικούς πληθυσμούς και αναλύοντας την

γονοτυπική αναλογία του GHR σε αυτούς, παρατηρήθηκε ότι ο ένας ομόζυγος γονότυπος (AA) εκλείπει από τον Χιώτικο πληθυσμό. Η απουσία του συγκεκριμένου γονότυπου σε συνδυασμό με τον τρόπο επιλογής του δείγματος της συγκεκριμένης έρευνας καθώς και τα οριακά αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης  $\chi^2$ , οδηγούν εμμέσως στην σύνδεση του γονιδίου του υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης με την γαλακτοπαραγωγή, και θέτουν τρία μείζονα ερωτήματα για περαιτέρω διερεύνηση. Απουσία του γονότυπου AA από τα μη τυχαία επιλεγμένα υψηλό-παραγωγικά ζώα φυλής Χίου μπορεί να σημαίνει πως η συγκεκριμένη απουσία μπορεί να συνδέεται με την επιλογή του δείγματος με βάση την αυξημένη γαλακτοπαραγωγική ικανότητα των ζώων ή της σύνθεσης αυτής. Συνεπώς, η απόκλιση από την ισορροπία Hardy - Weinberg μπορεί να οφείλεται στην καταπάτηση της μιας παραδοχής για την ύπαρξη ισορροπίας και στη προκείμενη περίπτωση καταπάτηση της παραδοχής της επιλογής (επιλεγμένο δείγμα με βάση την γαλακτοπαραγωγή). Από την άλλη πλευρά, παρουσία του συγκεκριμένου γονότυπου στα τυχαία επιλεγμένα άτομα της φυλής Πελαγονίας μπορεί να συνδέεται με κρεοπαραγωγικά χαρακτηριστικά των ζώων (ταχύτητα αναπύξεως, ποιότητα σφαγίου κλπ.), στα οποία η φυλή της Χίου υστερεί. Σε κάθε περίπτωση, τα αποτελέσματα της εν λόγω έρευνας χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης σε μεγαλύτερα, επιλεγμένα ή μη, δείγματα των δύο φυλών.

## **5. Βιβλιογραφία**

### **5.1 Έντυπη Βιβλιογραφία**

1. Andrews, C. (2010) The Hardy-Weinberg Principle. *Nature Education Knowledge* 3(10):65
2. Archibald, A.L., Cockett, N.E., Dalrymple, B.P., Faraut, T., Kijas, J.W., Maddox, J.F., McEwan, J.C., Hutton Oddy, V., Raadsma, H.W., Wade, C., Wang, J., Wang, W., Xun X., 2010. The sheep genome reference sequence: a work in progress. *Animal Genetics*, 41: 449– 453.
3. Bout, A., Franse, M.M., Collins, J., Blonden, L., Tager, J.M., Benne, R., 1991. Characterization of the gene encoding human peroxisomal 3-oxoacyl-



- CoA thiolase (ACAA). No large DNA rearrangement in a thiolase-deficient patient. *Biochimica et Biophysica Acta* 1090(1): 43-51.
4. Brooke, C., M.L. Ryder. 1978. Declining breeds of Mediterranean sheep. FAO. Rome. Pp62.
  5. Brookes, A. J., 1999. The essence of SNP. *Gene* 234 (1999) p:177–186
  6. Brooks, A. J., Wooh, J.W., Tunny, K.A., Waters, M., 2008. Growth hormone receptor; mechanism of action. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40:1984–1989.
  7. Carta, A., Casu, S., Salaris, S., 2009. Invited review: Current state of genetic improvement in dairy sheep. *J. Dairy Sci.* 92:5814– 5833.
  8. Chang, T.Y., Li, B.L., Chang, C.C.Y., Urano, Y., 2009. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferases. *The American Physiological Society* 297 (1): E1-E9, doi: doi.org/10.1152/ajpendo.90926.2008
  9. Chatziplis, D.G., Tzamaloukas, O., Miltiadou, D., Ligda, C., Koumas, A., Mavrogenis, A.P., Georgoudis, A., Papachristoforou, C., 2012. Evidence of major gene(s) affecting milk traits in the Chios sheep breed. *Elsevier B.V.* 105 (1-3): 61-68
  10. Christodoulou, V., Bampidis, V.A., Sossidou, E., Ambrosiadis, J., 2006. Evaluation of Florina (Pelagonia) sheep breed for growth and carcass traits. *Small Ruminant Research* 70: 239 - 247
  11. Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B., Pang, E.C.K., 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142 (1-2): 169-196
  12. Crow, J. F. Hardy, 1999. Weinberg and language impediments. *Genetics* 152: 821-825
  13. Dahm, R., 2008. “Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research”. *Human Genetics.* 122 (6):565-81
  14. Dettori, M.L., Pazzola, M., Paschino, P., Amills, M., Vacca, G.M., 2018. Association between the GHR, GHRHR, and IGF1 gene polymorphisms and milk yield and quality traits in Sarda sheep. *Journal of Dairy Science*, 101:1-9. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14914>

15. Edwards, A. W. F., Hardy, G. H. 1908 and Hardy-Weinberg Equilibrium. *Genetics* 179: 1143-1150 (2008)
16. Gubler, U., Hoffman, B. J., 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25 (1983) : 263-269
17. Hall, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.
18. Help Me Understand Genetics Genomic Research Reprinted from <https://ghr.nlm.nih.gov/> Lister Hill National Center for Biomedical Communications U.S. National Library of Medicine National Institutes of Health Department of Health & Human Services Published August 21, 2018
19. Hu, T., Foxworthy, P., Siesky, A., Ficorilli, J.V., Gao, H., Li, S., Christe, M., Ryan, T., Cao, G., Eacho, P., M. Dodson, M., Michael Lilly, L.F. 2005. Hepatic Peroxisomal Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation Is Regulated by Liver X Receptor  $\alpha$ . *Endocrinology* 146(12):5380-5387. doi: 10.1210/en.2005-0591
20. Kay, J., Weitzman, P.D., 1987. *Kreb's citric acid cycle: half a century and still turning*. London: Biochemical Society p:25. ISBN 0-904498-22-0
21. Lacroix, L., Lazar, V., Michiels, S., Ripoche, H., Dessen, P., Talbot, M., Caillou, B., Levillain, J.P., Schlumberger, M., Bidart, J.M., 2005. Follicular Thyroid Tumors with the PAX8-PPAR $\gamma$ 1 Rearrangement Display Characteristic Genetic Alterations. *American Journal of Pathology*, 167(1): 223-231
22. Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A. & Nevo, E., 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.*, 11: 2453–2465.
23. Lowenstein, J.M., 1969. *Methods in Enzymology, Volume 13: Citric Acid Cycle*. Boston: Academic Press. ISBN 0-12-181870-5
24. Maj, A., Korczak, M., Bagnicka, E., Zwierzchowski, L., Pierzchała, M., 2007. A TG-repeat polymorphism in the 5'-noncoding region of the goat growth hormone receptor gene and search for its association with milk production traits. *Small Ruminant Research* 67:279–284.

25. Mason, L.I. 1967. Sheep breeds of the Mediterranean. FAO, Published by Commonwealth Agricultural Bureaux, pp.215
26. Mendel, Gregor Johann. 1866. "Versuche über Pflanzen-Hybriden" [Experiments Concerning Plant Hybrids] [1866]. In *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn* [Proceedings of the Natural History Society of Brünn] IV (1865): 3–47. Reprinted in *Fundamenta Genetica*, ed. Jaroslav Kříženecký, 15–56. Prague: Czech Academy of Sciences, 1966
27. Miles, C.M., Wayne M., 2008. Quantitative trait locus (QTL) analysis. *Nature Education* 1(1): 208.
28. Miltiadou, D., Hager-Theodorides, A. L. , Symeou, S., Constantinou, C., Psifidi, A., Banos, G. Tzamaloukas, O., 2016. Variants in the 3' untranslated region of the ovine acetyl-coenzyme A acyltransferase 2 gene are associated with dairy traits and exhibit differential allelic expression. *Journal of Dairy Science* 100 (8):6285-6297. doi: 10.3168/jds.2016-12326. Epub 2017 Jun 16
29. Mullis, K.B., Faloona, F., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Meth Enzymol* 155:335-350
30. Orford, M., Hadjipavlou, G., Tzamaloukas, O., Chatziplis, D., Koumas, A., Mavrogenis, A., Papachristoforou, C., Miltiadou, D., 2012. A single nucleotide polymorphism in the acetyl-coenzyme A acyltransferase 2 (ACAA2) gene is associated with milk yield in Chios sheep. *Journal of Dairy Science* 95(6):3419-27. doi: 10.3168/jds.2011-4732
31. Papagrigoriou, E., Johansson, C., Smee, C., Kavanagh, K., Pike, A.C.W., Gorrec, F., Umeano, C., Gileadi, O., von Delft, F., Lee, W.H., Muller, S., Marsden, B.D., Sundstrom, M., Oppermann, U., 2007. ACAA1 - Human peroxisomal acetyl-CoA acyl transferase 1. <https://www.thesgc.org/>
32. Pegolo, S., Cecchinato, A., Mele, M., Conte, G., Schiavon, S., Bittante, G., 2016. Effects of candidate gene polymorphisms on the detailed fatty acids profile determined by gas chromatography in bovine milk. *Journal of Dairy Science* 99:4558–4573.

33. Prezioso, V.R. and Jahns A., 2000. Using Gradient PCR to Determine the Optimum Annealing Temperature, Eppendorf Scientific, Inc., One Cantiague Road, Westbury, NY 11590.
34. Rabinow, P., 1996. Making PCR. A story of biotechnology. The University of Chicago Press, ISBN: 0226701476, 9780226701479
35. Ramón, M., A. Legarra, E. Ugarte, J. J. Garde, and M. D. PérezGuzmán. 2010. Economic weights for major milk constituents of Manchega dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 93:3303–3309.
36. Roubies, N., Panousis, N., Fytianou, A., Katsoulos, P.D., Giadinis, N., Karatzias, H., 2006. Effects of Age and Reproductive Stage on Certain Serum Biochemical Parameters of Chios Sheep Under Greek Rearing Conditions. *J. Veterinary Sci.* 53 (6): 277-281, <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2006.00832.x>
37. Russel, P. J., 2009. *iGenetics: A Molecular Approach* (3rd Edition). Pearson Education Inc.-Benjamin Cummings. Boston, New York. ISBN13: 9780321569769
38. Saiki, R.K, Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H.A., Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354, 1985
39. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R.H., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491
40. Sanger, F., Donelson, J.E., Coulson, A.R., Kössel, H., and Fischer D. 1974. Determination of a nucleotide sequence in bacteriophage f1 DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 90(2): 315–33
41. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulso. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74(12): 5463-5467.
42. Sarkar, G., Kapelner, S., Sommer, S.S., 1990. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Research*, 18(24): 7465.

43. Selkoe, K., Toonen, R., 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, (9): 615–629. <http://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x>
44. Simm, G., 1998. Genetic improvement of cattle and sheep. First edition. Farming Press. pp. 433.
45. Sordillo, J. E., Sharma, S., Poon, A., Lasky-Su, J., Belanger, K., Milton, D.K., Bracken, M.B., Triche, E.W., Leaderer, B.P., Gold, D.R., Alitonjua, A.A., 2011. Effects of endotoxin exposure on childhood asthma risk are modified by a genetic polymorphism in ACAA1. *BMC Medical Genetics*, 12 158. <http://doi.org/10.1186/1471-2350-12-158>
46. Tindall, K.R., Kunkel, T.A., 1988. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 27:6008-6013
47. Wanders, R.J.A., 2013. Metabolic functions of peroxisomes in health and disease. *Biochimie*, 98: 36-44.
48. Waters, K., "Molecular Genetics", *The Stanford Encyclopedia of Philosophy* (Fall 2013 Edition), Edward N. Zalta (ed.)
49. Zervas, N., J.Hatziminaoglou, A. Georgoudis and J. Boyazoglu .1988. Characteristics and experiences of Chios breed. *J. of Agricultural Science in Finland*, 60: 576-584
50. Zong, N.C., Li, H., Li, H., Lam, M.P.Y., Jimenez, R.C., Kim, C.S., Deng, N., Kim, A.K., Choi, J.H., Zelaya, I., Liem, D., Meyer, D., Odeberg, J., Fang, C., Lu, H.J., Xu, T., Weiss, J., Duan, H., Uhlen, M., Yates, J.R., Apweiler, R., Ge, J.d, Hermjakob, H., Ping, P. 2013. Integration of Cardiac Proteome Biology and Medicine by a Specialized Knowledgebase. *Circulation Research* 113(9): 1043-1053.
51. Αιγαίον, 1935. Διμηνιαίο περιοδικό επαρχιακών. Τεύχη 1-6τομος Α. Αθήναι 1935
52. Ζυγογιάννης, Δ. 1999. Εκτροφή μηρυκαστικών (Τεύχος Α) Προβατοτροφία. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη. Σελ 431
53. Κάτανος, Ι., Μπαμπίδης Β., Σκαπέτας Β. και Λάγκα Β. 2011. Φυλές και διασταυρώσεις προβάτων υψηλής γαλακτοπαραγωγής στη χώρα μας - Μια

βιβλιογραφική ανασκόπηση, Θεσσαλονίκη: Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης (ΑΤΕΙΘ) δημοσίευση στο Γεωργία - Κτηνοτροφία, τεύχος 1/2011

54. Μιχαηλίδου Σοφία, 2011. Γενετικός Χαρακτηρισμός και Ταυτοποίηση αυτόχθονων φυλών αιγών και προβάτων (διδακτορική διατριβή)
55. Χατζημηνάογλου Ι. 2001. Πρόβατα και αίγες στην Ελλάδα και τον κόσμο (Τόμος Α). Εκδόσεις Γιαχούδη- Γιαπούλη. Θεσσαλονίκη 2001.σελ 240.
56. Ψηφίδη, Α. 2010. Προσδιορισμός των γενοτύπων προβάτων ως προς το γονίδιο της τρομώδους νόσου (scrapie) με βάση το DNA των σωματικών κυττάρων του γάλατος και σχέση μεταξύ γενοτύπων και ζωοτεχνικών χαρακτηριστικών, Θεσσαλονίκη: Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο

## **5.2 Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία**

1. ([http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/Aigoprobeta/Files\\_Aigoprobaton/fili\\_florinas.pdf](http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/Aigoprobeta/Files_Aigoprobaton/fili_florinas.pdf) , τελευταία πρόσβαση, 2018)
2. [http://www.elgo.gr/images/ioanna/periodiko/Teyxos\\_17/%CF%83%CE%B5%CE%BB.\\_4-7.pdf](http://www.elgo.gr/images/ioanna/periodiko/Teyxos_17/%CF%83%CE%B5%CE%BB._4-7.pdf) , τελευταία πρόσβαση, 2018)
3. ([http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/Aigoprobeta/Files\\_Aigoprobaton/fili\\_xiou.pdf](http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/Aigoprobeta/Files_Aigoprobaton/fili_xiou.pdf), τελευταία πρόσβαση, 2018)
4. Genomics Home Reference <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/genomicresearch/snp> (τελευταία πρόσβαση, 2018)
5. Συνεταιρισμός προβατοτρόφων φυλής Χίου «Μακεδονία», (<http://xiosbreed.com/>, (τελευταία πρόσβαση, 2018)
6. <https://www.nature.com/subjects/molecular-biology> (τελευταία πρόσβαση, 2018)
7. NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
8. dbSNP <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>
9. (Genetics home reference-us national library of medicine)

### **5.3 Πρωτόκολλα και Οδηγοί χρήσεως**

- PROTOCOL microCLEAN the easy way to clean up and concentrate your PCR Fragments before sequencing, Part Number:2MCL-XX, Version: 1.5, Gel Company, 665 Third St #240, San Francisco, CA 94107
- Thermo Fisher Scientific, DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis Applied Biosystems Chemistry Guide(second and Third Edition)
- Aplegen® gel company, microCLEAN, part number 2MCL-XX, version 1.5 protocol
- addgene Agarose gel Electrophoresis protocol:  
<https://www.addgene.org/protocols/gel-electrophoresis/>

### **5.4 Βιβλιογραφία Εικόνων**

**Εικόνα 1:** <https://www.amanivoice-chios.gr/2015/02/%CF%87%CE%B9%CF%89%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%BF-%CF%80%CF%81%CE%BF%CE%B2%CE%B1%CF%84%CE%BF-%CE%BF%CE%B9-%CF%84%CF%83%CE%BF%CF%80%CE%AC%CE%BD%CE%B7%CE%B4%CE%B5%CF%82-%CE%BD%CE%B1-%CE%B3%CE%AF%CE%BD%CE%BF/>

**Εικόνα 2:** <http://www.ypaithros.gr/fili-floarinas-genetiki-veltiosi-paa/>

**Εικόνα 4:** Smith, M. U., & Baldwin, J. T. (2015). Making Sense of Hardy-Weinberg Equilibrium. The American Biology Teacher, 77 (8), 577–582. doi: 10.1525/abt.2015.77.8.3

**Εικόνα 5:**

<https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>

**Εικόνα 7:**

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Single\\_nucleotide\\_polymorphism\\_substitution\\_mutation\\_diagram\\_-\\_cytosine\\_to\\_thymine.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Single_nucleotide_polymorphism_substitution_mutation_diagram_-_cytosine_to_thymine.png)

Εικόνα 9: F. Medeiros, G., Corrêa, F.J., Corvino, M.E., Izídio, G.S., Ramos, A., 2014. The Long Way from Complex Phenotypes to Genes: The Story of Rat Chromosome 4 and Its Behavioral Effects. World Journal of Neuroscience, 2014(4): 210

Εικόνα 10: <https://www.nature.com/scitable/content/reactions-of-oxidation-14897250>

Εικόνα 11:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/?acc=GCF\\_000298735.2&context=genome](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/?acc=GCF_000298735.2&context=genome)

Εικόνα 12: <https://www.slideshare.net/udayarajitha/gel-electrophoresis-64123389>

Εικόνα 13: <https://web.uri.edu/gsc/eppendorf-mastercycler-ep-gradient-s/>