

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΖΩΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ BMP15 ΚΑΙ GDF9  
ΚΑΙ Η ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ  
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΣΤΟ ΠΡΟΒΑΤΟ**

***ΚΑΠΕΟΛΔΑΣΗ ΚΥΡΙΑΚΗ***

**Εξεταστική Επιτροπή:**

**Χαδιώ Στ. Αναπλ. Καθηγήτρια**

**Κομινάκης Α. Επ. Καθηγητής**

**Οικονομόπουλος Ι. Επ. Καθηγητής**

**Αθήνα, Μάιος 2010**

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της μεταπτυχιακής εργασίας μου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Στ. Χαδιώ, για την επιλογή του θέματος της μελέτης, την καθοδήγησή της και τη συνεχή συμπαράσταση της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μελέτης μου. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Επίκουρο Καθηγητή κο. Αν. Κομινάκη, για την βοήθεια του σχετικά με την επεξεργασία των αποτελεσμάτων αλλά και για τις πολύτιμες υποδείξεις του, χωρίς τις οποίες θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κο. Ι. Οικονομόπουλο, για την ουσιαστική βοήθεια και συμπαράστασή του κατά τη διεξαγωγή της παρούσης εργασίας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επ. Συνεργάτη του Εργ. Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων κο. Μανώλη Λιανδρή και την Υπ. Διδάκτορα κα. Μαργαρίτα Ανδρεάδου για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της εργασίας, καθώς και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Λέκτορα κο. Δεμίρη Νικόλαο, για την βοήθεια του και τον χρόνο που μου διέθεσε.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A/A	ΤΙΤΛΟΣ	ΣΕΛΙΔΑ
1.A.	Περίληψη	
1.B.	Abstract	
2.	Εισαγωγή	1
2.1.	Γενικά	2
2.2.	Μέγεθος τοκετοομάδας – Δείκτης πολυδυμίας	3
2.3.	Παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος της τοκετοομάδας	7
2.3.1.	Μέγεθος Ωοθυλακιορρηξίας	7
2.3.2.	Γονιμότητα	7
2.3.3.	Αριθμός τοκετού	8
2.3.4.	Εμβρυικοί θάνατοι	9
2.3.5.	Αποβολές	9
2.3.6.	Θνησιμότητα των αρνιών	10
2.4.	Γονίδια που επηρεάζουν τον δείκτη ωοθυλακιορρηξίας	10
2.4.1.	Γενικά	10
2.4.2.	Γονίδιο BMPR-IB	12
2.4.3.	Γονίδιο BMP15	13
2.4.3.1.	Πολυμορφισμοί FecX <sup>I</sup> , FecX <sup>H</sup> , FecX <sup>G</sup> και FecX <sup>B</sup>	13
2.4.3.2.	Πολυμορφισμός FecX <sup>R</sup>	15
2.4.4.	Γονίδιο GDF9	15
2.4.5.	Γονίδιο Woodlands (FecX2)	17
2.4.6.	Γονίδιο Thoca	17
2.4.7.	Γονίδιο Lacaunne	18
2.4.8.	Γονίδιο Olkuska	18
2.4.9.	Γονίδιο Bell-Ile	19
2.4.10.	NZ Longwool breeds	19
2.5.	Γονίδια GDF9 και BMP15 και ο τρόπος με τον οποίο επιδρούν στα διάφορα στάδια της λειτουργίας της ωοθήκης	20
2.6.	Τρόπος δράσης πολυμορφισμών	26
2.7.	Αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολυμορφισμών	28
2.8.	Πολυμορφισμοί και Αίγες	29
2.9.	Σκοπός της μελέτης	30
3.	Υλικά και Μέθοδοι	31
3.1.	Ζωικό Υλικό	32
3.2.	Απομόνωση DNA	32
3.2.1.	Μέθοδος	32
3.3.	Ανίχνευση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs)	33
3.3.1.	Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR – Polymerase Chain Reaction)	33
3.3.1.1.	Γενικά	33
3.3.1.2.	Στάδια της PCR	33
3.3.1.3.	Αντιδραστήρια για την PCR	35
3.3.1.4.	Μέθοδος	35
3.3.2.	Πέψη των προϊόντων PCR με χρήση περιοριστικών ενζύμων (PCR – RFLP)	38

3.3.3.	Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων	42
3.3.3.1.	Γενικά	42
3.3.3.2.	Υλικά	42
3.3.3.3.	Μέθοδος	42
3.4.	Στατιστική Ανάλυση	43
3.4.1.	Γενετική ανάλυση	43
3.4.2.	Συσχέτιση μεταξύ μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών και δείκτη πολυδυμίας	44
4.	Αποτελέσματα	46
4.1.	Γενετική ανάλυση	47
4.1.1.	Σύνολο δειγμάτων	47
4.1.2.	Ανάλυση ανά δειγματοληψία	50
4.2.	Ανάλυση συσχέτισης μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών και δείκτη πολυδυμίας	54
4.2.1.	Σύνολο δειγμάτων	54
4.2.1.1.	Φυλή Χίου	54
4.2.1.2.	Καραγκούνικη φυλή	56
4.2.2.	Ανάλυση ανά δειγματοληψία	58
4.2.2.1.	Φυλή Χίου	58
4.2.2.2.	Καραγκούνικη φυλή	62
4.3.	Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες της ανίχνευσης των πολυμορφισμών με PCR – RFLP ανάλυση	66
5.	Συζήτηση	70
6.	Βιβλιογραφία	76
6.1.	Διεθνής βιβλιογραφία	77
6.2.	Ελληνική βιβλιογραφία	90

## 1.A. Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια έχει ανακαλυφθεί σημαντικός αριθμός γονιδίων που συνδέονται με αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά του προβάτου. Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια στα οποία κωδικοποιούνται η παραγόμενη από το ωάριο οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 15 (BMP15) και ο αυξητικός παράγοντας διαφοροποίησης 9 (GDF9) έχει δειχθεί ότι σχετίζονται με τη γονιμότητα και την πολυδυμία στο συγκεκριμένο είδος ζώου. Πολυμορφισμοί στα γονίδια αυτά φαίνεται ότι προκαλούν αύξηση του αριθμού ωοθυλακιορρηξιών στα ετεροζυγωτά άτομα και στειρότητα στα ομοζυγωτά.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της ύπαρξης των πολυμορφισμών αυτών σε Ελληνικές φυλές προβάτων και η συσχέτισή τους με τον αριθμό ωοθυλακιορρηξιών και την πολυδυμία.

Δείγματα αίματος συλλέχτηκαν από 92 προβατίνες φυλής Χίου και 96 Καραγκούνικης φυλής. Από τους πολυμορφισμούς του γονιδίου GDF9 εξετάστηκαν οι G1, G4, G7 και G8, ενώ από τους πολυμορφισμούς του γονιδίου BMP15 εξετάστηκαν οι FecX<sup>G</sup> και FecX<sup>B</sup> (B2, B4) με τη χρήση συνδυασμού της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) και πέψης των προϊόντων ενίσχυσης με κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Λόγω του ότι οι δειγματοληψίες δεν πραγματοποιήθηκαν την ίδια χρονική στιγμή, αλλά σε μεσοδιάστημα τεσσάρων ετών ελήφθη υπ' όψιν κατά την ανάλυση η πιθανή διαστρωμάτωση του πληθυσμού των δειγμάτων κάθε φυλής.

Τα αποτελέσματα έδειξαν διαφορές στις αλληλομορφικές συχνότητες μεταξύ των δύο φυλών με υψηλότερη συχνότητα των ευνοϊκών αλληλομόρφων Α των πολυμορφισμών G1 και G4 και του αλληλομόρφου T του πολυμορφισμού G8 για τη φυλή της Χίου. Διαφορές όμως παρατηρήθηκαν στις αλληλομορφικές συχνότητες και μέσα σε κάθε φυλή, όταν τα δείγματα εξετάστηκαν ανάλογα με την χρονολογία της δειγματοληψίας τους, γεγονός που υποδηλώνει διαφορετική γενετική σύσταση.

Δυστυχώς, το μέγεθος του δείγματος που εξετάστηκε από κάθε φυλή ζώων καθώς επίσης και τα στοιχεία που ήταν διαθέσιμα για καθένα από αυτά δεν επέτρεψαν την καταγραφή στατιστικά σημαντικών διαφορών για το σύνολο των πολυμορφισμών που μελετήθηκαν. Παρόλα αυτά υπάρχουν βάσιμες ενδείξεις ότι στη φυλή Χίου υπάρχουν γονίδια με μείζονα δράση που επηρεάζουν την γονιμότητα, ενώ αντίθετα στην Καραγκούνικη φυλή τα αποτελέσματα συνηγορούν υπέρ της ύπαρξης πολλών γονιδίων με μικρή επίδραση το καθένα στο φαινότυπο, δεδομένου ότι δεν ανιχνεύτηκαν γονίδια με μείζονα δράση.

Η πολυδυμία αποτελεί μια πολυγονιδιακή ιδιότητα και τα δύο γονίδια GDF9 και BMP15 αποτελούν ένα μικρό μόνο μέρος των γονιδίων που την επηρεάζουν. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα με σκοπό τον εντοπισμό και τη διερεύνηση της δράσης των γονιδίων που εμπλέκονται στην έκφραση της πολυδυμίας προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα τα οποία θα μπορούν να γενικευθούν και να εφαρμοστούν σε προγράμματα επιλογής.

**Λέξεις κλειδιά:** μέγεθος ωοθυλακιορρηξίας, γενετικοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί, GDF9, BMP15, φυλή Χίου, Καραγκούνικη φυλή

## 1.B. Abstract

Recent advances have revealed that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in Growth Differentiating Factor 9 (GDF9) and Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) genes are associated with infertility and increased ovulation rate in different sheep strains.

This study aims to assess the presence of SNPs that have been involved with sheep ovulation rate, in GDF9 and BMP15 genes, in two well characterized Greek sheep breeds, Chios and Karagouniki, the former with significantly increased ovulation rate compared to the latter. The results will be used to assess the impact of specific genetic markers to ovulation rate in order to implement understanding of this physiology process.

For this purpose we collected blood samples from 188 female animals of Chios breed (n=92) and Karagouniki breed (n=96).

DNA was isolated with a standardized commercial procedure. The quantity and the integrity of the DNA extract were assessed by optical density counts, horizontal electrophoresis, and PCR assay.

The animals of Chios breed emanated from the Agricultural University of Athens, while those of the Karagouniki emanated from the station of Genetic Improvement of Karditsa.

Because of the fact that the samples collected in the meantime of 2005-2009 it was taken under consideration the probability of stratified sampling. For this reason the samples were examined not only as an overall of every breed, but also separated as two subpopulations in every breed, according to the year of the samples' collection.

When the samples were examined as overall, the results showed that variants G1, G4 and G8 were found in statistically important degree in the animals of high fertility (Chios). But there was a differentiation in the results when the samples were examined as subpopulations.

Unfortunately, the size of the sample that was examined of each breed as well as the elements that were available for each one of them they did not allow the recording of statistically important differences for the total of polymorphisms that were studied. In conclusion it can be stated that there are major genes that affect the ovulation rate in Chios breed, contrary to Karagouniki breed where it seems that there are a lot of genes with small effect in ovulation rate. After all ovulation rate is affected by a large number of genes, and these two genes, GDF9 and BMP15 constitute only a small part of it. Further investigations are necessary in order to be able to come to safe conclusions.

**Key words: Ovulation rate, genetic polymorphisms, GDF9, BMP15, Chios breed, Karagouniki breed.**

## **2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**



## 2.1. Γενικά

Το πρόβατο (*Ovis aries*) είναι το πρώτο αγροτικό ζώο που κατοικιδιοποίησε ο άνθρωπος. Συγκεκριμένα από την περίοδο που ξεκίνησε η συστηματική εκτροφή των προβάτων, αυτά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ζωή του ανθρώπου. Ειδικά στις περισσότερες «μειονεκτικές» περιοχές της γης, με φτωχή βλάστηση, η εκτροφή των προβάτων είναι αυτή που εξασφαλίζει εργασία σε εκατομμύρια ανθρώπων. Επιπλέον με την εκμετάλλευση των παραγωγικών τους ιδιοτήτων (γαλακτοπαραγωγή, κρεοπαραγωγή, εριοπαραγωγή) προσφέρουν στον άνθρωπο προϊόντα υψηλής βιολογικής αξίας για τη διατροφή του, καθώς και μαλλί εξαιρετικής αντοχής και ποιότητας για διάφορες χρήσεις. Λόγω του γεγονότος ότι τα ζώα αυτά είναι σε θέση να εκμεταλλεύονται, την φτωχή βλάστηση, του σχετικά μικρού σωματικού τους μεγέθους, του εντόνως αναπτυγμένου κοινωνικού τους ενστίκτου και της μεγάλης ποικιλίας των προϊόντων που παράγουν, η εκτροφή τους επεκτάθηκε, σχεδόν σε ολόκληρη τη γη.

Η προβατοτροφία αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους κλάδους πρωτογενούς παραγωγής στην Ελλάδα. Προσφέρει εισόδημα σε χιλιάδες αγροτικές οικογένειες και συνεισφέρει σημαντικά στην αγροτική ανάπτυξη, ιδιαίτερα στις απομονωμένες και μειονεκτικές περιοχές της χώρας. Σε παγκόσμιο επίπεδο, η παραγωγή πρόβειου κρέατος αποτελεί τη βασική παραγωγική κατεύθυνση των προβατοτροφικών εκμεταλλεύσεων. Κύρια χώρα παραγωγής είναι η Κίνα (FAOSTAT, 2008) ενώ την τρίτη θέση σε παραγωγή πρόβειου κρέατος καταλαμβάνει παγκοσμίως η Ε.Ε (FAOSTAT, 2008, εκτιμώμενα στοιχεία). Η εκτροφή προβάτων για παραγωγή κρέατος παρουσιάζει ενδιαφέρον για τις βόρειες χώρες της Ε.Ε., όπου τα πρόβατα εκτρέφονται σχεδόν αποκλειστικά για το σκοπό αυτό. Η εκτροφή προβάτων για παραγωγή γάλακτος αποτελεί δραστηριότητα που ασκείται κυρίως στις Μεσογειακές χώρες, όπου αρμέγεται το μεγαλύτερο ποσοστό των εκτρεφόμενων ζώων. Οι κύριες χώρες παραγωγής πρόβειου γάλακτος στην Ε.Ε. είναι η Ελλάδα, η Ιταλία, η Πορτογαλία, η Ισπανία και η Γαλλία. Η Ελλάδα είναι μία από τις σημαντικότερες χώρες παραγωγής πρόβειου γάλακτος και κρέατος στην Ε.Ε (μεικτή κατεύθυνση), με υψηλό αριθμό εκτρεφόμενων ζώων (FAOSTAT, 2008). Στον Πίνακα 2.1.1. φαίνεται ο πρόβειος πληθυσμός στην Ευρώπη ανά χώρα καθώς και η παραγωγή των χωρών σε γάλα και κρέας (FAOSTAT, 2008).

**Πίνακας 2.1.1. Πρόβειος πληθυσμός, παραγωγή γάλακτος και κρέατος στην**







<b>ΧΩΡΑ</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΩΝ ΑΤΟΜΩΝ</b>	<b>ΓΑΛΑ (tn)</b>	<b>ΚΡΕΑΣ (tn)</b>
ΑΥΣΤΡΙΑ	351329	7960	7256
ΒΕΛΓΙΟ	132000	-	3300
ΒΟΥΛΓΑΡΙΑ	1526392	88243	16021
ΚΥΠΡΟΣ	267300	15670	3335
ΤΣΕΧΙΑ	183084	246	1749
ΔΑΝΙΑ	136049	-	1756

**Ευρώπη ανά χώρα (FAOSTAT, 2008).**

ΕΣΤΟΝΙΑ	72400	-	455
ΦΙΝΛΑΝΔΙΑ	122218	-	770
ΓΑΛΛΙΑ	8187329	247190	90300
ΓΕΡΜΑΝΙΑ	2437000	-	25000
ΕΛΛΑΔΑ	8904000	785000	90500
ΟΥΓΓΑΡΙΑ	1231000	1960	911
ΙΡΛΑΝΔΙΑ	5061400	-	58721
ΙΤΑΛΙΑ	8237000	564550	57327
ΛΕΤΟΝΙΑ	53900	-	628
ΛΙΘΟΥΑΝΙΑ	43300	-	501
ΛΟΥΞΕΜΒΟΥΡΓΟ	8614	-	41
ΜΑΛΤΑ	12315	2020	100
ΟΛΛΑΝΔΙΑ	1213000	-	13558
ΠΟΛΩΝΙΑ	323635	515	1433
ΠΟΡΤΟΓΑΛΙΑ	3144600	92000	25000
ΡΟΥΜΑΝΙΑ	8469000	656833	46589
ΣΛΟΒΑΚΙΑ	361634	8861	967
ΣΛΟΒΕΝΙΑ	131180	418	1692
ΙΣΠΑΝΙΑ	19952300	441400	156980
ΣΟΥΗΔΙΑ	520900	-	4631
ΗΝΩΜΕΝΟ ΒΑΣΙΛΕΙΟ	33131000	-	326000
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>95309879</b>	<b>2127866</b>	<b>814929</b>

## 2.2. Μέγεθος Τοκετοομάδας – Δείκτης Πολυδυμίας

Ακόμη και στα αμελγόμενα πρόβατα, στα οποία ανήκουν όλες οι ελληνικές φυλές προβάτων, το μέγεθος της τοκετοομάδας, ειδικά στον απογαλακτισμό, είναι αυτό που καθορίζει σε σημαντικό ποσοστό το οικονομικό αποτέλεσμα μιας προβατοτροφικής εκμετάλλευσης. Το μέγεθος της τοκετοομάδας καθορίζεται από τους ακόλουθους παράγοντες:

-  Δείκτης ωοθυλακιορρηξίας,
-  Γονιμότητα,
-  Αριθμός τοκετού,
-  Εμβρυϊκή θνησιμότητα,
-  Αποβολές,
-  Θνησιμότητα αρνιών.

Αυτές οι ιδιότητες με τη σειρά τους επηρεάζονται από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες (Ρογδάκης, 2004).

Ο Δείκτης Πολυδυμίας είναι μια παράμετρος εκτίμησης της αναπαραγωγικής ικανότητας των προβάτων, η οποία εκτιμάται στο σύνολο του ποιμνίου και όχι για μεμονωμένα άτομα. Είναι ο λόγος του αριθμού των αρνιών που γεννήθηκαν διά του αριθμού των προβατίνων που γέννησαν, δηλαδή:

$$\text{Δείκτης Πολυδυμίας} = \frac{\text{Αριθμός γεννηθέντων αρνιών}}{\text{Αριθμός προβατών που χνήσαν}} * 100$$

Η πολυδυμία αποτελεί χαρακτηριστικό, συνδεδεμένο με συγκεκριμένες φυλές προβάτων. Υπάρχουν φυλές με αυξημένο δείκτη πολυδυμίας και φυλές με μειωμένο δείκτη. Ανάμεσα στις πιο γόνιμες φυλές συμπεριλαμβάνονται η Φινλανδική Landrace με δείκτη πολυδυμίας 2,7, η Romanov, με δείκτη πολυδυμίας 3,0, το ορεινό πρόβατο των Άλπεων (Δ.Π. = 2,5-3,1), το πρόβατο της Φλάνδρας (Δ.Π. = 2,5-2,9), το πρόβατο Demane στο Μαρόκο (Δ.Π. = 3,8) και άλλες. Μειωμένη γονιμότητα παρουσιάζουν οι φυλές Merinos (Δ.Π. = 1,0) και Romney (Δ.Π. = 1,30). Όσον αφορά τις εγχώριες ελληνικές φυλές αυξημένη γονιμότητα έχει η φυλή Χίου (Δ.Π. = 1,8), των Σφακίων (Δ.Π. = 1,78) και της Κύμης (Δ.Π. = 1,75) (Ρογδάκης 2002) . Στον Πίνακα 2.2.1. ενδεικτικά αναφέρονται κάποιες φυλές προβάτων και ο δείκτης πολυδυμίας τους.

Το μεγαλύτερο ποσοστό παραλλακτικότητας του Δείκτη Πολυδυμίας μεταξύ των διαφόρων φυλών προβάτων οφείλεται στην παραλλακτικότητα του μεγέθους της ωοθυλακιορρηξίας. Το μέγεθος της ωοθυλακιορρηξίας εξαρτάται κυρίως από τη γενετική βάση της κάθε φυλής και επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από την εφαρμοζόμενη πρακτική διαχείρισης του ποιμνίου.

Η πολυδυμία οφείλεται συνήθως, στην ταυτόχρονη γονιμοποίηση δύο ή περισσοτέρων ωαρίων από ισάριθμα σπερματοζώαρια και αποτελεί σύνηθες φαινόμενο σε πολλά είδη ζώων. Σπανιότερα, οι δίδυμοι απόγονοι μπορεί να προέρχονται από ένα ωάριο που γονιμοποιήθηκε από ένα σπερματοζώαριο, αλλά έγινε διαχωρισμός του γονιμοποιημένου ωαρίου (μονωογενείς ή μονοζυγωτικοί δίδυμοι). Στην περίπτωση αυτή η ομοιότητα των διδύμων είναι απόλυτη.

**Πίνακας 2.2.1. Εκδήλωση της πολυδυμίας σε προβατίνες ορισμένων φυλών (Ζυγογιάννης, 2006)**

ΦΥΛΗ	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗ
Καραμάνικο Κατσικάς	1,07	1,03 – 1,15
Σαρδηνίας	1,15	1,08 – 1,20
Mérinos Précoce	1,15	1,10 – 1,55
Ile de France	1,22	1,10 – 1,55

Berrichornne du Cher	1,28	1,15 – 1,33
Suffolk	1,30	1,20 – 1,50
RomneyN. Ζηλανδίας	1,30	1,22 – 1,62
Southdown	1,39	1,20 – 1,65
Württemberg	1,57	1,40 – 1,65
Texel	1,57	1,35 – 1,85
Χίου	1,72	1,40 – 1,82
Border Leicester	1,72	1,50 – 1,90
Φρισλανδίας	2,00	1,73 – 2,50
Avranchin	2,10	1,80 – 2,50
Φινλανδίας	2,95	1,95 – 3,25
Romanov	3,02	1,84 – 3,20

Η πολυδυμία, μέσω του μεγέθους της τοκετομάδας είναι ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά τη γαλακτοπαραγωγική ικανότητα των προβατίνων (AlexanderandDavies, 1959; Peartetal., 1972). Οι προβατίνες που γεννούν και θηλάζουν περισσότερα από ένα αρνιά παράγουν κατά μέσο όρο περισσότερο γάλα. Μετρήσεις στις φυλές Χίου και Καραγκούνικη έδειξαν ότι οι προβατίνες που θηλάζουν περισσότερα από δύο αρνιά παράγουν περίπου 40% περισσότερο γάλα από τις προβατίνες με μονόδυμους τοκετούς (Μπιζέλης, 1989). Η επίδραση του μεγέθους της τοκετομάδας στην ποσότητα του παραγόμενου γάλακτος είναι περισσότερο έντονη κατά τη διάρκεια των τεσσάρων πρώτων εβδομάδων της γαλακτικής περιόδου (Treacher, 1985). Η επίδραση αυτή, αν και μειωμένη παραμένει και μετά τον απογαλακτισμό των αρνιών (Ρογδάκης και συν., 1988), όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.2.2.).

**Πίνακας 2.2.2. Επίδραση του τύπου του τοκετού στην ποσότητα του αμελγόμενου γάλακτος (Ρογδάκης και συν., 1988)**

Φυλή Προβάτων	Τύπος Τοκετού	
	Μονόδυμος	Δίδυμος
	Παραγόμενογάλα(lt)	

<b>Καραγκούνικη</b>	100	102
<b>Άρτας</b>	100	101
<b>Ορεινή Ηπείρου</b>	100	104
<b>Καραμάνικη</b>	100	102

Η επίδραση του μεγέθους της τοκετοομάδας στο ύψος της γαλακτοπαραγωγής έχει δύο συνιστώσες, μία προγεννητική και μία μεταγεννητική. Κατά τη διάρκεια της κυοφορίας ο αριθμός των εμβρύων επηρεάζει την παραγωγή της πλακουντικής γαλακτογόνου ορμόνης, η οποία έχει μαστοτροφική δράση (Marta*et al.*, 1976; Chan*et al.*, 1976; Delouis*et al.*, 1980, Ζυγογιάννης, 2006). Επομένως, τα έμβρυα επιδρούν στην ανάπτυξη του μαστικού αδένα κατά το τελευταίο στάδιο της κυοφορίας και κατά συνέπεια επηρεάζουν την παραγόμενη ποσότητα γάλακτος κατά την επερχόμενη γαλακτική περίοδο. Το ίδιο φαινόμενο αλλά σε μικρότερη έκταση, παρατηρείται και σε περίπτωση κυοφορίας ενός εμβρύου, υψηλού σωματικού βάρους (Ζυγογιάννης, 2006). Η μεταγεννητική συνιστώσα του μεγέθους της τοκετοομάδας ασκεί μεγαλύτερη επίδραση στο ύψος της γαλακτοπαραγωγής κατά το θηλασμό από ότι η προγεννητική συνιστώσα. Η επίδραση του αριθμού των αρνιών στην ποσότητα του γάλακτος έχει αποδοθεί στην αυξημένη ένταση θηλασμού και παράλληλα στο γεγονός ότι σε πολλές γαλακτοπαραγωγικές φυλές το ένα αρνί αδυνατεί να καταναλώσει ολόκληρη τη διαθέσιμη ποσότητα γάλακτος, οπότε η κένωση του μαστού δεν είναι πλήρης. Αυτό συνεπάγεται μείωση της συνολικής γαλακτοπαραγωγής. Αντίθετα, οι πολύδυμες τοκετοομάδες καταναλώνουν ολόκληρη τη διαθέσιμη ποσότητα γάλακτος και διεγείρουν εντονότερα τον μαστό (Alexander and Davies, 1959).

Επομένως το μέγεθος της τοκετοομάδας σχετίζεται θετικά με το ύψος της γαλακτοπαραγωγής. Συμπερασματικά λοιπόν, μπορεί να διατυπωθεί η άποψη πως κάθε διαχειριστική επέμβαση που αυξάνει την πολυδυμία αυξάνει παράλληλα και τη γαλακτοπαραγωγή. Γίνεται άμεσα κατανοητό πως για οικονομικούς λόγους, η αύξηση της πολυδυμίας αποτελεί τον κύριο στόχο της εκάστοτε εκτροφής. Προκειμένου να βρεθούν τρόποι μέσω των οποίων θα επέλθει αύξηση του Δείκτη Πολυδυμίας κρίνεται απαραίτητο να αναλυθούν οι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν το μέγεθος της τοκετοομάδας, μέσω του ρυθμού ωοθυλακιορρηξίας και κατά συνέπεια του Δείκτη Πολυδυμίας.

### **2.3. Παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος της τοκετοομάδας**

Σε αυτό το κεφάλαιο θα αναλυθούν οι παράγοντες οι οποίοι, όπως προαναφέρθηκε, επηρεάζουν το μέγεθος της τοκετοομάδας σε ποικίλο βαθμό.

### 2.3.1. Μέγεθος ωοθυλακιορρηξίας

Οι περισσότερες φυλές προβάτων έχουν μία ή δύο ωοθυλακιορρηξίες, αλλά παρατηρείται μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των φυλών, αλλά και μεταξύ ατόμων της ίδιας φυλής, η οποία επηρεάζεται από τους γενετικούς παράγοντες, την ηλικία, την εποχή και το επίπεδο διατροφής. Κατά τις δύο τελευταίες δεκαετίες έχει διαπιστωθεί σε πολλές φυλές και πληθυσμούς η ύπαρξη μεμονωμένων γονιδίων, αλλά και πολυμορφισμοί αυτών, με έντονη επίδραση στο μέγεθος της ωοθυλακιορρηξίας. Μερικές από τις φυλές που έχουν μελετηθεί είναι οι Booroola, Inverdale, Icelandic, Javanese, Cambridge, Belclare και Woodlands.

### 2.3.2. Γονιμότητα

Όταν το σπέρμα του κριού είναι φυσιολογικό και η σύζευξη πραγματοποιείται στον κατάλληλο χρόνο, τότε η πιθανότητα γονιμοποίησης είναι μεγάλη. Οι προβατίνες που δεν γονιμοποιούνται κατά την πρώτη φυσική οχεία με τον κριό ή με τεχνητή σπερματέγχυση (Τ.Σ.) καθώς και αυτές που έχασαν το έμβρυο ή τα έμβρυα πριν την 9<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου, εμφανίζουν οίστρο 16 - 17 ημέρες αργότερα και μπορούν να γονιμοποιηθούν εκ νέου (Ρογδάκης, 2004). Το ποσοστό σύλληψης είναι συνήθως χαμηλότερο κατά τον πρώτο οίστρο των αμνάδων (Ρογδάκης, 2004).

Ο συντελεστής κληρονομικότητας των ποσοστών σύλληψης είναι πολύ μικρός, της τάξης του 5% (Ρογδάκης, 2004). Επομένως η παραλλακτικότητα που παρατηρείται στη γονιμότητα, οφείλεται σε διαφορές στα διαχειριστικά μέτρα που εφαρμόζονται στο ποίμνιο, καθώς και σε περιβαλλοντικές διαφορές, με κυριότερο περιβαλλοντικό παράγοντα να αποτελεί η θερμοκρασία περιβάλλοντος κατά την εποχή των συζεύξεων.

Επίσης έναν πολύ σημαντικό παράγοντα για την γονιμότητα των προβατίνων αποτελεί και η διατροφή. Κατά την περίοδο των οχειών οι προβατίνες πρέπει να έχουν την κατάλληλη σωματική κατάσταση, η οποία δεν πρέπει να είναι ούτε κακή (αδύνατα ζώα) ούτε υπερβολική (υπερπαχυμένα ζώα), έτσι ώστε να παρουσιάσουν μεγαλύτερο δείκτη ωοθυλακιορρηξίας. Και οι δύο αυτές περιπτώσεις επηρεάζουν αρνητικά τη γονιμότητα των ζώων, αλλά και την πολυδυμία τους (Ζέρβας και συν., 2000).

Η επίδραση της μη επαρκούς διατροφής έγκειται στο γεγονός ότι προκαλεί καθυστέρηση ή αναστολή εκδήλωσης οίστρου, αλλά και υψηλό επίπεδο επιστροφών (Μπιζέλης, 1989). Γι' αυτό απαιτείται αύξηση του επιπέδου διατροφής που επιτυγχάνεται με την εφαρμογή της τόνωσης (flushing). Με τον όρο τόνωση εννοείται η χορήγηση επιπλέον ποσότητας μείγματος γαλακτοπαραγωγής (200 - 400 γραμμάρια / ημέρα) για δύο περίπου εβδομάδες πριν την έναρξη των οχειών, με στόχο τη βελτίωση της σωματικής κατάστασης των ζώων και κατ' επέκταση του ποσοστού ωοθυλακιορρηξίας (Ζέρβας και συν., 2000). Μόλις όμως τα ζώα οχευθούν διακόπτεται αμέσως η παροχή του μείγματος αυτού, γιατί η αύξηση του επιπέδου διατροφής στο στάδιο αυτό επιφέρει μείωση στη συγκέντρωση της προγεστερόνης, η οποία με τη σειρά της προκαλεί αυξημένη εμβρυϊκή θνησιμότητα και τελικά μειωμένη πολυδυμία.

Γι' αυτό τον λόγο, 2-3 εβδομάδες μετά την οχεία, χορηγείται τροφή που καλύπτει το 90% των αναγκών των ζώων (Ζέρβας και συν. 2000). Όταν τα ζώα είναι παχύσαρκα, τότε κατά την προπαρασκευαστική περίοδο (2-3 εβδομάδες πριν την έναρξη των οχειών) εφαρμόζεται περικοπή του σιτηρεσίου, ώστε τα ζώα κατά την οχεία να έχουν την ενδεδειγμένη σωματική κατάσταση (Ζέρβας και συν. 2000).

### **2.3.3. Αριθμός τοκετού**

Από μελέτες που έχουν γίνει στο πρόβατο Άρτας έχει βρεθεί ότι η πολυδυμία αυξάνεται κατά 11,46% από τον 1<sup>ο</sup> στον 2<sup>ο</sup> τοκετό και αυτή η αύξηση συνεχίζεται με μικρότερο ρυθμό, μέχρι και τον 6<sup>ο</sup> τοκετό, οπότε και μεγιστοποιείται (Παπαβασιλείου, 2003).

Στη φυλή Χίου έχει βρεθεί ότι η πολυδυμία αυξάνεται μέχρι το 3<sup>ο</sup> έτος της ηλικίας (οπότε έχει και τη μεγαλύτερη τιμή). Στη συνέχεια ακολουθεί μικρή μείωση μέχρι το 7<sup>ο</sup> έτος και τέλος μειώνεται ουσιαστικά από το 8<sup>ο</sup> έτος και μετά (Ζέρβας, 1965). Για την ίδια φυλή βρέθηκε κάποια χρόνια αργότερα ότι ο συντελεστής πολυδυμίας αυξάνεται μέχρι και τον 4<sup>ο</sup> τοκετό (Γαβρηλίδης και συν., 1988; Παππά – Μιχαηλίδου και συν., 2000).

Για την Καραγκούνικη φυλή, ο συντελεστής πολυδυμίας είναι μικρότερος στα πρόβατα ηλικίας ενός περίπου έτους και μεγαλύτερος μεταξύ 2<sup>ου</sup> και 5<sup>ου</sup> έτους της ηλικίας, ενώ στη συνέχεια εμφανίζεται ελαφρά μειωμένος (Παπαδημητρίου, 1975). Για την ίδια φυλή έχει παρατηρηθεί αύξηση της πολυδυμίας μέχρι τον 5<sup>ο</sup> τοκετό (Παππά – Μιχαηλίδου και συν., 2000).

Στη φυλή Σφακίων, ο συντελεστής πολυδυμίας αυξάνεται μέχρι την ηλικία των 6 ετών (Βολάνης και Τζεράκης, 1997), στη φυλή της Λέσβου έχει τη μεγαλύτερη τιμή στον 5<sup>ο</sup> τοκετό (Παπαβασιλείου και συν., 1998) και στη φυλή Φλώρινας αυξάνεται μέχρι τον 6<sup>ο</sup> τοκετό (Παππά – Μιχαηλίδου και συν., 2000).

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την άποψη ότι η ηλικία της προβατίνας και ο αριθμός των τοκετών που έχει πραγματοποιήσει επηρεάζουν το μέγεθος της τοκετοομάδας.

### **2.3.4. Εμβρυϊκοί θάνατοι**

Όταν οι προβατίνες εκτρέφονται σε ευνοϊκό περιβάλλον, η εμβρυϊκή θνησιμότητα που παρατηρείται, προφανώς δεν οφείλεται στη δράση μεμονωμένων εξωγενών παραγόντων, αλλά στην εγγενή αδυναμία των εμβρύων να αναπτυχθούν ή στην αδυναμία των ωαγωγών και της μήτρας να υποστηρίξουν την ανάπτυξη τους. Η εμβρυϊκή αυτή θνησιμότητα καλείται πρώιμη εμβρυϊκή θνησιμότητα (Ζυγογιάννης, 2006).



Το ποσοστό της θνησιμότητας εξαρτάται από τον αριθμό των εμβρύων που εισέρχονται στη μήτρα. Η πιθανότητα επιβίωσης ενός εμβρύου ελαττώνεται όσο αυξάνεται ο αριθμός των εμβρύων (Ρογδάκης, 2004). Αν και προβατίνες φυλών που χαρακτηρίζονται από υψηλό δείκτη ωοθυλακιορρηξίας προσφέρουν καλύτερο μητρικό περιβάλλον, υπάρχουν ενδείξεις ότι όσο υψηλότερος είναι ο δείκτης πολυδυμίας, τόσο μεγαλύτερη είναι η πρώιμη εμβρυϊκή θνησιμότητα. Έτσι ενώ η πολυδυμία αυξάνεται με την αύξηση του δείκτη ωοθυλακιορρηξίας μέχρι 5 στη συνέχεια μειώνεται (Ζυγογιάννης, 2006).

Όσον αφορά τον γονότυπο του εμβρύου, οι γονοτυπικές ανωμαλίες είναι η κυριότερη αιτία της πρώιμης εμβρυϊκής θνησιμότητας, οι οποίες είναι δυνατό να προέρχονται από τους γονείς αν και συνήθως είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων και χρωματοσωματικών ανωμαλιών του ίδιου του εμβρύου (Ζυγογιάννης, 2006). Μικρή επίσης επίδραση στην εμβρυϊκή θνησιμότητα φαίνεται να ασκεί το γεγονός ότι ο γονότυπος του εμβρύου, φέρει το ήμισυ των γονιδίων από τον πατέρα του και το ήμισυ των γονιδίων από τη μητέρα του (Ρογδάκης, 2004). Έτσι είναι πιθανόν ο ίδιος ο μητρικός οργανισμός να απορρίψει το έμβρυο θεωρώντας το ως κάτι «ξένο» προς αυτόν.

Επιπλέον η θρεπτική κατάσταση της μητέρας φαίνεται να επηρεάζει την εμβρυϊκή θνησιμότητα. Τόσο η υπερκατανάλωση τροφής όσο και ο υποσιτισμός των προβατίνων επιδρούν αρνητικά στη βιωσιμότητα των εμβρύων (Ζυγογιάννης, 2006).

Τέλος, σημαντικό ρόλο φαίνεται να έχει και η ηλικία του ζώου, καθώς είναι αποδεδειγμένο ότι οι αμνάδες παρουσιάζουν μεγαλύτερη πρώιμη εμβρυϊκή θνησιμότητα από ότι οι ώριμες προβατίνες (Ρογδάκης, 2004, Ζυγογιάννης, 2006).

### **2.3.5. Αποβολές**

Με τον όρο αποβολή εννοείται η απώλεια του κνήματος, μετά την οργανογένεση ή μετά την εμφύτευση του εμβρύου ή των εμβρύων στη μήτρα. Το μεγαλύτερο ποσοστό των αποβολών που συμβαίνουν σε ένα ποίμνιο προβάτων οφείλεται κυρίως σε μολυσματικές ασθένειες. Επίσης ένα μικρό ποσοστό αποβολών θεωρείται φυσιολογικό ως αποτέλεσμα κακής πρακτικής διαχείρισης του ποιμνίου (κακομεταχείριση των ζώων, τραυματισμοί, σφάλματα διατροφής, τοξικοί παράγοντες).

### **2.3.6. Θνησιμότητα των αρνιών**

Η θνησιμότητα των αρνιών κατά τη γέννηση και κατά τη διάρκεια του θηλασμού είναι συχνή και περιορίζει το μέγεθος των τοκετοομάδων στον απογαλακτισμό σε σημαντικό βαθμό. Ο συντελεστής κληρονομικότητας της θνησιμότητας των αρνιών έχει υπολογιστεί ότι κυμαίνεται μεταξύ 5 - 10% (Ρογδάκης, 2004). Επομένως η παραλλακτικότητα της θνησιμότητας των αρνιών οφείλεται πρωτίτως σε περιβαλλοντικούς παράγοντες δηλαδή κακή πρακτική διαχείριση του

ποιμνίου. Ο ρυθμός θνησιμότητας αυξάνεται ανάλογα με το μέγεθος της τοκετοομάδας. Αυτό προφανώς σχετίζεται με το ατομικό σωματικό βάρος των αρνιών καθώς τα λιποβαρή αρνιά αντιμετωπίζουν δυσκολίες επιβίωσης λόγω αδυναμίας, ενώ τα υπέρβαρα λόγω δυστοκιών.

## **2.4. Γονίδια που επηρεάζουν τον Δείκτη Ωοθυλακιορρηξίας**

### **2.4.1. Γενικά**

Η σημαντική πρόοδος που σημειώθηκε στην επιστήμη της γενετικής οδήγησε στην απομόνωση ενός γονιδιακού τόπου, από τους Piper και Bindon (1982), ο οποίος ασκεί κυρίαρχη επίδραση στο μέγεθος της τοκετοομάδας της παραλλαγής Booroola, της φυλής Merinos. Στη συνέχεια οι Davis *et al.* (1982) σε έρευνα που πραγματοποίησαν σε ποίμνια προβάτων Booroola της Νέας Ζηλανδίας απέδειξαν την επίδραση αυτού του γονιδιακού τόπου στο μέγεθος ωοθυλακιορρηξίας (Davis *et al.*, 1982).

Στοιχεία από μεγάλο αριθμό μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια σε πολλές φυλές προβάτων απέδειξαν την ύπαρξη σημαντικού αριθμού γονιδίων, αλλά και γενετικών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms - SNPs) αυτών, που συνδέονται με το μέγεθος της ωοθυλακιορρηξίας και κατ' επέκταση με τον δείκτη πολυδυμίας και τη στειρότητα. Μέχρι σήμερα οι πολυμορφισμοί που έχουν ανακαλυφθεί, αφορούν στο γονίδιο GDF9 (Παράγοντας ανάπτυξης και διαφοροποίησης 9 – Growth Differentiation Factor 9), στο γονίδιο BMP15 (Οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 15 – Bone Morphogenetic Protein 15), καθώς και στον υποδοχέα της οστικής μορφογενετικής πρωτεΐνης (BMPR-IB – Bone Morphogenetic Protein Receptor-IB).

Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών αποτελούν μέλη της υπερικογένειας των μεταμορφωτικών αυξητικών παραγόντων β (Transforming Growth Factor β - TGF-β), που και αυτή η οικογένεια με τη σειρά της ανήκει στην οικογένεια των αυξητικών παραγόντων.

Οι αυξητικοί παράγοντες είναι ευρέως διαδεδομένα πεπτίδια των οποίων η δράση είναι είτε παρακρινική, είτε αυτοκρινική και αφορά στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της βιωσιμότητας των κυττάρων. Η υπερικογένεια των μεταμορφωτικών αυξητικών παραγόντων β περιλαμβάνει μια ομάδα πρωτεϊνών με παρόμοια δομή, αλλά με ποικίλες λειτουργίες. Η ομάδα αυτή των πρωτεϊνών αποτελείται από τουλάχιστον 35 μέλη στα σπονδυλωτά. Αυτές οι πρωτεΐνες βρίσκονται κατανομημένες σε όλο το σώμα και λειτουργούν ως εξωκυτταρικοί υποκαταστάστες και εμπλέκονται σε έναν μεγάλο αριθμό φυσιολογικών διεργασιών κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής, αλλά και της μετ'εμβρυϊκής ζωής (Massague and Wotton, 2000). Τα μέλη αυτής της υπερικογένειας έχουν χωριστεί σε υποοικογένειες ανάλογα με τη δομή τους. Αυτές είναι η υποοικογένεια TGF-β (TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3), η υποοικογένεια των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών που

περιλαμβάνει περίπου 20 μέλη, η υποοικογένεια του αυξητικού παράγοντα ανάπτυξης και διαφοροποίησης που αριθμεί περί τα 9 μέλη, η υποοικογένεια ακτιβινών / ανασταλτινών (περιλαμβάνονται οι ακτιβίνες A, AB, B και οι ανασταλτίνες A και B), η υποοικογένεια του νευροτροπικού παράγοντα που προέρχεται από νευρογλοιακά κύτταρα (GDNF), καθώς και διάφορα άλλα μέλη όπως είναι η αντι-μυλλέριος ορμόνη (γνωστή και ως AMH – anti-Mullerian hormone και ως MIS – Mullerian inhibiting substance) και η κομβίνη (nodal).

Τα περισσότερα μέλη της υπεροικογένειας αυτής, με εξαίρεση τις υποοικογένειες GDNF και των ανασταλτινών, ασκούν τις επιδράσεις τους στα κύτταρα – στόχους, δεσμεύοντας και σχηματίζοντας ετερο – τετραμερή συμπλέγματα με τους δύο τύπους υποδοχέων κινάσης Ser / Thr στην επιφάνεια των κυττάρων, ορίζοντας έτσι τους υποδοχείς τύπου I και τύπου II (MassagueandWotton, 2000; Miyazawaetal., 2002; Changetal., 2002). Στα θηλαστικά είναι ήδη γνωστοί επτά υποδοχείς τύπου I και πέντε υποδοχείς τύπου II που σχετίζονται με τη μεταφορά σήματος των μελών της υπεροικογένειας TGF-β. Άλλα συνδεδετικά μόρια της υπεροικογένειας αυτής μπορούν να σχηματίσουν ενεργά συμπλέγματα, δεσμεύοντας εξωκυτταρικά συνδυασμό υποδοχέων τύπου I και II. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων μέσω της φωσφορυλίωσης της ενδοκυτταρικής κινάσης οδηγεί στη φωσφορυλίωση των μορίων που καλούνται receptor – regulatedSmads (R-Smads). Αυτά τα μόρια, συνεργάζονται με μια κοινή Smad πρωτεΐνη και μεταφέρονται στον πυρήνα του κυττάρου προκειμένου να διαφοροποιήσουν την έκφραση του γονιδίου στόχου μέσω αλληλεπίδρασης με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες.

Όσον αφορά τα γονίδια GDF9, BMP15 και BMPR-IB, έχουν ανακαλυφθεί συνολικά οκτώ γενετικοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί για το γονίδιο GDF9 (G1 - G8), τέσσερις για το γονίδιο BMP15 (FecX<sup>I</sup>, FecX<sup>H</sup>, FecX<sup>G</sup>, FecX<sup>B</sup>) και ένας για το γονίδιο του υποδοχέα της οστικής μορφογενετικής πρωτεΐνης (BMPR-IB) (FecB) (Hanrahanetal., 2004; Davis, 2005; McNattyetal., 2005). Περισσότερες πληροφορίες για τα τρία αυτά γονίδια αλλά και για άλλα που έχουν βρεθεί ότι επηρεάζουν την ωοθηκική λειτουργία αναφέρονται στα επόμενα κεφάλαια.

Η ταυτοποίηση των προβάτων που φέρουν φυσικούς πολυμορφισμούς σε γονίδια που ανήκουν στην υπεροικογένεια των TGF-β μας δείχνει το δρόμο προκειμένου να συνεχιστούν οι έρευνες έτσι ώστε να γίνει κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο πραγματοποιείται η αναπαραγωγική διαδικασία στα θηλαστικά, αλλά και να καταστούν εκμεταλλεύσιμα από ζωοτεχνικής άποψης τα πλεονεκτήματα αυτών των πολυμορφισμών.

#### **2.4.2. Γονίδιο BMPR-IB**

Αξιόλογη περίπτωση τόσο από οικονομική όσο και από επιστημονική άποψη αποτελεί η μεγάλη γονιμότητα που παρουσιάζει η παραλλαγή Booroola του Μερινόμαλλου προβάτου της Αυστραλίας. Ο δείκτης πολυδυμίας του Μερινόμαλλου προβάτου της Αυστραλίας κυμαίνεται γύρω στο 95%, ενώ ο δείκτης πολυδυμίας της παραλλαγής Booroola υπερβαίνει το 250%. Το πρόβατο Booroola δημιουργήθηκε από

τους αδελφούς Seers στην ιδιοκτησία τους με την επωνυμία Booroola, στην περιοχή Cooma της νότιας Νέας Ουαλίας κατά τις δεκαετίες 1940 και 1950 και βελτιώθηκε αργότερα από την CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation). Τόσο η κρεατοπαραγωγική όσο και η γαλακτοπαραγωγική ικανότητα των Μερινόμαλλων προβάτων είναι χαμηλή. Η σημασία της παραλλαγής Booroola έγκειται επομένως στη δημιουργία γόνιμων σειρών μητέρων στο πλαίσιο διασταυρώσεων προς αύξηση της αποτελεσματικότητας διαφόρων συστημάτων παραγωγής πρόβειου κρέατος.

Τα υψηλά αυτά ποσοστά πολυδυμίας έχει αποδειχθεί ότι οφείλονται σε έναν πολυμορφισμό στον υποδοχέα της οστικής μορφογενετικής πρωτεΐνης (BMPP-IB), ο οποίος εκφράζεται στα ωκύτταρα και στα κοκκώδη κύτταρα (Wilson*et al.*, 2001). Ο πολυμορφισμός αυτός εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6 του προβάτου και συμβολίζεται ως FecB (Montgomery*et al.*, 2001; Mulsant*et al.*, 2001; Souza*et al.*, 2001; Wilson*et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2002). Προβατίνες οι οποίες κληρονομούν ένα αντίγραφο του αλληλομόρφου FecB παράγουν κατά μέσο όρο περίπου 1,5 ωάρια περισσότερα και γεννούν έναν επιπλέον αμνό σε κάθε τοκετό. Τα ομοζυγωτά άτομα για αυτόν τον πολυμορφισμό παράγουν τρία επιπλέον ωάρια με αποτέλεσμα την γέννηση περίπου 1,5 επιπλέον αμνών σε κάθε τοκετό.

Αξίζει να αναφερθεί ότι με τα στοιχεία από διάφορες δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, προκειμένου να εξακριβωθεί το μέγεθος του ποσοστού των ατόμων που φέρουν τον πολυμορφισμό αυτό, στάθηκε δυνατό να βρεθεί η προέλευση της παραλλαγής Booroola Merinos της Αυστραλίας. Η μελέτη των στοιχείων οδήγησε στο πρόβατο Garole της Ινδίας (γνωστό επίσης και ως Bengal ή πρόβατο της Βεγγάλης), το οποίο εισήχθη στην Αυστραλία περί τα τέλη του 18<sup>ου</sup> αιώνα (Davis *et al.*, 2002). Έρευνες στα πρόβατα της φυλής Garole έδειξαν ότι οι πληθυσμοί αυτοί είναι ομοζυγωτοί για τον πολυμορφισμό αυτόν στο γονίδιο BMPP-IB. Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει πως ομοζυγωτά άτομα της φυλής Garole δίνουν δύο αμνούς στον τοκετό (Davis*et al.*, 2002). Όμως, όταν τα άτομα αυτά διασταυρωθούν με άτομα της φυλής Deccani, τα άτομα που φέρουν ένα αντίγραφο του αλληλομόρφου παρουσιάζουν αύξηση του μεγέθους της τοκετομάδας μόνο κατά 0,5 (Nimbkar*et al.*, 2002), υποστηρίζοντας έτσι την άποψη ότι η επίδραση του πολυμορφισμού μπορεί να ποικίλλει ανάλογα και με το υπόβαθρο της φυλής στην οποία αυτός εισάγεται. Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι ο πολυμορφισμός αυτός απομονώθηκε και στο πρόβατο Javanese (πρόβατο της Ιάβας) (Bradford*et al.*, 1986).

Το 2005 πραγματοποιήθηκε μια έρευνα από τους Davis*et al.*, με τη συνεργασία 13 χωρών προκειμένου να εξεταστούν 21 γόνιμες φυλές, μεταξύ αυτών και η Ελληνική φυλή Χίου, ως προς τον πολυμορφισμό Booroola. Οι φυλές οι οποίες μελετήθηκαν ήταν οι ακόλουθες: Romanow, Finn, EastFriesian, Teeswater, BluefaceLeicester, Hu, Han, D'man, Chios, Mountainsheep (τρεις τύποι), GermanWhiteheadedMutton, Lleyn, Loa, Galician, BarbadosBlackbelly (αμιγής και διασταυρωμένη), St. Croix. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός αυτός ανιχνεύθηκε μόνο στις Κινεζικές φυλές Hu και Han (Davis*et al.*, 2005).

Ο πολυμορφισμός *FecB* ασκεί σημαντική επίδραση στο δείκτη ωοθυλακιορρηξίας (Piper *et al.*, 1985). Στο γονιδιακό αυτό τόπο υπάρχουν δύο αλληλόμορφα, τα B και +. Κατά συνέπεια υπάρχουν τρεις διαφορετικοί γονότυποι, οι BB (ομοζυγωτά άτομα), B+ (ετεροζυγωτά άτομα) και ++ (άτομα αγρίου τύπου). Κάθε προσθήκη ενός αλληλομόρφου B στο γονότυπο αυξάνει το μέγεθος της ωοθυλακιορρηξίας κατά 1,65 ωοκύτταρα. Δηλαδή η επίδραση του γονιδίου στο μέγεθος της ωοθυλακιορρηξίας είναι προσθετική (ενδιάμεση κληρονομικότητα). Συνεπώς στα ομοζυγωτά άτομα το μέγεθος της ωοθυλακιορρηξίας αυξάνει κατά περίπου 3,0. Αυτές οι επιπλέον ωοθυλακιορρηξίες τυπικά αυξάνουν το μέγεθος της τοκετοομάδας κατά 1,0 και 1,5 αμνό αντίστοιχα, αν και έχει αποδειχθεί ότι η επίδραση του πολυμορφισμού αυτού στο μέγεθος της τοκετοομάδας παρουσιάζει ατελή κυριαρχία, προφανώς διότι οι γονότυποι BB με πολύ υψηλή ωοθυλακιορρηξία, παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά πρώιμης εμβρυϊκής θνησιμότητας.

### 2.4.3. Γονίδιο BMP15

#### 2.4.3.1. Πολυμορφισμοί *FecX<sup>I</sup>*, *FecX<sup>H</sup>*, *FecX<sup>G</sup>* και *FecX<sup>B</sup>*

Το γονίδιο της οστικής μορφογενετικής πρωτεΐνης 15 (BMP15) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα X του προβάτου (Galloway *et al.*, 2002; Hanrahan *et al.*, 2004). Στοιχεία από τη χαρτογράφηση του γονιδίου, ανέδειξαν 4 γενετικούς νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς κατά μήκος ολόκληρου του κωδικονίου (*FecX<sup>I</sup>*, *FecX<sup>H</sup>*, *FecX<sup>G</sup>* και *FecX<sup>B</sup>*). Πιο συχνά ανιχνεύεται ο πολυμορφισμός *FecX<sup>G</sup>* (γνωστός και ως B2), κατά τον οποίο συμβαίνει αλλαγή της κυτοσίνης (C) σε θυμίνη (T) στο νουκλεοτίδιο 718. Έτσι εισάγεται ένα πρόωρο κωδικόνιο στη θέση του γλουταμινικού οξέος στο αμινοτελικό άκρο 239 της υπό κωδικοποίησης πρωτεΐνης το οποίο οδηγεί σε πλήρη απώλεια της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης αυτής. Ο πολυμορφισμός *FecX<sup>B</sup>* (γνωστός και ως B4) επιφέρει αλλαγή της γουανίνης (G) σε θυμίνη (T) στο νουκλεοτίδιο 1100. Έτσι αλλάζει η σερίνη στο αμινοτελικό άκρο 99 της ώριμης πρωτεΐνης (ή αλλιώς στο αμινοτελικό άκρο 367 της υπό κωδικοποίησης πρωτεΐνης) σε ισολευκίνη. Τα παραπάνω αλληλόμορφα όταν βρίσκονται σε ετεροζυγωτία έχουν συνδεθεί με αύξηση του δείκτη ωοθυλακιορρηξίας και του δείκτη πολυδυμίας κατά περίπου μία μονάδα και 0,6 αντίστοιχα. Εν αντιθέσει, ομοζυγωτία οδηγεί σε μικρές ατροφικές ωοθήκες οι οποίες δεν εμφανίζουν ποτέ ωοθυλακιορρηξία με αποτέλεσμα το άτομο να χαρακτηρίζεται από στειρότητα (Galloway *et al.*, 2000; Bodin *et al.*, 2003; Hanrahan *et al.*, 2004).

Αδρανοποίηση του γονιδίου αυτού σε ποντίκια έδειξε μικρή επίδραση στην γονιμότητα τους. Παρόλα αυτά σε δύο φυλές προβάτων, την Hanna και την Inverdale, έχουν βρεθεί πολυμορφισμοί του γονιδίου αυτού, οι οποίοι πιθανότατα να φέρουν μερίδιο ευθύνης σχετικά με τις διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των τρωκτικών και των υπόλοιπων θηλαστικών. Πρόβατα, ετεροζυγωτά σε αυτούς τους πολυμορφισμούς, όπως θα αναφερθεί και ακολούθως, χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό ωοθυλακιορρηξίας, ενώ τα ομοζυγωτά χαρακτηρίζονται από αγονιμότητα.

Ο πολυμορφισμός  $FecX^I$  περιγράφηκε για πρώτη φορά σε πρόβατα της φυλής Romney και ονομάστηκε Inverdale πολυμορφισμός (Davis *et al.*, 1991; 1992). Τα στείρα θηλυκά άτομα φέρουν ατροφικές ωοθήκες οι οποίες ποτέ δεν εμφανίζουν ωοθυλακιορρηξία. Επειδή το γονίδιο BMP15 εδράζεται στο χρωμόσωμα X, τα αρσενικά απλώς είναι φορείς ενός αντιγράφου αυτού του αλληλομόρφου και το μεταβιβάζουν σε όλες τις θυγατέρες τους αλλά όχι στους αρσενικούς απογόνους τους. Τα τέσσερα διαφορετικά αλληλόμορφα του BMP15 ( $FecX^I$ ,  $FecX^H$ ,  $FecX^G$  και  $FecX^B$ ) τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα τον ίδιο φαινότυπο έχουν ανακαλυφθεί επίσης στις φυλές Romney, Belclare και Cambridge (Galloway *et al.*, 2000; Hanrahan *et al.*, 2004).

Η ανάπτυξη διαφόρων εργαστηριακών δοκιμασιών οδήγησε στην ολοένα και περισσότερο αυξανόμενη χρήση του πολυμορφισμού Inverdale στην Νέα Ζηλανδία, στην Αυστραλία και τη Σκωτία στα πλαίσια προγραμμάτων γενετικής βελτίωσης. Επειδή τα ομοζυγωτά άτομα χαρακτηρίζονται από στειρότητα πρέπει να αποφεύγεται η διασταύρωση γονέων - φορέων. Το γονίδιο αυτό προτιμάται να εισάγεται και να χρησιμοποιείται σε φάρμες εκτροφής στις οποίες οι προβατίνες διασταυρώνονται με κρεοπαραγωγούς κριούς και όλοι οι απόγονοι και των δύο φύλων σφαγιάζονται. Εάν όμως στόχος της εκτροφής αποτελεί η διατήρηση του μεγέθους της τοκετοομάδας σε επίπεδα υψηλότερα κατά περίπου 0,6 από το μέγεθος τοκετοομάδας ποιμνίων που δεν περιλαμβάνουν προβατίνες φορείς αυτού του πολυμορφισμού, πρέπει να διασταυρώνονται θηλυκά άτομα που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό με αρσενικά άτομα που είναι φορείς και να διατηρούνται στο ποίμνιο οι θυγατέρες που προκύπτουν από αυτές τις διασταυρώσεις.

Στην ίδια έρευνα που διεξήχθη το 2005 από τους Davis *et al.*, οι 21 επιλεγμένες φυλές εξετάστηκαν και ως προς τον πολυμορφισμό Inverdale. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δεν ανιχνεύθηκε σε καμία φυλή (Davis *et al.*, 2005).

Επίσης το 2008 πραγματοποιήθηκε μια έρευνα σχετικά με την ανίχνευση των αλληλομόρφων  $FecB$  και  $FecX^I$  σε δύο ελληνικές φυλές προβάτων με σημαντικές διαφορές στα αναπαραγωγικά τους χαρακτηριστικά, τις φυλές Χίου και Φλωρίνης (Michailidis *et al.*, 2008). Η φυλή Χίου θεωρείται ως η φυλή με τη μεγαλύτερη πολυδυμία στη χώρα μας, ενώ η φυλή Φλωρίνης ενώ έχει μεγάλη ανθεκτικότητα σε ασθένειες (Παππά κ.ά., 2000), ικανοποιητικούς ρυθμούς ανάπτυξης και πολύ ικανοποιητικά ποιοτικά χαρακτηριστικά σφαγίου (Christodoulou *et al.*, 2007), έχει χαμηλό συντελεστή πολυδυμίας και χαμηλή γαλακτοπαραγωγή, με αποτέλεσμα να αποτελεί μια φυλή με περιορισμένο οικονομικό ενδιαφέρον για τους κτηνοτρόφους. Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η φυλή αυτή αν εκτραφεί με στόχο την κρεοπαραγωγή μπορεί να αποφέρει σημαντικά οφέλη για τους παραγωγούς, μειώνοντας σημαντικά την ανάγκη εισαγωγής πρόβειου κρέατος (Christodoulou *et al.*, 2007).

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων έδειξαν ότι σε όλες τις προβατίνες του πειραματισμού, τόσο της φυλής Χίου όσο και της Φλωρίνης, εντοπίστηκε μόνο ο γονότυπος ++ όσον αφορά τον αλληλόμορφο  $FecB$ . Ομοίως για τον αλληλόμορφο

FecX<sup>1</sup> μόνο ο γονότυπος ++ εντοπίστηκε στις προβατίνες του πειραματισμού των δύο φυλών. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν την απουσία πολυμορφισμών στα γονίδια BMPR-IB και BMP15 στα ζώα του πειραματισμού. Συνεπώς ο υψηλότερος δείκτης πολυδυμίας που παρατηρείται στη φυλή Χίου σε σχέση με τη φυλή Φλωρίνης δεν οφείλεται στην παρουσία των αλληλομόρφων FecB και FecX<sup>1</sup>. Βεβαίως γονοτυπικές αναλύσεις σε μεγαλύτερο αριθμό ζώων και διαφορετικών εκτροφών θα βοηθήσει στην εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων.

#### 2.4.3.2. Πολυμορφισμός FecX<sup>R</sup>

Η φυλή RasaAragonesa είναι μια φυλή προβάτων της Ισπανίας. Αυτή τη στιγμή εκτρέφονται περίπου 2,5 εκατομμύρια άτομα στην ευρύτερη περιοχή της λεκάνης απορροής του ποταμού Ebro της Ισπανίας και ο μέσος όρος του μεγέθους της τοκετοομάδας για τη φυλή αυτή είναι περίπου 1,2-1,5 αμνοί / τοκετό (Sierra, 1992). Ο Διεθνής Οργανισμός Εκτροφών της φυλής RasaAragonesa (ANGRA – NationalAssociationofRasaAragonesaBreeders) σχεδιάζει ένα πρόγραμμα γενετικής βελτίωσης, έχοντας ως κύριο στόχο την αύξηση της γονιμότητας.

Έρευνα η οποία διενεργήθηκε από τους Monteagudo*et al.* (2009), σε άτομα της φυλής με ιστορικό υψηλής γονιμότητας οδήγησε στην ανακάλυψη ενός νέου πολυμορφισμού ο οποίος ονομάστηκε FecX<sup>R</sup> αφού βρέθηκε για πρώτη φορά στην φυλή RasaAragonesa. Ο πολυμορφισμός αυτός αφορά σε μια διαγραφή 17 ζευγών βάσεων από το γονίδιο BMP15. Οι ετεροζυγωτές προβατίνες παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά πολυδυμίας (2,6 αμνοί / τοκετό). Η διαγραφή των 17 αυτών ζευγών βάσεων προκαλεί μια ολοκληρωτική απώλεια λειτουργίας του δεύτερου εξονίου του BMP15. Για το λόγο αυτό οι ερευνητές υποθέτουν ότι τα ομοζυγωτά άτομα θα είναι στείρα. Αναμένεται να διεξαχθούν περαιτέρω έρευνες, τα αποτελέσματα των οποίων θα οδηγήσουν σε ασφαλέστερα συμπεράσματα.

#### 2.4.4. Γονίδιο GDF9

Βρέθηκε πως τα άτομα των φυλών Cambridge και Belclare φέρουν εκτός από τους πολυμορφισμούς στο γονίδιο BMP15 και ακόμα έναν πολυμορφισμό στο γονίδιο GDF9 (FecG<sup>H</sup>) ο οποίος προκαλεί, σε κατάσταση ετεροζυγωτίας αυξημένη ωοθυλακιορρηξία, ενώ σε καταστάσεις ομοζυγωτίας προκαλεί στειρότητα (Hanrahan*et al.*, 2004). Αντίθετα με το BMP15, το GDF9 είναι ένα αυτοσωμικό γονίδιο το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 5 (Sadighi*et al.*, 2002).

Στοιχεία από τη χαρτογράφηση του ανέδειξαν, όπως προαναφέρθηκε, 8 μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς κατά μήκος ολόκληρου του κωδικονίου (G1-G8). Από αυτούς, πιο συχνά εμφανίζονται ο πολυμορφισμός G1 (αλλαγή της αργινίνης σε ιστιδίνη στο αμινοτελικό άκρο 87 στο εξόνιο 1), ο πολυμορφισμός G4 (αλλαγή του γλουταμινικού οξέος σε λυσίνη στο αμινοτελικό άκρο 241), ο πολυμορφισμός G7 (αλλαγή της βαλίνης σε μεθειονίνη στο αμινοτελικό άκρο 371) και ο πολυμορφισμός

G8 (αλλαγή της σερίνης σε φαινυλαλανίνη στο αμινοτελικό άκρο 395). Η παρουσία ή η απουσία του κάθε ενός από αυτούς τους πολυμορφισμούς, έχει εξεταστεί σε σχέση με τη στειρότητα σε ζώα των φυλών F700-Beclare και Cambridge (Hanrahan*et al.*, 2004). Από αυτούς τους οχτώ πολυμορφισμούς που έχουν ανακαλυφθεί στο γονίδιο αυτό, μόνον ο G8 έχει βρεθεί, μέχρι στιγμής, ότι σχετίζεται με αυξημένη ωοθυλακιορρηξία ή στειρότητα. Συγκεκριμένα για τον πολυμορφισμό αυτόν, που αναφέρεται και ως FecG<sup>H</sup>, ένα αντίγραφο του αλληλομόρφου FecG<sup>H</sup> αυξάνει το ρυθμό ωοθυλακιορρηξίας κατά τουλάχιστον 1,4 στις φυλές των προβάτων στις οποίες έχει εντοπιστεί, ενώ τα ομοζυγωτά άτομα στον πολυμορφισμό αυτό, δεν παρουσιάζουν ωοθυλακιορρηξία και συνεπώς χαρακτηρίζονται από στειρότητα.

Πρόσφατες έρευνες δείχνουν πως και ο πολυμορφισμός G1 παίζει σημαντικό ρόλο στον ρυθμό ωοθυλακιορρηξίας σε συγκεκριμένες φυλές, όπως είναι οι φυλές Moghani και Ghezel στο Ιράν (Barzegari*et al.*, 2008). Οι δύο αυτές φυλές εκτρέφονται στο Βορειοδυτικό Ιράν και Βορειοδυτικά της Τουρκίας λόγω της χρησιμότητάς τους για το κρέας τους και την ποιότητα του μαλλιού τους που χρησιμοποιείται στην ταπιτουργία. Η περιοχή εκτροφής τους είναι γνωστή ως Azerbaijan στο Ιράν και χαρακτηρίζεται από ξηρή ατμόσφαιρα και χαμηλές θερμοκρασίες (Mason, 1996; NooriyanSoorog, 2000). Λόγω της υψηλής οικονομικής αξίας των δύο φυλών γίνεται αντιληπτή η ιδιαίτερη σημασία της γενετικής βάσης και ο ρυθμός ωοθυλακιορρηξίας των φυλών αυτών.

Η έρευνα που πραγματοποιήθηκε (Barzegari*et al.*, 2008) οδήγησε στα ήδη γνωστά συμπεράσματα από προηγούμενες έρευνες ότι οι πολυμορφισμοί στα γονίδια BMP15 και GDF9 έχουν ισοδύναμη επίδραση στον ρυθμό ωοθυλακιορρηξίας στα ετεροζυγωτά άτομα. Όμως για πρώτη φορά αναφέρθηκε ότι ίσως ο πολυμορφισμός FecX<sup>B</sup> στο BMP15 να μην είναι αποκλειστικά υπεύθυνος για την στειρότητα. Επίσης παρόλο που ο πολυμορφισμός G1 είναι γνωστό ότι δεν επηρεάζει τη στειρότητα, εδώ αναφέρεται για πρώτη φορά ότι είναι πιθανό να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στις δύο συγκεκριμένες φυλές. Απομένει να γίνουν περαιτέρω έρευνες προκειμένου να ξεκαθαριστεί ο ρόλος όλων των πολυμορφισμών του GDF9 και πως επηρεάζουν την στειρότητα και την ωοθυλακιορρηξία.

#### **2.4.5. Γονίδιο Woodlands (FecX2)**

Φυλοσύνδετο γονίδιο (FecX2) το οποίο ανιχνεύθηκε πρώτη φορά σε προβατίνες ποιμνίου της φυλής Coorworth το 1999 (Davis*et al.*, 2001b). Η φυλή αυτή προήλθε από την διασταύρωση προβατινών της φυλής Romney και κριών της φυλής BorderLeicesters στο Lincolncollege (μετονομαζόμενο πλέον σε LincolnUniversity) την δεκαετία του 1960 στη Νέα Ζηλανδία.



Ένα αντίγραφο αυτού του αλληλομόρφου προκαλεί αύξηση του μεγέθους της τοκετομάδας κατά 0,25 αμνούς ανά τοκετό. Το γονίδιο εδράζεται στο Χ χρωμόσωμα το οποίο συνεπάγεται ότι ο κριός το κληρονομεί από την μητέρα του ενώ οι προβατίνες το κληρονομούν και από τους δύο γονείς εφόσον είναι φορείς του γονιδίου. Παρόλα αυτά σε αντίθεση με το γονίδιο Inverdale που εδράζεται και αυτό στο χρωμόσωμα Χ, αυτό το γονίδιο εκφράζεται μόνο στις προβατίνες οι οποίες έχουν κληρονομήσει το γονίδιο από τους πατέρες τους (γονική εγχάραξη). Αναλυτικότερα όταν τα θηλυκά άτομα κληρονομούν το γονίδιο από τον πατέρα, ακολουθεί εκδήλωση της δράσης του γονιδίου με συνέπεια αυξημένη ωοθυλακιορρηξία και τελικώς αυξημένο μέγεθος τοκετομάδας. Όταν όμως τα θηλυκά άτομα κληρονομούν το γονίδιο από την μητέρα τους, η δράση του γονιδίου δεν εκδηλώνεται, οπότε και δεν παρατηρείται αύξηση του μεγέθους της τοκετομάδας. Πρέπει να συμπληρωθεί επίσης, ότι μόνο οι κριοί που κληρονομούν το γονίδιο από τις μητέρες τους, στις οποίες δεν εκδηλώθηκε το γονίδιο, δύνανται να παράγουν θυγατέρες με υψηλό ρυθμό ωοθυλακιορρηξίας. Επιπλέον ιδιαίτερη σημασία έχει το γεγονός ότι τα άτομα που φέρουν το γονίδιο Woodlands σε ομοζυγωτία, δεν χαρακτηρίζονται από στειρότητα.

#### **2.4.6. Γονίδιο Thoca**

Οι Jonmundsson και Adalsteinsson (1985) ήταν οι πρώτοι που διατύπωσαν την άποψη για την ύπαρξη ενός γονιδίου, το οποίο ευθύνεται για τα υψηλά ποσοστά γονιμότητας στο πρόβατο Icelandic (πρόβατο Ισλανδίας). Απέδειξαν ότι σχεδόν όλες οι προβατίνες με πολύδυμους τοκετούς κατάγονταν από μια προβατίνα για την οποία υπήρχαν δύο αναφορές για γέννηση τριδύμων σε περίοδο κατά την οποία ακόμα και οι δίδυμοι τοκετοί αποτελούσαν σπάνιο φαινόμενο. Πρότειναν λοιπόν, ότι αυτή η πολυδυμία, ως αποτέλεσμα αυξημένης ωοθυλακιορρηξίας, οφειλόταν σε ένα κυρίαρχο γονίδιο, το οποίο ονομάστηκε γονίδιο Thoca (FecI). Το μέγεθος της τοκετομάδας στις δυνητικά ετεροζυγωτές προβατίνες ήταν κατά 0,64 υψηλότερο από τις δυνητικά μη φορείς του γονιδίου. Στειρότητα επίσης αναφέρθηκε όταν δυνητικά ετεροζυγωτοί κριοί διασταυρώνονταν με δυνητικά ετεροζυγωτές προβατίνες (Jonmundsson και Adalsteinsson, 1985).

Τα αποτελέσματα μελετών, που βασίστηκαν σε στοιχεία των τελευταίων 14 ετών, σχετικά με το μέγεθος της τοκετομάδας σε ένα ποίμνιο Thoca της Μεγ. Βρετανίας (Wallingetal., 2002), απέδειξαν ότι υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για την ύπαρξη ενός κυρίαρχου γονιδίου, το οποίο αυξάνει το μέγεθος της τοκετομάδας κατά 0,7 αμνούς ανά τοκετό και έρχονται σε πλήρη συμφωνία με την άποψη που διατύπωσαν οι Jonmundsson και Adalsteinsson το 1985, καθώς και ο Rhind και οι συνεργάτες του (2000). Το ποίμνιο αυτό είχε δημιουργηθεί το 1985 με διασταυρώσεις του Ισλανδικού προβάτου Thoca με πρόβατα της φυλής Cheviots (Russeletal., 1997). Η θέση στην οποία εδράζεται το γονίδιο αυτό δεν έχει γίνει ακόμη γνωστή. Με διάφορες δοκιμές αποδείχθηκε ότι ούτε ο αυτοσωμικός πολυμορφισμός Booroola στο γονίδιο BMPR-IB, αλλά ούτε και ο φυλοσύνδετος πολυμορφισμός Inverdale στο γονίδιο BMP15 ήταν παρόντες (Davisetal., 2002), γεγονός το οποίο δεν αφήνει

αμφιβολίες σχετικά με την ύπαρξη του γονιδίου Thoca, αλλά και την επίδραση που έχει στην ωοθυλακιορρηξία και κατ' επέκταση στο μέγεθος της τοκετοομάδας.

#### **2.4.7. Γονίδιο Lacaune**

Στοιχεία από μελέτες που έγιναν στην Γαλλία το 1998 για το πρόβατο της γαλλικής φυλής Lacaune αποκάλυψαν την ύπαρξη μεμονωμένων ατόμων, με μεγαλύτερο μέγεθος τοκετοομάδας. Αυτό το χαρακτηριστικό, συνδυαζόμενο με την υψηλή επαναληψιμότητά του, πιθανώς να οφείλεται στην ύπαρξη κάποιου γονιδίου (Bodinetal., 1998).

Έρευνες που ακολούθησαν απέδειξαν την παρουσία ενός αυτοσωμικού γονιδίου με έναν αλληλόμορφο που αυξάνει τον ρυθμό ωοθυλακιορρηξίας κατά περίπου 1,0 (Lecerfetal., 2002). Το γονίδιο αυτό ονομάστηκε γονίδιο Lacaune και βρέθηκε ότι εδράζεται στο χρωμόσωμα 11 (Lecerfetal., 2002).

Μία σύγκριση μεταξύ των ετεροζυγωτών και ομοζυγωτών προβατίνων έδειξε ότι η επίδραση του γονιδίου είναι αθροιστική για τον ρυθμό ωοθυλακιορρηξίας όπως συμβαίνει και με τον πολυμορφισμό Booroola (Bodinetal., 2002). Όμως προκειμένου να αποκλεισθεί η πιθανότητα η αύξηση στο μέγεθος της τοκετοομάδας να οφείλεται στον πολυμορφισμό Booroola, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές, τα αποτελέσματα των οποίων έδειξαν ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δεν είναι παρών σε πρόβατα της φυλής Lacaune (Davisetal., 2002).

#### **2.4.8. Γονίδιο Olkuska**

Σε ένα γόνιμο ποίμνιο του Πολωνικού προβάτου Olkuska, οι Martyniuk και Radomsa (1991) αντιστοίχισαν το γονότυπο των προβατίνων με στοιχεία που είχαν για το ρυθμό ωοθυλακιορρηξίας, προκειμένου να αποδείξουν την ύπαρξη ενός κυρίαρχου γονιδίου. Τα κριτήρια που χρησιμοποίησαν ήταν για τις ετεροζυγωτές προβατίνες τουλάχιστον μια αναφορά για ωοθυλακιορρηξία μεγαλύτερη είτε ίση του 3, ενώ για τις ομοζυγωτές, τουλάχιστον μια αναφορά για ωοθυλακιορρηξία μεγαλύτερη είτε ίση του 5. Εκτίμησαν ότι η επίδραση ενός αντιγράφου του αλληλομόρφου ήταν περίπου ένα επιπλέον ωάριο σε κάθε ωοθυλακιορρηξία. Διάφορα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι ούτε ο πολυμορφισμός BooroolaBMPR-IB, αλλά ούτε και ο πολυμορφισμός Inverdale του γονιδίου BMP15 υπήρχαν στα πρόβατα αυτά (Davisetal., 2002).

Η φυλή Olksuska είναι μία φυλή που απειλείται με εξαφάνιση (το 2000 υπήρχαν μόλις 58 καταγεγραμμένες προβατίνες σε πέντε ποίμνια) (Scherf, 2000). Η πρόοδος προς την έρευνα για αυτή τη γόνιμη φυλή είναι αργή λόγω του μικρού της πληθυσμού, αλλά και λόγω του πολύ μικρού μεγέθους των ποιμνίων στα οποία διατηρείται.

#### **2.4.9. Γονίδιο Belle-Be**

Στη γαλλική φυλή προβάτων Belle-Be έχουν αναφερθεί περιστατικά με ωοθυλακιορρηξία που φτάνει μέσο όρο 2,5 και μεγέθη τοκετοομάδας μέσου όρου 2,2 (Malher και LeChere, 1998). Αυτά τα μεγέθη σε συνδυασμό με την υψηλή επαναληπτικότητα του αυξημένου ρυθμού ωοθυλακιορρηξίας οδήγησαν τους Malher και LeChere το 1998 να υποθέσουν την ύπαρξη ενός κυρίαρχου γονιδίου, υπεύθυνου για αυτά τα αυξημένα ποσοστά γονιμότητας. Ο τρόπος με τον οποίο το γονίδιο μεταβιβάζεται στους απογόνους ακολουθεί το μενδελιανό μοντέλο κληρονομικότητας.

Δυστυχώς, όπως και η φυλή Oikuska, έτσι και αυτή η φυλή απειλείται με εξαφάνιση, εκτρέφεται σε πολύ μικρά ποίμνια και έτσι δεν έχει σταθεί δυνατό να εκτιμηθεί το μέγεθος της επίδρασης στην ωοθυλακιορρηξία ή να επιβεβαιωθεί ο τρόπος με τον οποίο το γονίδιο κληρονομείται.

#### **2.4.10. NewZealandLongwoolbreeds**

Υπάρχουν ενδείξεις για κυρίαρχα γονίδια σε τέσσερα πολύ γόνιμα ποίμνια της Νέας Ζηλανδίας των φυλών Romney, Perendale και BorderLeicesterxRomney (Davis et al., 2003). Με διάφορες δοκιμές βρέθηκε ότι ο πολυμορφισμός BooroolaBMPR-IB στα ποίμνια αυτά δεν ήταν παρών. Μόνο σε ένα ποίμνιο (BorderLeicesterxRomney) βρέθηκε ο πολυμορφισμός Inverdale στο γονίδιο BMP15, αλλά η παρουσία του δεν εξηγεί την υψηλή γονιμότητα του ποιμνίου. Από τα γενεαλογικά βιβλία επίσης δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι υπάρχει το γονίδιο Woodlands (FecX2) σε αυτά τα ποίμνια. Μεμονωμένοι κριοί έδωσαν θυγατέρες των οποίων ο μέσος όρος της ωοθυλακιορρηξίας άγγιζε και το 3,2. Διεξάγεται μία σειρά ερευνών προκειμένου να βρεθεί η γενετική βάση της εξαιρετικής γονιμότητας αυτών των ποιμνίων.

**Πίνακας 2.3.6.2.1. Γνωστοί πολυμορφισμοί, γονίδια και γονιμότητα στο πρόβατο. Μ.Τ.: Μέγεθος Τοκετομάδας και Δ.Ω.: Δείκτης Ωοθυλακιωρρηξίας**

Γονίδιο	Όνομα Πολυμορφισμού	Συμβολισμός αλληλομόρφου	Χρωμόσωμα	Επίδραση στον Δ.Ω. και στο Μ.Τ.	Φυλή στην οποία βρέθηκε
BMPR-IB	Booroola	FecB <sup>B</sup>	6	B+: Δ.Ω.:+1.5, Μ.Τ.:+1.0 BB: Δ.Ω.:+3.0, Μ.Τ.:+1.5	Merino, Garole, Javanese
BMP15	Inverdale	FecX <sup>I</sup>	X	I+: Δ.Ω.:+1.0 Μ.Τ.:+0.6 II: Στείρο	Romney
BMP15	Hanna	FecX <sup>H</sup>	X	H+: Δ.Ω.:+1.0, Μ.Τ.:+0.6 HH: Στείρο	Romney
BMP15	Belclare	FecX <sup>B</sup>	X	B+: Δ.Ω.:+1.0 BB: Στείρο	Belclare
BMP15	Galway	FecX <sup>G</sup>	X	G+: Δ.Ω.:+0.7 GG: Στείρο	Belclare, Cambridge
BMP15	-	-	X	Όχι ξεκαθαρισμένος φαινότυπος	Lacaune
GDF9	High Fertility	FecG <sup>H</sup>	5	H+: Δ.Ω.:+1.4 HH: Στείρο	Belclare, Cambridge
-	Woodlands	FecX2 <sup>W</sup>	X	W+: Δ.Ω.:+0.4, Μ.Τ.:+0.25 WW: Δ.Ω.&Μ.Τ. ≥ W+	Coopworth
-	Lacaune	FecL <sup>L</sup>	11	L+: Δ.Ω.:+1.0 LL: Δ.Ω.:+2.0	Lacaune
-	Thoca	FecI <sup>I</sup>	-	I+: Δ.Ω.:+1.2, Μ.Τ.:+0.7 II: Ενδείξεις στειρότητας	Icelandic
-	-	-	-	Δυνητικά ετεροζυγωτά άτομα: Δ.Ω.:+1.0, Μ.Τ.:+0,6	Olkuska
-	-	-	-	Υψηλή παραλλακτικότητα στον Δ.Ω. (1-8) και στο Μ.Τ. (1-7) και υψηλή επαναληπτικότητα του Δ.Ω. (0.8)	Belle-Ile

## 2.5. Γονίδια GDF9 και BMP15 και ο τρόπος με τον οποίο επιδρούν στα διάφορα στάδια της ωοθηκικής λειτουργίας

Οι κύριες λειτουργίες της ωοθήκης είναι η παραγωγή ωοκυττάρων και η έκκριση στεροειδών ορμονών που είναι υπεύθυνες για τη γονιμότητα και την πρόκληση της εγκυμοσύνης. Τα ωοθυλάκια αποτελούν τις λειτουργικές μονάδες της ωοθήκης και αποτελούνται από ένα ωοκύτταρο το οποίο περιβάλλεται από ένα ή περισσότερα στρώματα σωματικών κυττάρων. Προκειμένου τα ωοθυλάκια να εκπτύξουν όλο τους το δυναμικό όσον αφορά την έκκριση στεροειδών και την ωορρηκτική τους δράση, πρέπει να περάσουν από μια παρατεταμένη και άκρως συντονισμένη σειρά σταδίων ανάπτυξης.

Η ωοθήκη στο έμβρυο περιλαμβάνει αρκετά εκατομμύρια αρχέγονα ωοθυλάκια, τα οποία αποτελούνται από ένα ωοκύτταρο που περιβάλλεται από ένα μονό στρώμα πεπλατυσμένων προ-κοκκωδών κυττάρων. Η πλειοψηφία αυτών των ωοθυλακίων διαρρηγνύεται κατά την εμβρυική ζωή του ατόμου, όταν ακόμα βρίσκονται σε ηρεμία και δεν εμπλέκονται στο πολύπλοκο μονοπάτι της ανάπτυξης το οποίο θα τερματιστεί με ή χωρίς την ωοθυλακιωρρηξία. Από αυτά τα αρχέγονα ωοθυλάκια που επιβιώνουν και ανήκουν πλέον στον πληθυσμό των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων πολύ λίγα (<0,1%) είναι προορισμένα να δώσουν ωάριο. Η πλειοψηφία τους θα υποστεί ατρησία κατά την διάρκεια αυτής της μακράς διαδικασίας ανάπτυξης.

Η εξέλιξη μέσω των σταδίων της ωοθυλακικής ανάπτυξης προϋποθέτει αμφίδρομη επικοινωνία μεταξύ του ωοκυττάρου και των κοκκωδών κυττάρων, αλλά και μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων και των κυττάρων θήκης (Eppig, 2001). Πολλά από τα κύτταρα που μεταφέρουν αυτά τα εξωκυτταρικά ερεθίσματα ανήκουν στην υπεροικογένεια των αυξητικών μεταμορφωτικών παραγόντων – β (TGF-β).

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε πολλά είδη ενισχύουν την άποψη ότι ένας αριθμός συνδετικών μορίων, συνδετικών πρωτεϊνών (bindingproteins) και υποδοχέων, που σχετίζονται με την υπεροικογένεια TGF-β, εκφράζονται από τα ωοκύτταρα και τα σωματικά κύτταρα της ωοθήκης, με ένα τρόπο που επηρεάζει την ανάπτυξη της (Shimasaki et al., 1999; Drummond et al., 2003; Erickson and Shimasaki, 2003; Bristol and Woodruff, 2004; McNatty et al., 2005). Ο ολόκληρος και αυξανόμενος αριθμός μελετών αποδεικνύει τον ρόλο κλειδί που κατέχουν αυτά τα συνδετικά μόρια, οι συνδετικές πρωτεΐνες και οι υποδοχείς, στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων, συμπεριλαμβανομένης της επιλογής του αρχέγονου ωοθυλακίου, τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων και των κυττάρων θήκης, τη στεροειδογένεση, την έκφραση των υποδοχέων των γοναδοτρόπων ορμονών, την ωρίμαση του ωοκυττάρου, την ωοθυλακιορρηξία και τέλος, το σχηματισμό του ωχρού σωματίου.

Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια GDF9, BMP15, και BMP6, οι οποίες αποτελούν και οι τρεις μέλη της υπεροικογένειας TGF-β, έχουν βρεθεί ότι εκφράζονται στα ωοκύτταρα από τα πρώτα στάδια του ωοθυλακίου. Συγκεκριμένα στα τρωκτικά βρέθηκε ότι εκφράζονται στα πρωτογενή ωοθυλάκια, ενώ στις αγελάδες και στα πρόβατα στα αρχέγονα ωοθυλάκια (McGrath et al., 1995; Jaatinen et al., 1999; Bodensteiner et al., 1999; Elvin et al., 2000; McNatty et al., 2001).

Σε επίπεδο DNA και αλληλουχίας πρωτεϊνών, οι GDF9 και BMP15 παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ομολογία μεταξύ τους, συγκριτικά με όλα τα μέλη της υπεροικογένειας στην οποία ανήκουν και γι' αυτό σχηματίζουν μια υποομάδα (Dube et al., 1998). Και οι δύο έχουν έναν αριθμό κυστεϊνών (η GDF9 έχει 6, η BMP15 έχει 6 στον άνθρωπο και 8 στον επίμυ) στην ώριμη περιοχή αντίθετα από τα υπόλοιπα μέλη της υπεροικογένειας. Η ομολογία της GDF9 μεταξύ ανθρώπου και επίμυος φτάνει το 96%, ενώ για την BMP15 το αντίστοιχο ποσοστό είναι 76%. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε πως η GDF9 του προβάτου και των βοοειδών είναι ακριβώς ίδια. Η GDF9 του προβάτου είναι ομόλογη κατά 77% με του ανθρώπου και κατά 66% με του επίμυος (Bodensteiner et al., 1999). Στο καρβοξυτελικό άκρο του πεπτιδίου οι GDF9 και BMP15 είναι ταυτόσημες κατά 52,9%.

Η BMP6, που σχετίζεται περισσότερο με την BMP15, είναι απαραίτητη για την δημιουργία συγκεκριμένων σκελετικών δομών. Η BMP6 ταυτίζεται σε ποσοστό μόνο 28,4% και 37,3% με την καρβοξυτελική περιοχή της GDF9 και της BMP15 αντίστοιχα.

Οι τύπου I και τύπου II υποδοχέων, μέσω των οποίων τα συνδετικά μόρια μεταφέρουν ερεθίσματα εκφράζονται στα προκοκκώδη και κοκκώδη κύτταρα κατά τα αντίστοιχα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του ωοθυλακίου, καθιστώντας αυτά τα κύτταρα δυναμικούς στόχους για παρακρινικά ερεθίσματα. Επίμυες με

αδρανοποιημένο το GDF9 γονίδιο είναι στείρο γεγονός το οποίο δείχνει ότι η ωοθυλακιογένεση σταματά σε πρώιμα στάδια (Dongetal., 1996; Carabatsosetal., 1998), συνεπώς υποδηλώνεται ότι η προερχόμενη από το ωοκύτταρο GDF9 είναι απαραίτητη για την περαιτέρω ανάπτυξη του ωοθυλακίου. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται και από το γεγονός ότι η χορήγηση GDF9 in vivo (Vitt et al., 2000b) ή invitro (NilssonandSkinner, 2002) ενισχύει στην επίτευξη την ανάπτυξη του ωοθυλακίου από τα πρώιμα στάδια προς την ωρίμαση του. Παρόλα αυτά οι απόψεις δίστανται για το αν η GDF9 επηρεάζει την μετάβαση του αρχέγονου ωοθυλακίου στο στάδιο του πρωτογενούς. Η μελέτη των Vittetal. (2000b) υποστήριξε αυτήν την άποψη δείχνοντας ότι η GDF9 επάγει τη μείωση των αρχέγονων ωοθυλακίων, ενώ στην μελέτη των Nilsson και Skinner (2002) δεν βρέθηκε κανένα στοιχείο που να υποδεικνύει ότι η GDF9 αυξάνει την μετάβαση των αρχέγονων ωοθυλακίων στο στάδιο του πρωτογενούς.

Τα ωοθυλάκια των οποίων η ανάπτυξη σταμάτησε λόγω αδρανοποίησης του γονιδίου GDF9 σε επίμυες, είχαν μη φυσιολογικά κοκκώδη κύτταρα και αποτύγχαναν να αποκτήσουν κύτταρα θήκης, αποδεικνύοντας έτσι ότι ηGDF9 ασκεί παρακρινική δράση στα περιβάλλοντα σωματικά κύτταρα (Dongetal., 1996; Carabatsosetal., 1998; Elvinal., 1999). Η ανάπτυξη του ωοκυττάρου και η δημιουργία της διαφανούς ζώνης προχωρά κανονικά αλλά, άλλες πτυχές της διαδικασίας διαφοροποίησης του ωοκυττάρου εμποδίζονται και αυτοί οι επίμυες παραμένουν στείροι. Αντίθετα με το γονίδιο GDF9, πολυμορφισμοί στα γονίδια BMP15 και BMP6 έχουν μικρότερη επίδραση στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων και τη στείριότητα (Sollowayetal., 1998; Yanetal., 2001). Παρόλα αυτά ο ρόλος του BMP15 εξαρτάται από το είδος του ζώου καθώς φυσικοί πολυμορφισμοί είτε στο γονίδιο GDF9 είτε στο BMP15 επηρεάζουν εις βάθος τη γονιμότητα στο πρόβατο όπως προαναφέρθηκε ήδη επανειλημμένα (Gallowayetal., 2002; McNattyetal., 2005). Αυτοί οι πολυμορφισμοί πιθανόν να έχουν ως αποτέλεσμα την πτώση της παραγωγής της πρωτεΐνης ή διαταράσσουν τη δέσμευσή της από τους υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων. Προβατίνες ετεροζυγώτες για κάθε έναν από αυτούς τους πολυμορφισμούς παρουσιάζουν αυξημένο ρυθμό ωοθυλακιορρηξίας, ενώ οι ομοζυγώτες είναι στείρες. Επιπλέον οι ωοθήκες των ομοζυγωτών ζώων παρουσιάζουν την ίδια εικόνα με αυτήν που παρατηρεί κανείς σε προβατίνες στις οποίες έχει γίνει αδρανοποίηση του γονιδίου του BMP15 και του GDF9, με τα ωοθυλάκια να αδυνατούν να αναπτυχθούν πέρα από το στάδιο του πρωτογενούς ωοθυλακίου (Juengeletal., 2002; McNattyetal., 2005). Αυτός ο φαινότυπος παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με τον φαινότυπο επίμυων στους οποίους έχει πραγματοποιηθεί αφαίρεση του GDF9 (Carabatsosetal., 1998). Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η GDF9 αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα TGF-βRI (υποδοχέας ακτιβίνης όμοιος με κινάση 5 / activinlikekinase 5 / ALK5) αλλά και μέσω του υποδοχέα της οστικής μορφογενετικής πρωτεΐνης II (BMPRII) στην επιφάνεια των κυττάρων - στόχων, ενώ η BMP15 ασκεί την επίδραση της μέσω δύο τύπων διαμεμβρανικών υποδοχέων, των BMPRI (ALK6) και των BMPRII. Έκφραση αυτών των δύο τύπων υποδοχέων έχει επιβεβαιωθεί στα κοκκώδη κύτταρα από το αρχέγονο / πρωτογενές στάδιο και μετά ως ανταπόκριση σε αυτά τα συνδετικά μόρια (JuengelandMcNatty,

2005). Επομένως αυτό το στοιχείο υποδεικνύει ότι η δράση της GDF9 που προέρχεται από το ωοκύτταρο (στα τρωκτικά) ή και η δράση της GDF9 μαζί με τη δράση της BMP15 (στο πρόβατο) είναι απαραίτητες στα σωματικά κύτταρα του ωοθυλακίου (προκοκκώδη και/ή κοκκώδη) του αρχέγονου / πρωτογενούς ωοθυλακίου, προκειμένου να είναι δυνατή η συνέχιση της περαιτέρω ανάπτυξης του ωοθυλακίου.

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η GDF9 και η BMP15 προωθεί την ανάπτυξη του ωοθυλακίου δεν έχει καταστεί σαφής έως σήμερα. Ασφαλέστερα συμπεράσματα αναμένονται να διεξαχθούν από έναν μεγάλο αριθμό ερευνών που βρίσκονται υπό εξέλιξη και αφορούν στο συγκεκριμένο θέμα.

Η ανάπτυξη των πρωτογενών ωοθυλακίων στα τελευταία στάδια κατά τα οποία συμβαίνει και ο σχηματισμός του άντρου, περιλαμβάνει την αύξηση του μεγέθους του ωοκυττάρου, το σχηματισμό της διαφανούς ζώνης, τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων, έτσι ώστε να σχηματίσουν πολύστιβο επιθήλιο, το σχηματισμό του βασικού υμένα, τη συμπύκνωση των κυττάρων του στρώματος γύρω από τον βασικό υμένα, έτσι ώστε να σχηματιστούν τα κύτταρα θήκης και οι κενοί χώροι, την πλήρωση τους με υγρό και την συνένωση των χώρων αυτών προς σχηματισμό του άντρου.

Στο πρόβατο απαιτούνται περίπου 40 ημέρες για την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, αρχικής διαμέτρου 0,20 έως 0,25 mm, έως το προωθυλακιόρρηκτικό στάδιο. Κατά το διάστημα αυτό η κυτταρική ανάπτυξη είναι έντονη. Το πρωτογενές ωοθυλάκιο έχει λίγες δεκάδες κοκκωδών κυττάρων τα οποία πριν την ωοθυλακιόρρηξια, έχουν υπερβεί τα 5 εκατομμύρια (Ρογδάκης, 2004).

Στο πρόβατο η τελική ανάπτυξη των ωοθυλακίων λαμβάνει χώρα με τη μορφή κυμάτων. Ο αριθμός των ωοθυλακικών κυμάτων κατά τον ωοθηκικό κύκλο κυμαίνεται από δύο έως τέσσερα (Evans, 2003). Των κυμάτων αυτών προηγούνται κύματα έκκρισης της FSH, γεγονός που δηλώνει την υποστηρικτική δράση της ορμόνης στην έναρξη των κυμάτων ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Ο κλασικός ενδοκρινικός έλεγχος της ωοθηκικής λειτουργίας μέσω των γοναδοτρόπων ορμονών FSH και LH αποτελεί ένα μόνο μέρος ενός πολύπλοκου συστήματος, το οποίο αλληλεπιδρά με άλλα συστήματα μεταξύ των κυττάρων αλλά και μεταξύ κυττάρων διαφορετικών τύπων στην ωοθήκη (Baird and Cambell, 1998; McNatty *et al.*, 1999).

Invitro έκθεση ιστού ωοθήκης τρωκτικών (Hayashi *et al.*, 1999; Nilsson and Skinner, 2002, 2003; Wang and Roy, 2004) και ανθρώπων (Hreinsson *et al.*, 2002) στο προϊόν του γονιδίου GDF9 έχει δείξει ότι προωθεί την ανάπτυξη των πρωτογενών ωοθυλακίων. Αντίστροφα, η ανάπτυξη των ωοθυλακίων πέρα από το στάδιο του πρωτογενούς δεν εμφανίζεται τόσο σε επίμυες στους οποίους έχει αφαιρεθεί το γονίδιο GDF9 (Dongetal., 1996), όσο και σε προβατίνες ομοζυγώτες για φυσικούς πολυμορφισμούς στο γονίδιο GDF9 (Hanrahan *et al.*, 2004) ή σε προβατίνες ανοσοποιημένες έναντι του GDF9 (Juenge *et al.*, 2002), ενισχύοντας έτσι την άποψη ότι ο ρόλος της GDF9 που παράγεται από τα ωοκύτταρα είναι απαραίτητος. Επιπλέον και η παραγόμενη από το ωοκύτταρο BMP15 έχει βρεθεί ότι ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό

των αδιαφοροποιήτων κοκκωδών κυττάρων με τρόπο ανεξάρτητο από την FSH (Otsukaetal., 2000). Παρόλα αυτά επίμνες χωρίς πολυμορφισμούς στο γονίδιο BMP15 παρουσιάζουν μειωμένη γονιμότητα (Yanetal., 2001). Αντίθετα προβατίνες ομοζυγωτές για αδρανοποιημένο BMP15 πολυμορφισμό είναι στειρές, με την ανάπτυξη των ωοθυλακίων να σταματά στο αρχέγονο στάδιο (Juengeletal., 2002; Hanrahanetal., 2004).

Η εξέλιξη του ωοθυλακίου μέσω του σταδίου σχηματισμού του άντρου συνοδεύεται από συνεχή πολλαπλασιασμό των κυττάρων θήκης και των κοκκωδών κυττάρων, από αύξηση του μεγέθους του ωοκυττάρου, τόσο στη διάμετρό του όσο και στον όγκο.

Η έκφραση των BMPs και των GDF9 στα ώριμα ωοθυλάκια έχει εξακριβωθεί σε πολλά είδη ζώων όπως προαναφέρθηκε (Elvinetal., 2000; EricksonandShimasaki, 2003; Glisteretal., 2004; Shimasakietal., 2004, JuengelandMcNatty, 2005). Εν συντομία η BMP-6, η BMP15, και η GDF9 εκφράζονται στο ωοκύτταρο, η BMP-2, η BMP-5, η BMP-6 στα κοκκώδη κύτταρα, η BMP-2, η BMP-3b, η BMP-4 και η BMP-7 στα κύτταρα θήκης. Παλαιότερα είχε διατυπωθεί η άποψη ότι μεταξύ των ώριμων ωοθυλακίων, το ωοκύτταρο συνεχίζει να επηρεάζει την συμπεριφορά των κοκκωδών κυττάρων που το περιβάλλουν μέσω της παραγωγής συγκεκριμένων παραγόντων που εκκρίνονται σε αυτό και επηρεάζουν το μικροπεριβάλλον γύρω του (Eppig, 2001; Gilchristetal., 2004). Η BMP15 και η GDF9 που παράγονται αποκλειστικά στο ωοκύτταρο μαζί με την BMP-6 αποτελούν ιδανικούς υποψήφιους για αυτόν τον ρόλο. Η έκφραση των BMP υποδοχέων στο ωοκύτταρο (Souzaetal., 2002; EricksonandShimasaki, 2003; Glisteretal., 2004) προτείνουν και έναν περαιτέρω ρόλο των BMPs διαφοροποιώντας την ανάπτυξη και την ωρίμαση του. Παρόλα αυτά σε έρευνα των Fatehietal. (2005) βρέθηκε ότι η εξωγενής χορήγηση BMP-2 και BMP-4 σε βοοειδή δεν έδειξε καμία ανταπόκριση των ωοκυττάρων. Η ικανότητα των BMPs (BMP15, GDF9, BMP-6) να επηρεάζουν την ανάπτυξη του ωοκυττάρου είναι αναμφισβήτητη σε αυτό το στάδιο.

Μελέτες σε πρόβατα έδειξαν ότι η BMP15 είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του ωοθυλακίου στο ωοθυλακιόρρηκτικό στάδιο (Juengeletal., 2002). Τόσο η BMP-6 όσο και η BMP15 έχει δειχθεί ότι μετριάζουν τη δράση της FSH στους επίμνες. Η BMP15 είναι πιθανό να δρα με μείωση της ευαισθησίας των υποδοχέων της FSH (Otsukaetal., 2000) ενώ η BMP-6 μάλλον δρα μειώνοντας την ενεργότητα της αδενυλοκυκλάσης (Otsukaetal., 2001). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η δραματική μείωση του mRNA της BMP-6 στο στάδιο της επιλογής του κυρίαρχου ωοθυλακίου (EricksonandShimasaki, 2003). Οι ίδιοι ερευνητές πρότειναν ότι η BMP-6 μπορεί να καταστέλλει τη δράση της FSH, και η απουσία της σε αυτό το στάδιο μπορεί να είναι απαραίτητη προκειμένου να συνεχιστεί η ανάπτυξη του ωοθυλακίου μέσω της δράσης της FSH. Επίσης πρότειναν ότι η ίδια η FSH είναι ίσως υπεύθυνη για την μείωση της BMP-6.

Ομοίως και η GDF9 ασκεί την επίδρασή της μέσω της ρύθμισης της δράσης των γοναδοτροπινών. Οι Vittetal. (2000a) έδειξαν ότι η GDF9 μπορούσε να αναστέλλει



την ελεγχόμενη από την FSH παραγωγή προγεστερόνης και οιστραδιόλης και να μετριάξει τον σχηματισμό των υποδοχέων της LH. Πραγματικά η BMP-6, η BMP15 και η GDF9 αναστέλλουν την έκκριση της προγεστερόνης που ελέγχεται από τις γοναδοτροπίνες (Otsukaetal., 2001a, b), αλλά μόνο η GDF9 έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την ενεργότητα της P450 αρωματάσης (Vittetal., 2000a; Yamamotoetal., 2002). Τελευταία οι McNattyetal. (2005) μελέτησαν την επίδραση αυτών των παραγόντων στα μηρυκαστικά (πρόβατο, αγελάδα). Συνολικά η GDF9 και η BMP15 σε συνδυασμό ή ξεχωριστά αναστέλλουν την εκ τηςFSH ρυθμιζόμενη παραγωγή προγεστερόνης και ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Η BMP-2 έχει βρεθεί ότι προωθεί την έκκριση της οιστραδιόλης και της ανασταλτίνης από τα κοκκώδη κύτταρα του προβάτουin vitro (Souzaetal., 2002). Η BMP-6 που επίσης εκκρίνεται από το ωοκύτταρο ανέστειλε την παραγωγή της ελεγχόμενης από την FSH προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα του επίμυος αλλά δεν είχε καμία επίδραση στην έκφραση της P450 αρωματάσης ή στην έκκριση της οιστραδιόλης (Otsukaetal., 2001b). Στα κοκκώδη κύτταρα των βοοειδών η BMP-6 ενισχύει την οιστραδιόλη, την ανασταλτίνη Α, την ακτιβίνη Α και τη φολιστατίνη, τον σχηματισμό των κυττάρων αναστέλλοντας την έκκριση της προγεστερόνης (Glisteretal., 2004). Η BMP-2 στο χοίρο (Brankinetal., 2005a) και η BMP-5 στον επίμυ (Pierreetal., 2005) έχει αναφερθεί ότι μειώνουν την παραγωγή της προγεστερόνης που ελέγχεται από την FSH. Φαίνεται ότι η BMP-2, η BMP-5 και η BMP-6 δρουν στα κοκκώδη κύτταρα και ενισχύουν την βιωσιμότητα του ωοθυλακίου, διατηρώντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και αποτρέποντας την πρόωμη ωχρινοποίηση και/ή την ατρησία, σε συνεργασία με τις παραγόμενες από το ωοκύτταρο GDF9 και BMP15.

Με παρόμοιο τρόπο δράσης οι παραγόμενες από τα κύτταρα θήκης BMP-4 και BMP-7 έχουν την δυνατότητα να δρουν ως παρακρινικοί ρυθμιστές της λειτουργίας των κοκκωδών κυττάρων με διαφορετικό τρόπο όμως μεταξύ των διαφόρων ειδών.

Ιδιαίτερη μνεία πρέπει να γίνει στις πρωτεΐνες που δεσμεύουν τις BMPs (φολιστατίνη, noggin, chordin, gremlin, BAMBI), ένας μεγάλος αριθμός εκ των οποίων έχει ταυτοποιηθεί και έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στο μοντέλο δράσης των BMP. Εν συντομία να αναφερθεί ότι η φολιστατίνη δεσμεύει τις BMP-4, BMP-6 και BMP-7 και παρεμποδίζει τη δράση τους στα κοκκώδη κύτταρα των βοοειδών (Glisteretal., 2004), αλλά όχι και στα κύτταρα θήκης (Glisteretal., 2005). Η φολιστατίνη μπορεί επίσης να παρεμποδίζει την ανασταλτική δράση της BMP15 στην έκφραση των υποδοχέων της FSH (Otsukaetal., 2001a,b).. Η noggin εξουδετερώνει τη δράση της BMP-2 και της BMP-4 στα κοκκώδη κύτταρα του προβάτου (Pierreetal., 2005). Ηgremlin αναστέλλει το ερέθισμα της BMP-4 στα κοκκώδη κύτταρα του επίμυος (Pangasetal., 2004). Δεδομένης της ευρείας κατανομής αυτών των συνδετικών πρωτεϊνών και της δραστηριότητάς τους, αυτές οι πρωτεΐνες αντιπροσωπεύουν ένα ξεχωριστό σημαντικό σύστημα στον ενδοκυτταρικό έλεγχο του συστήματος BMP/GDF.

Όσον αφορά στο στάδιο της ωοθυλακιορρηξίας, πρόσφατη έρευνα του τρόπου έκφρασης των BMPσυνδετικών μορίων και των υποδοχέων κατά τη διάρκεια της

ωοθυλακιογένεσης στον επίμυ (EricksonandShimasaki, 2003) έδειξε ότι η ωοθυλακική έκφραση των BMP-2, BMP-3b, BMP-4, BMP-6, BMP-7 είναι σημαντικά μειωμένη κατά την ωοθυλακιορρηξία. Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει το γεγονός ότι το mRNA τόσο της BMP-2 όσο και της BMP-IB μειώνεται γρήγορα κατά την ωοθυλακιορρηξία ενώ αυτά τα γονίδια εκφράζονται λίγο έως καθόλου μέχρι την ωχρινόλυση όποτε τόσο το συνδετικό μόριο όσο και οι υποδοχείς εκφράζονται ξανά. Η σχέση μεταξύ του BMP-IB και της λειτουργίας του ωχρού σωματίου ενισχύεται από την παρατήρηση ότι η διάρκεια ζωής του ωχρού σωματίου παρατείνεται στα BMP-IBnull ποντίκια (Yi *et al.*, 2001). Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός μηχανισμού κατά τον οποίο η επιλεκτική έκφραση συγκεκριμένων μελών του συστήματος BMP μαζί με το ωχρό σωματίο μάλλον δρουν συνεργικά για να ρυθμίζουν την ωχρινοποίηση αλλά και την ωχρινόλυση.

## 2.6. Τρόπος δράσης των πολυμορφισμών

Το γονίδιο BMP15 αναφέρεται ως απαραίτητο για τη φυσιολογική ωοθυλακική αύξηση και την ωοθυλακιορρηξία τόσο στο πρόβατο όσο και στον άνθρωπο (Galloway *et al.*, 2000; Juengel *et al.*, 2002; DiPasquale *et al.*, 2004; Hanrahan *et al.*, 2004), ενώ μύες με έλλειψη του γονιδίου φέρουν δυσδιάκριτες ωοθήκες αλλά είναι γόνιμοι (Yan *et al.*, 2001). Εν αντιθέσει το γονίδιο GDF9 αναφέρεται ως απαραίτητο για τη γονιμότητα στο πρόβατο (Davis *et al.*, 1991; Galloway *et al.*, 2000; Hanrahan *et al.*, 2004; Juengel *et al.*, 2004) και στους μύες (Dong *et al.*, 1996).

Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων BMP15 και GDF9 μπορούν να διαφοροποιήσουν δραστικά την γονιμότητα και το ποσοστό ωοθυλακιορρηξίας (Dong *et al.*, 1996; Galloway *et al.*, 2000). Τα αποτελέσματα όμως αυτών των μελετών, που ήδη αναφέρθηκαν σε προηγούμενο κεφάλαιο, σχετικά με την ομοζυγωτία και την ετεροζυγωτία και την επίδρασή τους στην ωοθυλακιορρηξία, έρχονται σε αντίθεση με όσα αναφέρονται στον μυ με αδρανοποιημένα και τα δύο αυτά γονίδια (Dong *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 2001). Έτσι λοιπόν ο μυς στον οποίο το γονίδιο GDF9 είναι αδρανοποιημένο θεωρείται στείρος και η ωοθυλακική ανάπτυξη διακόπτεται σε πρωτεύον στάδιο, ενώ στους μύες στους οποίους έχει αδρανοποιηθεί το γονίδιο BMP15, δεν παρατηρούνται φανερές επιδράσεις στην ωοθυλακική αύξηση και στην ανάπτυξη του εμβρύου (McNatty *et al.*, 2001; 2003). Επομένως πρόβατα στα οποία τα γονίδια BMP15 και GDF9 είναι εξουδετερωμένα και μύες που έχουν υποστεί απαλοιφή του γονιδίου GDF9 είναι στείρα (Dong *et al.*, 1996; Juengel *et al.*, 2002; Hanrahan *et al.*, 2004). Έως σήμερα δεν έχει αναφερθεί στον άνθρωπο κανένας λειτουργικός πολυμορφισμός στα γονίδια BMP15 και GDF9 που να σχετίζεται είτε με στείριότητα είτε με αυξημένη ωοθυλακιορρηξία (Takebayashi *et al.*, 2000).

Αναλυτικότερα οι πολυμορφισμοί δρουν σε διαφορετικά στάδια της ωοθυλακιογένεσης και μόνο, εφόσον τα ωοθυλάκια έχουν εισέλθει στη φάση της ανάπτυξης. Ο πολυμορφισμός FecX<sup>I</sup> του γονιδίου BMP15 δρα νωρίς κατά τη φάση ανάπτυξης. Στα ομοζυγωτά άτομα αποτυχία αποστολής του σήματος από το γονίδιο

BMP15, από τα ωοθυλάκια που βρίσκονται υπό ανάπτυξη υποδηλώνει ότι τα κοκκώδη κύτταρα αποτυγχάνουν να διαιρεθούν και να υποστηρίξουν το ωοκύτταρο (Braw-Taletal., 1993; McNattyetal., 1995b). Ως αποτέλεσμα το ωοκύτταρο μεγαλώνει και ρήγνυται. Επιπλέον, από τα αποτελέσματα μελετών διεξήχθη το συμπέρασμα ότι οι πολυμορφισμοί που προκαλούν στειρότητα στα πρόβατα των φυλών Belclare και Cambridge όταν βρίσκονται σε ομοζυγωτία, φαίνεται ότι δρουν αργότερα από τον πολυμορφισμό FecX<sup>I</sup> αφού μικρού μεγέθους αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια είναι ορατά στις ωοθήκες των ζώων αυτών (Hanrahan, 1991; Webbetal., 1998).

Η περισσότερο εμφανής επίδραση του πολυμορφισμού FecB αφορά στον δείκτη ωοθυλακιορρηξίας, και στο μέγεθος και στον αριθμό των απελευθερούμενων ωοκυττάρων στην ωοθήκη. Στα πρόβατα που φέρουν τον πολυμορφισμό αυτόν παρατηρείται υπερπολλαπλασιασμός των ωοθυλακίων που οφείλεται στην πρόωμη ωοθυλακική ανάπτυξη. Χαρακτηριστικά είναι τα μεγαλύτερα ωοκύτταρα, η υψηλότερη ευαισθησία των κοκκωδών κυττάρων στην FSH και ο μικρότερης κλίμακας πολλαπλασιασμός των κοκκωδών κυττάρων σε σχέση με τον πολλαπλασιασμό που παρατηρείται στα άτομα που δεν είναι φορείς του πολυμορφισμού (Wilsonetal., 2001; Hunteretal., 2005). Στα ομοζυγωτά (BB) και ετεροζυγωτά (B+) άτομα τα ώριμα και τα υπό ανάπτυξη ωοθυλάκια έχουν σημαντικά μικρότερη διάμετρο από αυτήν των ατόμων που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό (++) (McNattyandHenderson, 1987; Montgomeryetal., 1992; BairdandCambell, 1998). Αυτά τα μικρότερης διαμέτρου ωοθυλάκια στις ομοζυγωτές προβατίνες περιέχουν μικρότερο αριθμό κοκκωδών κυττάρων από τις προβατίνες που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό (McNattyandHenderson, 1987; Montgomeryetal., 1992). Ο αυξημένος αριθμός όμως των ωοκυττάρων που απελευθερώνεται υποκαθιστά τον μικρό αριθμό των κοκκωδών κυττάρων. Συνεπώς τόσο ο συνολικός αριθμός των κοκκωδών κυττάρων από όλα τα απελευθερούμενα ωοκύτταρα αλλά και η συνολική παραγωγή οιστραδιόλης από τις ωοθήκες των BB / B+ είναι ίδια με αυτήν των ++ προβατίνων (Montgomeryetal., 1992; Souzaetal., 1997). Επίσης δεν έχει παρατηρηθεί, καμία διαφορά στη λειτουργία του υποθαλάμου στις προβατίνες φορείς του πολυμορφισμού, γεγονός το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η δράση του γονιδίου εκδηλώνεται στην υπόφυση και στις ωοθήκες (Montgomeryetal., 1992; McNattyetal., 1993). Η επίδραση του γονιδίου στην υπόφυση μπορεί να είναι είτε άμεση είτε έμμεση. Η κυριότερη επίδραση που ασκεί το γονίδιο είναι στην συγκέντρωση της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) (McNattyetal., 1994). Παρόλα αυτά σε ζώα διαφορετικής ηλικίας και διαφορετικής φυσιολογικής κατάστασης κάποιες μελέτες (Montgomeryetal., 1992; Braw-Taletal., 1993; McNattyetal., 1993, 1994; Phillipsetal., 1993; Isaacsetal., 1998) αλλά όχι όλες (Driancourtetal., 1991; Wheatonetal., 1996; Souzaetal., 1997) βρήκαν σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση της FSH στα ομοζυγωτά άτομα (BB) συγκριτικά με τα άτομα που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό (++) . Στις περισσότερες από αυτές τις μελέτες δεν αναφέρθηκαν διαφορές στη συγκέντρωση της LH. Συμπερασματικά οι ενδείξεις αυτές οδηγούν στην άποψη ότι τα ομοζυγωτά άτομα απελευθερώνουν υψηλότερη ποσότητα FSH σε σχέση με τον άγριο τύπο (McNattyetal., 1991; Heathetal., 1996). Για παράδειγμα μελέτες σε ζώα ωοθηκεκτομηθέντα στα οποία δεν υπάρχει επικοινωνία του

υποθαλάμου με την υπόφυση, η συγκέντρωση της FSH 10 λεπτά μετά από εξωγενές ερέθισμα με GnRH (250 ng) ήταν κατά 1,6 φορές υψηλότερη στα ομοζυγωτά άτομα από ότι στα άτομα που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό (McNatty*et al.*, 1991).

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό  $FecX^I$  σε ενήλικες προβατίνες δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των τριών γονοτύπων (II, I+, ++) στο συνολικό αριθμό ωοθυλακίων στην ωοθήκη (Braw-Talet*et al.*, 1993; Smith*et al.*, 1997). Επομένως η διαδικασία σχηματισμού των ωοθυλακίων είναι πιθανώς η ίδια σε όλους τους γονοτύπους. Παρόλα αυτά βρέθηκε ότι ο συνολικός αριθμός των ωοθυλακίων με άντρο (δηλαδή με διάμετρο  $\geq 1$  mm) ήταν υψηλότερος στις ενήλικες ετεροζυγωτές (I+) προβατίνες από ότι στις προβατίνες που δεν έφεραν τον πολυμορφισμό (++) (Shackel*et al.*, 1993; McNatty*et al.*, 1995b). Αυτή η διαφορά πιθανώς να οφείλεται στην παρουσία περισσότερων και μικρότερων ωοθυλακίων με άντρο και μικρότερο αριθμό κοκκωδών κυττάρων, τόσο στα μικρά, όσο και στα μεγαλύτερα ωοθυλάκια με άντρο, στα ετεροζυγωτά (I+) άτομα συγκριτικά με τα άτομα που δεν έφεραν τον πολυμορφισμό (++) . Επίσης στα I+ άτομα φαίνεται ότι τα ωοθυλάκια ωριμάζουν ενώ έχουν μικρή διάμετρο. Η πρόωμη ωρίμαση μπορεί να οφείλεται στη μεγαλύτερη ευαισθησία στην FSH και σε πρόωμη απόκτηση των υποδοχέων της LH (Shackel*et al.*, 1993).

Επίσης βρέθηκε ότι ο όγκος των ωοθηκών είναι κατά 25% μεγαλύτερος στα ενήλικα ομοζυγωτά (II) άτομα από ότι στα άτομα που δεν είναι φορείς του πολυμορφισμού. Αυτή η αλλαγή στον όγκο των ωοθηκών συμβαίνει σε χρονικό διάστημα 6 μηνών μετά την γέννηση. Η διαφορά αυτή πιθανώς να οφείλεται στην μη φυσιολογική ανάπτυξη των ωοθυλακίων πέραν του πρωτογενούς σταδίου στα ομοζυγωτά άτομα (Braw-Talet*et al.*, 1993; Smith*et al.*, 1997). Μη φυσιολογικά μορφώματα στην ωοθήκη κατά την εμβρυική ανάπτυξη αποτελούν κοινό γνώρισμα στις ωοθήκες τόσο των νεογνών όσο και των ενήλικων ομόζυγων ατόμων (Braw-Talet*et al.*, 1993; McNatty*et al.*, 1995b; McLeod*et al.*, 1995). Αυτάτα μη φυσιολογικά μορφώματα περιλαμβάνουν ωοθυλάκια χωρίς ωοκύτταρα και δομές που ομοιάζουν με όγκους (Juenge*et al.*, 2000).

Κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη της επίδρασης των πολυμορφισμών σε ιστολογικό επίπεδο, προκειμένου να μελετηθούν εκτενέστερα τα στάδια στα οποία ο κάθε πολυμορφισμός επηρεάζει την ωοθυλακιορρηξία.

## 2.7. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμορφισμών

Η διασταύρωση ατόμων που φέρουν τον πολυμορφισμό  $FecX^I$  με άτομα που φέρουν τον πολυμορφισμό  $FecX^H$  παράγαγε απογόνους με ένα αντίγραφο του κάθε αλληλομόρφου που εμφάνιζαν στειρότητα, όπως παρατηρήθηκε και για τους τέσσερις πολυμορφισμούς του γονιδίου BMP15 όταν βρίσκονται σε ομοζυγωτία (Davis*et al.*, 2001a). Ομοίως προβατίνες της φυλής Belclare που είχαν ένα αντίγραφο του αλληλομόρφου  $FecX^G$  με ένα αντίγραφο του αλληλομόρφου  $FecX^B$  είναι επίσης στείρα (Hanrahan*et al.*, 2004).

Διασταυρώσεις με πρόβατα BooroolaMerinos που είχαν τον πολυμορφισμό στο γονίδιο BMPR-IB, με πρόβατα Inverdale που είχαν τον πολυμορφισμό στο γονίδιο BMP15 έδειξαν ότι όλες οι θυγατέρες είχαν πλήρεις και λειτουργικές ωοθήκες καθώς και υψηλό δείκτη ωοθυλακιορρηξίας με μέσο όρο 4,4 (Davis*etal.*, 1999). Και οι δύο αυτοί πολυμορφισμοί έχουν συνεργική δράση όσον αφορά τον ρυθμό ωοθυλακιορρηξίας με τον πρώτο να τον αυξάνει κατά 90% και με τον δεύτερο κατά 44%.

Τα περισσότερα στοιχεία οδηγούν στην άποψη ότι η επίδραση του πολυμορφισμού του GDF9 μαζί με αυτόν του BMP15 δρουν αθροιστικά για τον ρυθμό ωοθυλακιορρηξίας, παρόλο που αποτελέσματα δοκιμών που έχουν γίνει στους απογόνους οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η επίδραση του πολυμορφισμού του γονιδίου GDF9 είναι μικρότερη όταν είναι παρών και κάποιος από τους πολυμορφισμούς του γονιδίου BMP15 (Hanrahan*etal.*, 2004). Πάντως όλες οι προβατίνες με ένα αντίγραφο και από τους δύο πολυμορφισμούς παρουσίαζαν υψηλότερο ρυθμό ωοθυλακιορρηξίας σε σχέση με προβατίνες που έφεραν τον ένα μόνο πολυμορφισμό.

Ιδιαίτερη λοιπόν σημασία και προσοχή πρέπει να δίνεται στο γονίδιο ή στον πολυμορφισμό που πρόκειται να εισαχθεί σε ένα ποίμνιο στο πλαίσιο ενός προγράμματος γενετικής βελτίωσης, καθώς πρέπει να ληφθεί υπόψη το υπόβαθρο της φυλής, οι διαφορετικοί χειρισμοί που θα πρέπει πιθανώς να ισχύσουν στην εκτροφή, καθώς και οι αλληλεπιδράσεις των διαφόρων πολυμορφισμών όπως αυτοί προαναφέρθηκαν. Χωρίς την κατάλληλη μελέτη όλων των παραπάνω είναι πιθανό να μην επιτευχθεί ο επιθυμητός στόχος αλλά να υπάρξουν εντελώς αντίθετα και ανεπιθύμητα αποτελέσματα.

## 2.8. Πολυμορφισμοί και Αίγες

Το 2008 πραγματοποιήθηκε μελέτη στην Κίνα που αφορούσε στους γνωστούς πολυμορφισμούς, αυτή τη φορά στις αίγες (Hua*etal.*, 2008). Εξετάστηκαν 6 κινεζικές φυλές αιγών, συνολικά 550 άτομα. Οι φυλές οι οποίες μελετήθηκαν ήταν η φυλή Boer (n=209), η δεύτερη γενιά που προήλθε από διασταύρωση BoerxHuanghuai (n=82), η φυλή Haimen (n=128), η φυλή Huanghuai (n=71), η φυλή Nubi (n=37), και η φυλή Matou (n=23).

Τα άτομα εξετάστηκαν για τους εξής πολυμορφισμούς: FecB, FecX<sup>I</sup>, FecX<sup>H</sup>, FecX<sup>B</sup> και FecX<sup>G</sup>, αλλά κανένας από αυτούς δεν ανιχνεύθηκε σε κάποιο άτομο του πληθυσμού. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι είναι πιθανό οι πολυμορφισμοί FecB και FecX να μην είναι οι μόνοι που ευθύνονται για την υψηλή γονιμότητα, άποψη που ενισχύεται από το γεγονός ότι στη φυλή προβάτων Hu, που αποτελεί την πιο γόνιμη φυλή στην Κίνα με την πρώτη αναφορά σχετικά με την γονιμότητά της να έχει δοθεί από τον CharlesDarwin, τα άτομα που εξετάστηκαν ήταν όλα γονότυπου BB, δηλαδή ομοζυγωτά για τον πολυμορφισμό FecB, αλλά κανένας πολυμορφισμός του BMP15 δεν ανιχνεύθηκε (Wan*etal.*, 2003; Davis*etal.*, 2006b; Guan*etal.*, 2007). Μελέτες που αφορούσαν στις αίγες των φυλών JiningGrey, Boer, Wendeng, LiaoningCashmere,

InnerMongoliaCashmere, Beijing ενισχύουν την ίδια άποψη, ότι δηλαδή δεν υπήρχε κανένας πολυμορφισμός του BMP15 (Heetal., 2006). Συμπερασματικά κανένας πολυμορφισμός από τους FecB, FecX<sup>I</sup>, FecX<sup>H</sup>, FecX<sup>B</sup> και FecX<sup>G</sup> δεν ανιχνεύθηκε στα ζώα που εξετάστηκαν (Huaetal., 2008). Παρόλα αυτά πρέπει να σημειωθεί ότι η μελέτη για τις αίγες βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο και σίγουρα πρέπει να διερευνηθούν περισσότερο οι πιθανοί μηχανισμοί που ελέγχουν τη γονιμότητα των αιγών.

## 2.9. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της παρουσίας και της διάδοσης των γενετικών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SingleNucleotidePolymorphisms – SNPs) που έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν το ρυθμό ωοθυλακιορρηξίας στα γονίδια GDF9 και BMP15 σε δύο ελληνικές φυλές προβάτων, από τις οποίες η μία (Χιώτικη) με σημαντικά υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας σε σχέση με την άλλη (Καραγκούνικη). Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε εστιάστηκε στους γενετικούς μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς των γονιδίων GDF9 (G1, G4, G7, G8) και BMP15 (B2 και B4), οι οποίοι είναι και αυτοί που συναντώνται συχνότερα. Με τον τρόπο αυτό επιδιώκεται να διερευνηθεί η πιθανή συσχέτιση της παρουσίας ή απουσίας κάποιων από αυτούς τους πολυμορφισμούς με τον διαφορετικό δείκτη πολυδυμίας των συγκεκριμένων φυλών προβάτων σε μια προσπάθεια να μελετηθεί περαιτέρω η γενετική βάση της πολυδυμίας.

### **3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **3.1 Ζωικό Υλικό**

Για την μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 188 ζώα φυλής Χίου (n=92) και Καραγκούνικης φυλής (n=96). Τα ζώα προέρχονταν αντίστοιχα από το κτηνοτροφείο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και το Κέντρο Γενετικής Βελτίωσης Καρδίτσας ενώ οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν μεταξύ 2005 και 2009. Από κάθε ζώο συλλέχθηκαν 2 ml αίματος, τα οποία τοποθετήθηκαν σε ειδικά φιαλίδια που εμπεριείχαν ηπαρίνη. Το κάθε δείγμα σημαδεύτηκε με έναν κωδικό αριθμό και αποθηκεύτηκε στους 4°C. Ακολούθησε απομόνωση του DNA από τα δείγματα.

Για κάθε ζώο από τις δύο φυλές συγκεντρώθηκαν στοιχεία για την ηλικία, τον μήνα που πραγματοποιήθηκε ο τοκετός και το μέγεθος της τοκετοομάδας.

### **3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA**

Η απομόνωση του DNA από τα δείγματα αίματος έγινε με την χρήση τυποποιημένης εμπορικής διαδικασίας (NucleoSpinTissuekit (Macherey–Nagel)).

#### **3.2.1. Μέθοδος**

Τοποθετήθηκαν 200 µl από κάθε δείγμα αίματος σε αποστειρωμένο φιαλίδιο τύπου Eppendorf μαζί με 25 µl πρωτεϊνάσης K καθώς και 200 µl διαλύματος λύσης B3. Ακολούθησε ανάδευση για περίπου 10-20 δευτερόλεπτα. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικό θερμαντήρα στους 70°C για 10-15 λεπτά. Κατόπιν προστέθηκαν 210 µl αιθανόλης (96-100%) και ακολούθησε ανάδευση. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε στήλες NucleoSpinTissuecolumns και φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό στις 11000 rpm. Η στήλη NucleoSpinTissue μεταφέρθηκε σε νέο αποστειρωμένο φιαλίδιο των 2 ml και προστέθηκαν 500 µl διαλύματος πλύσης BW. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1 λεπτό. Η στήλη NucleoSpinTissue μεταφέρθηκε σε νέο αποστειρωμένο φιαλίδιο των 2 ml και προστέθηκαν 600 µl διαλύματος πλύσης B5. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1 λεπτό. Στη συνέχεια, αφού η στήλη τοποθετήθηκε σε νέο αποστειρωμένο φιαλίδιο των 2 ml, πραγματοποιήθηκε μια ακόμη φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1 λεπτό προκειμένου να εξατμιστεί το υπόλειμμα αιθανόλης. Η στήλη NucleoSpinTissue μεταφέρθηκε ξανά σε νέο αποστειρωμένο φιαλίδιο των 1,5 ml (micro-centrifuge tube) και προστέθηκαν 100 µl διαλύματος εξαγωγής BE που είχε προθερμανθεί στους 70°C σε ειδικό θερμαντήρα. Τα δείγματα παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1 λεπτό και κατόπιν τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -25°C.



### 3.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΟΝΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs)

#### 3.3.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR - Polymerase Chain Reaction)

##### 3.3.1.1. Γενικά

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR – Polymerase Chain Reaction) είναι μια εξαιρετικά επιλεκτική και ευαίσθητη μέθοδος. Δύναται να ανιχνεύει ακόμα και ένα μόνο μόριο DNA σε ένα δείγμα. Η PCR είναι μία τεχνική Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών (όπως η *E. coli* ή οι ζύμες).

Με την PCR μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Η αλληλουχία του DNA θραύσματος ή του γονιδίου είναι απαραίτητο να είναι γνωστή για το σχεδιασμό των συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων, το καθένα από τα οποία θα είναι συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Τα ολιγονουκλεοτίδια που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές πρέπει να δεσμεύονται σε θέσεις αντίθετες από την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί. Δηλαδή καθορίζουν τα άκρα του DNA θραύσματος που πρόκειται να ενισχυθεί.

##### 3.3.1.2. Στάδια της PCR

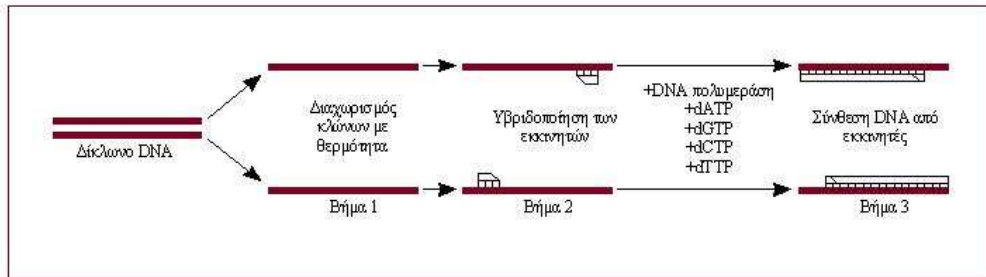
Συνοπτικά ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια:

- ☞ Αποδιάταξη του DNA (Denaturation)
- ☞ Προσαρμογή των εκκινητήρων στο DNA εκμαγείο (Annealing)
- ☞ Επιμήκυνση των εκκινητήρων (Extension).

Αναλυτικά, αρχικά το DNA – στόχος αποδιατάσσεται, με θέρμανση στους 95°C για χρονικό διάστημα που κυμαίνεται από 15 δευτερόλεπτα έως 2 λεπτά. Στο στάδιο αυτό οι δύο κλώνοι του DNA αποχωρίζονται ο ένας από τον άλλον. Ακολούθως η θερμοκρασία ελαττώνεται στους 40 – 60°C για 30 – 60 δευτερόλεπτα. Στο στάδιο αυτό οι εκκινητές υβριδοποιούνται στους κλώνους του DNA – στόχου. Στο τελικό στάδιο ξεκινά η σύνθεση του νέου κλώνου του DNA, με την προσθήκη νουκλεοτιδίων, από το ένζυμο DNA πολυμεράση, στο 3' άκρο κάθε εκκινητή και η αλυσίδα επεκτείνεται. Η διαδικασία της επιμήκυνσης διαρκεί 1 – 2 λεπτά και πραγματοποιείται

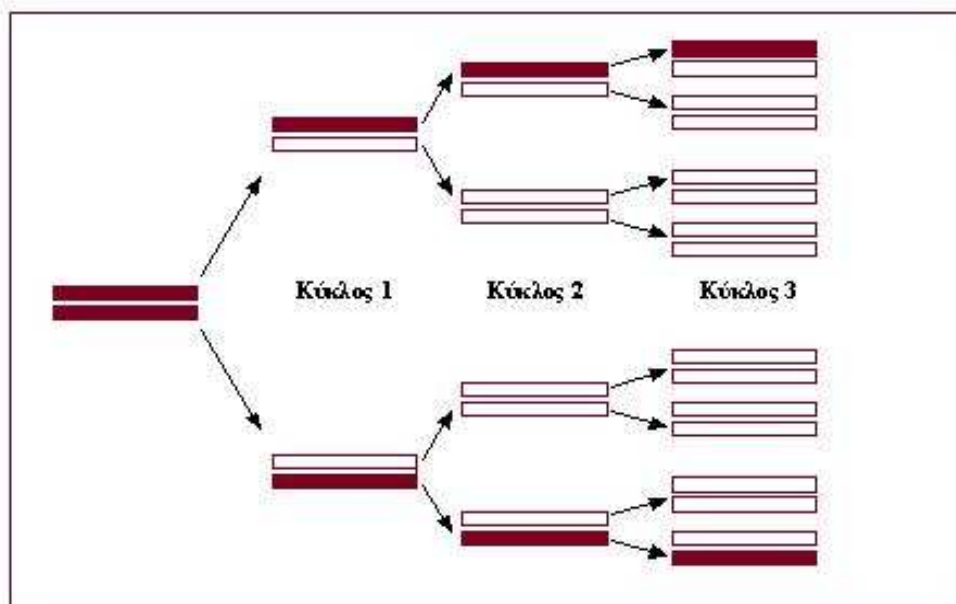
στους 74°C. Τα τρία αυτά στάδια αποτελούν έναν πλήρη κύκλο της αντίδρασης PCR. Ο επόμενος κύκλος θα ξεκινήσει και πάλι από το στάδιο της αποδιάταξης των σχηματιζόμενων μορίων DNA. (Εικόνα 3.3.1.2.1.)

**Εικόνα 3.3.1.2.1. Τα στάδια κατά την διάρκεια ενός κύκλου αντίδρασης PCR. Στάδιο 1: Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA. Στάδιο 2: Δέσμευση των εκκινητών στους κλώνους του DNA. Στάδιο 3: Επιμήκυνση της αλυσίδας κατόπιν προσθήκης βάσεων με την επίδραση της DNA πολυμεράσης.**



Στο τέλος του πρώτου κύκλου της αντίδρασης οι κλώνοι του DNA – στόχου είναι πλέον τέσσερις και αποτελούν τα πρότυπα για τη σύνθεση νέων κλώνων DNA στον 2<sup>ο</sup> κύκλο. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται πολλαπλασιασμός του DNA – στόχου, 2<sup>n</sup> όπου n ο αριθμός των κύκλων (Εικόνα 3.3.1.2.2.).

**Εικόνα 3.3.1.2.2. Πολλαπλασιασμός τμημάτων DNA σε PCR αντίδραση. Μετά το τέλος του 1<sup>ου</sup> κύκλου το δίκλωνο DNA έχει διπλασιαστεί, μετά το τέλος του 2<sup>ου</sup> κύκλου έχει τετραπλασιαστεί, μετά το τέλος του 3<sup>ου</sup> κύκλου έχει οκταπλασιαστεί, ακολουθώντας εκθετική αύξηση της μορφής 2<sup>n</sup>, όπου n ο αριθμός των κύκλων.**



### 3.3.1.3. Αντιδραστήρια για την PCR

Έγινε επιλεκτική ενίσχυση συνολικά έξι τμημάτων DNA με PCR. Οι περιοχές αυτές αντιστοιχούσαν στα γονίδια GDF9 και BMP15 που φέρουν τους πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν: G1, G4, G7, G8 για το GDF9 και B2, B4 του γονιδίου BMP15.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR αναφέρονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 3.3.1.3.1.)

#### Πίνακας 3.3.1.3.1. Αντιδραστήρια για την διεξαγωγή της PCR

Taq DNA polymerase 5 U/μl (Invitrogen)
10X ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (Reaction buffer): 200mM Tris-HCl (pH 8,4),
500mM KCl
50 mM MgCl <sub>2</sub>
dNTP's (ATP, TTP, CTP, GTP-Fermentas)
Νερό ποιότητας υγρής χρωματογραφίας

### 3.3.1.4. Μέθοδος

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν ανά δείγμα για κάθε αντίδραση της PCR, τελικού όγκου 50μl αναφέρονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 3.3.1.4.1.)

#### Πίνακας 3.3.1.4.1. Ποσότητες αντιδραστηρίων της PCR

10X ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (Reactionbuffer):	5 μl
(1,5mM) MgCl <sub>2</sub> :	2 μl
dNTP's:	1 μl
H <sub>2</sub> O:	34,75 μl
Taq DNA πολυμεράση:	0,25 μl
Primers:	1 μl εκάστου primer
DNA:	5 μl

Για κάθε μια από τις παραπάνω αντιδράσεις προετοιμάστηκε διάλυμα για την εξέταση του συνόλου των δειγμάτων (mastermix). Για την προετοιμασία αυτού του διαλύματος, προστέθηκε αρχικά το νερό και στη συνέχεια το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, το χλωριούχο μαγνήσιο, το μίγμα των δεσοξυριβοζονουκλεοτιδίων (dNTP's) και οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές. Τελευταία προστέθηκε η TaqDNA πολυμεράση. Η διαδικασία έγινε σε ειδικό θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (PCRWorkstation) που χρησιμοποιείται αποκλειστικά για τον σκοπό αυτό. Τα αναλώσιμα και οι πιπέτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποκλειστικά για χρήση PCR. Το διάλυμα διαμοιράστηκε σε ειδικά φιαλίδια για PCR, τα οποία σημάνθηκαν καταλλήλως και πωματίστηκαν για να τοποθετηθούν σε καθαρό πάγκο εργασίας όπου προστέθηκε το DNA. Τα φιαλίδια με το DNA τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή (MyCycler®, BIORAD), ο οποίος προγραμματίστηκε ως προς τον χρόνο και τις θερμοκρασίες που απαιτούνται για την διεξαγωγή των αντιδράσεων.

Τα αναλώσιμα αντιδραστήρια και υλικά έπρεπε πριν τη χρήση τους για PCR να τοποθετηθούν στον ειδικό θάλαμο κάθετης νηματικής ροής για μερικά λεπτά υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Ανά 10 δείγματα χρησιμοποιήθηκε και ένας αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA για τον έλεγχο τυχόν επιμολύνσεων.

Η ενίσχυση του κάθε νουκλεοτιδικού πολυμορφισμού πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά. Για τον κάθε ένα χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές των οποίων η αλληλουχία, καθώς και αλλά συμπληρωματικά στοιχεία, φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 3.3.1.4.2.)

**Πίνακας 3.3.1.4.2. Πρωτόκολλο θερμοκρασιών – χρόνων της PCR που ακολουθήθηκε για την ανίχνευση των πολυμορφισμών G1, G4, G7, G8, B2, B4**

<b>Πολυμορφισμός</b>	Αρχική αποδιάταξη DNA	94°C για 5 λεπτά	1 κύκλος
<b>G1 G4 G7 B2</b>	Αποδιάταξη DNA	94°C για 30 δευτερόλεπτα	35 κύκλοι
	Υβριδοποίηση εκκινητών	63°C για 40 δευτερόλεπτα (*, **)	
	Επιμήκυνση	72 °C για 30 δευτερόλεπτα	
	Επέκταση	72 °C για 4 λεπτά	1 κύκλος

\*: Για τον πολυμορφισμό **G8** η θερμοκρασία του σταδίου αυτού είναι **62 °C**

\*\* : Για τον πολυμορφισμό **B4** η θερμοκρασία του σταδίου αυτού είναι **64 °C**

Η αλληλουχία των εκκινητών δίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.3.1.4.3.) καθώς επίσης και το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων της PCR. Η σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών είναι κατά Hanrahanetal., (2004).

**Πίνακας 3.3.1.4.3. Αλληλουχία εκκινητών και μέγεθος προϊόντων PCR.**

**F: forward (εμπρόςθιος), R: reverse (ανάστροφος), ζ.β.: ζεύγηβάσεων.**

Πολυμορφισμοί	PCR εκκινητές	Μέγεθος προϊόντος PCR
<b>G1</b>	G9-F:5'GAAGACTGGTATGGGGAAATG 3' G9-R:5'CCAATCTGCTCCTACACACCT 3'	462 ζ.β.
<b>G4</b>	G4-F: 5'GGAATATTCACATGTCTGTAAATTTACATGTTTCG G4-R: 5'GAGGGAATGCCACCTGTGAAAAGCC 3'	161 ζ.β.
<b>G7</b>	G7-F:5'GCCTCTGGTTCAGCTTCAGTC 3' G7-R:5'CAGTATCGAGGGTTGTATTTGTGTGGGGCCT 3'	158 ζ.β.
<b>G8</b>	G8-F:5'CTTTAGTCAGCTGAAGTGGGACAAC 3' G8-R:5'ATGGATGATGTTCTGCACCATGGTGTGAACCTGA	139 ζ.β.
<b>B2</b>	B2-F:5'CACTGTCTTCTTGTACTGTATTCAATGAGAC 3' B2-R:5'GATGCAATACTGCCTGCTTG 3'	141 ζ.β.
<b>B4</b>	B4-F:5'GCCTTCCTGTGCCCTTATAAGTATGTTCCCTTA 3' B4-R:5'TTCTTGGGAAACCTGAGCTAGC 3'	153 ζ.β.

### 3.3.2. Πέψη των προϊόντων PCR με χρήση περιοριστικών ενζύμων (PCR-RFLP)


Με τους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς δημιουργούνται ή καταργούνται θέσεις περιορισμού. Επομένως, προκειμένου να ανιχνευθεί έκαστος πολυμορφισμός τα προϊόντα της PCR πέπτονται με το κατάλληλο για κάθε περίπτωση ένζυμο περιορισμού. Οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν και οι αλλαγές που αυτοί επιφέρουν σε αμινοξέα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.2.1.

**Πίνακας 3.3.2.1. Οι μεταλλάξεις των μονονουκλεοτιδίων και οι συνεπαγόμενες αλλαγές αμινοξέων εκάστου πολυμορφισμού των γονιδίων BMP15 και GDF9.**

Γονίδιο	Όνομασία πολυμορφισμού	Σημειακή μεταλλαγή μονονουκλεοτιδίου	Θέση αλλαγής (ζ.β.)	Αλλαγή αμινοξέος λόγω μεταλλαγής	Θέση αμινοξέος
<b>GDF9</b>	G1	G → A	260	Arg → His	87
	G4	G → A	721	Glu → Lys	241
	G7	G → A	1111	Val → Met	371
	G8	C → T	1184	Ser → Phe	395
<b>BMP15</b>	B2	C → T	718	Glu → Stop	239
	B4	G → T	1100	Ser → Ile	367

Συγκεκριμένα, προστέθηκε σε όλα τα δείγματα 1 μl περιοριστικού ενζύμου (κατάλληλο για κάθε πολυμορφισμό) και τοποθετήθηκαν για 2 ώρες περίπου για επώαση στην ειδική θερμοκρασία αναλόγως του ενζύμου.

Η εκτίμηση της παρουσίας του συγκεκριμένου τύπου πολυμορφισμού στο προϊόν αντίδρασης της PCR έγινε με τον προσδιορισμό του αριθμού και του μεγέθους των τεμαχιδίων DNA που προέκυπταν μετά από την πέψη του με περιοριστικά ένζυμα. Πιο συγκεκριμένα:

 Πολυμορφισμός **G1** (Σημειακή μεταλλαγή G → A στη θέση 260): Το προϊόν της PCR μεγέθους 462 ζ.β. παρήγαγε με το ένζυμο HhaI τρία τεμάχια μεγέθους 52, 156 και 254 ζ.β. από τα φυσιολογικά άτομα. Τα άτομα που έφεραν τη μεταλλαγή σε ομόζυγη κατάσταση παρήγαγαν δύο τεμάχια 52 και 410 ζ.β., ενώ

τα αντίστοιχα προϊόντα πέψης από τα ετερόζυγα άτομα ήταν τέσσερα (52, 156, 254 και 410 ζ.β.) (Πίνακας 3.3.2.2.).

- 🐜 Πολυμορφισμός**G4** (Σημειακή μεταλλαγή G →A στη θέση 721): Το προϊόν της PCR μεγέθους 161 ζ.β. παρήγαγε με το ένζυμο SfuI ένα τεμάχιο μεγέθους 161 ζ.β. από τα φυσιολογικά άτομα. Τα άτομα που έφεραν τη μεταλλαγή σε ομόζυγη κατάσταση παρήγαγαν, ένα τεμάχιο 131 ζ.β., ενώ τα αντίστοιχα προϊόντα πέψης από τα ετερόζυγα άτομα ήταν δύο (131 και 161 ζβ) (Πίνακας 3.3.2.3.).
- 🐜 Πολυμορφισμός**G7** (Σημειακή μεταλλαγή G →A στη θέση 1111): Το προϊόν της PCR μεγέθους 158 ζ.β. παρήγαγε με το ένζυμο MseI ένα τεμάχιο μεγέθους 158 ζ.β. από τα φυσιολογικά άτομα. Τα άτομα που έφεραν τη μεταλλαγή σε ομόζυγη κατάσταση παρήγαγαν, ένα τεμάχιο 128 ζ.β., ενώ τα αντίστοιχα προϊόντα πέψης από τα ετερόζυγα άτομα ήταν δύο (128 και 158 ζ.β.) (Πίνακας 3.3.2.4.).
- 🐜 Πολυμορφισμός**G8** (Σημειακή μεταλλαγή C →T στη θέση 1184): Το προϊόν της PCR μεγέθους 139 ζβ παρήγαγε με το ένζυμο DdeI ένα τεμάχιο μεγέθους 109 ζ.β. από τα φυσιολογικά άτομα. Τα άτομα που έφεραν τη μεταλλαγή σε ομόζυγη κατάσταση παρήγαγαν, ένα τεμάχιο 139 ζ.β., ενώ τα αντίστοιχα προϊόντα πέψης από τα ετερόζυγα άτομα ήταν δύο (109 και 139 ζ.β.) (Πίνακας 3.3.2.5.).
- 🐜 Πολυμορφισμός**B2** (Σημειακή μεταλλαγή C →T στη θέση 718): Το προϊόν της PCR μεγέθους 141 ζ.β. παρήγαγε με το ένζυμο HinfI ένα τεμάχιο μεγέθους 111 ζ.β. από τα φυσιολογικά άτομα. Τα άτομα που έφεραν τη μεταλλαγή σε ομόζυγη κατάσταση παρήγαγαν, ένα τεμάχιο 141 ζ.β., ενώ τα αντίστοιχα προϊόντα πέψης από τα ετερόζυγα άτομα ήταν δύο (111 και 141 ζ.β.) (Πίνακας 3.3.2.6.).
- 🐜 Πολυμορφισμός**B4** (Σημειακή μεταλλαγή G →T στη θέση 1100): Το προϊόν της PCR μεγέθους 153 ζβ παρήγαγε με το ένζυμο DdeI ένα τεμάχιο μεγέθους 123 ζ.β. από τα φυσιολογικά άτομα. Τα άτομα που έφεραν τη μεταλλαγή σε ομόζυγη κατάσταση παρήγαγαν, ένα τεμάχιο 153 ζ.β., ενώ τα αντίστοιχα προϊόντα πέψης από τα ετερόζυγα άτομα ήταν δύο (123 και 153 ζ.β.) (Πίνακας 3.3.2.7.).

**Πίνακας 3.3.2.2. Αναμενόμενα αποτελέσματα πέψης με το ένζυμο περιορισμού για τον πολυμορφισμό G1**

Όνομασία πολυμορφισμού	Ένζυμο περιορισμού	Μέγεθος προϊόντος PCR (ζβ <sup>1</sup> )	Μέγεθος προϊόντων πέψης (ζβ)	
G1	HhaI	462	52, 156, 254	φυσιολογικό
			52, 410	μεταλλαγμένο(AA)
			52, 156, 254, 410	μεταλλαγμένο(GA)

**Πίνακας 3.3.2.3. Αναμενόμενα αποτελέσματα πέψης με το ένζυμο περιορισμού για τον πολυμορφισμό G4**

Όνομασία πολυμορφισμού	Ένζυμο περιορισμού	Μέγεθος προϊόντος PCR (ζβ)	Μέγεθος προϊόντων πέψης (ζβ)	
G4	SfuI	161	161	φυσιολογικό
			131	μεταλλαγμένο (AA)
			131, 161	μεταλλαγμένο (GA)

**Πίνακας 3.3.2.4. Αναμενόμενα αποτελέσματα πέψης με το ένζυμο περιορισμού για τον πολυμορφισμό G7**

Όνομασία πολυμορφισμού	Ένζυμο περιορισμού	Μέγεθος προϊόντος PCR (ζβ)	Μέγεθος προϊόντων πέψης (ζβ)	
G7	MseI	158	158	φυσιολογικό
			128	μεταλλαγμένο (AA)
			128, 158	μεταλλαγμένο (GA)

<sup>1</sup>ζ.β.: ζεύγη βάσεων



**Πίνακας 3.3.2.5. Αναμενόμενα αποτελέσματα πέψης με το ένζυμο περιορισμού για τον πολυμορφισμό G8**

Όνομασία πολυμορφισμού	Ένζυμο περιορισμού	Μέγεθος προϊόντος PCR (ζβ)	Μέγεθος προϊόντων πέψης (ζ,β)	
G8	DdeI	139	109	φυσιολογικό
			139	μεταλλαγμένο (TT)
			109, 139	μεταλλαγμένο (CT)

**Πίνακας 3.3.2.6. Αναμενόμενα αποτελέσματα πέψης με το ένζυμο περιορισμού για τον πολυμορφισμό B2**

Όνομασία πολυμορφισμού	Ένζυμο περιορισμού	Μέγεθος προϊόντος PCR (ζβ)	Μέγεθος προϊόντων πέψης (ζ,β)	
B2	HinfI	141	111	φυσιολογικό
			141	μεταλλαγμένο (TT)
			111, 141	μεταλλαγμένο (CT)

**Πίνακας 3.3.2.7. Αναμενόμενα αποτελέσματα πέψης με το ένζυμο περιορισμού για τον πολυμορφισμό B4**

Όνομασία πολυμορφισμού	Ένζυμο περιορισμού	Μέγεθος προϊόντος PCR (ζβ)	Μέγεθος προϊόντων πέψης (ζ,β)	
B4	DdeI	153	123	φυσιολογικό
			153	μεταλλαγμένο (TT)
			123, 153	μεταλλαγμένο (GT)

### 3.3.3 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων

#### 3.3.3.1. Γενικά

Τα νουκλεϊκά οξέα είναι ασθενώς αρνητικά φορτισμένα, λόγω ιονισμού των φωσφορικών τους ομάδων. Αν αρνητικά φορτισμένα μόρια τεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο (ηλεκτροφόρηση), σε πήκτωμα αγαρόζης (φυσικός πολυσακχαρίτης), τότε τα μακρομόρια κινούνται προς τον θετικό πόλο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους. Η πυκνότητα του πηκτώματος καθώς και η εφαρμοζόμενη τάση πεδίου (volts/cm πηκτώματος) ρυθμίζονται με βάση τα μεγέθη των μορίων που θα διαχωριστούν.

#### 3.3.3.2. Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης αναφέρονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 3.3.3.2.1.)

##### Πίνακας 3.3.3.2.1. Υλικά για την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

Διάλυμα 10XTBE (Tris-BoricEDTA) / (108 gTrisbase, 55gBoricAcid, 9,3 gNa <sub>4</sub> -EDTAσεέναλίτρονερό)
Βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/ml)
Αγαρόζη ( Certified <sup>TM</sup> ,Molecular Biology Agarose,BIO RAD)

#### 3.3.3.3. Μέθοδος

Σε κωνική φιάλη προστέθηκαν 120 ml διαλύματοςTris–βορικό οξύ – EDTA, (TBE) 0,5X και 2,4 g αγαρόζης προκειμένου να παρασκευαστεί πήκτωμα αγαρόζης 2%. Η τήξη της αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με θέρμανση μέχρι βρασμού σε φούρνο μικροκυμάτων, ισχύος 800 Watt. Ακολούθως προστέθηκαν 6 μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου (10mg / ml) και το διάλυματοποθετήθηκε στη μήτρα της συσκευής ηλεκτροφόρησηςπροκειμένου να σχηματιστεί το πήκτωμα. Στη μήτρα της συσκευής προηγουμένως είχε τοποθετηθεί η ειδική χτένα για τον σχηματισμό των οπών φόρτωσης. Μετά την στερεοποίηση του πηκτώματος, αυτόβυθίστηκε σε διάλυμα TBE (0,5X) στη συσκευή ηλεκτροφόρησης αφού προηγουμένως αφαιρέθηκε η ειδική χτένα. Στις οπές που δημιουργήθηκαν μετά την αφαίρεση της χτένας, τοποθετήθηκαν 10 μl δείγματος που είχαν αναμειχθεί με 2 μl διαλύματος φόρτωσης (6X

loadingdyesolution, Fermentas) για την καταβύθισή του. Τα ηλεκτρόδια συνδέθηκαν στους υποδοχείς της συσκευής και εφαρμόστηκε τάση 90 Volt/cm για 60 λεπτά. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα ελέγχθηκε σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας όπου γίνονται διακριτές οι ζώνες των δειγμάτων που έχουν διαχωριστεί. Το μέγεθος των προϊόντων DNA έγινε με τη βοήθεια δείκτη μοριακών βαρών (MassRuler™DNA Ladder, Fermentas) και τη χρήση ειδικού λογισμικού (GeneRunner) που επέτρεπε τη διάκριση και παραμετροποίηση της έντασης του σήματος που εκπεμπόταν από το προ εξέταση δείγμα με την ένταση του σήματος που εκπεμπόταν από το δείκτη. Για το σκοπό αυτό το πήκτωμα αγαρόζης φωτογραφήθηκε μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή και η φωτογραφία αναλύθηκε με ειδικό πρόγραμμα.

### 3.4 Στατιστική Ανάλυση

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε αρχικά ανά φυλή και περιελάμβανε γενετική ανάλυση και συσχέτιση μεταξύ μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών και δείκτη πολυδυμίας, ενώ ακολούθησε ανάλυση ξεχωρίζοντας τα δείγματα κάθε φυλής ανά δειγματοληψία, η οποία περιελάμβανε τα ίδια στάδια.

Η δεύτερη ανάλυση ανά δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε προκειμένου να διαπιστωθεί εάν υπεισέρχεται επίδραση του φαινομένου της διαστρωμάτωσης (stratification). Διαστρωμάτωση σημαίνει ότι τα δεδομένα χωρίζονται σε υποομάδες (strata). Έτσι στην παρούσα μελέτη εξετάζουμε ξανά τα δείγματα ανά φυλή αλλά και ανά έτος δειγματοληψίας, προκειμένου να δούμε εάν ο παράγοντας δειγματοληψία επηρεάζει τα αποτελέσματα.

#### 3.4.1. Γενετική Ανάλυση

Κατά την γενετική ανάλυση εξετάσθηκε κατά πόσο οι αλληλομορφικές και γονοτυπικές συχνότητες διαφοροποιούνται μεταξύ των δύο φυλών, αλλά και μεταξύ των δύο υποσυνόλων που δημιουργήθηκαν εντός της εκάστοτε φυλής από τις διαφορετικές δειγματοληψίες, η ισορροπία Hardy-Weinberg και η ύπαρξη ανισορροπίας σύνδεσης (Linkage disequilibrium).

Ο νόμος ή αρχή των Hardy-Weinberg αποτελεί θεμελιώδη έννοια στη γενετική των πληθυσμών και διατυπώθηκε το 1908 από τον Άγγλο μαθηματικό Hardy και τον Γερμανό γιατρό Weinberg, ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλον. Σύμφωνα με αυτόν σε ένα μεγάλο κλειστό πληθυσμό στον οποίο οι συζεύξεις γίνονται τυχαία και στον οποίο δεν συμβαίνει ούτε μεταλλαγή ούτε επιλογή οι συχνότητες των αλληλομόρφων και των γονοτύπων παραμένουν σταθερές από γενεά σε γενεά.

Η σημασία του νόμου των Hardy-Weinberg, έγκειται στο γεγονός ότι επιτρέπει τη σύγκριση στοιχείων που προκύπτουν από γενετικές αναλύσεις. Χρησιμοποιείται σε κάθε μελέτη ανάλυσης πληθυσμιακών δεδομένων. Προκειμένου να ισχύει ο νόμος των Hardy-Weinberg πρέπει το μέγεθος του πληθυσμού να είναι άπειρο ή πρακτικά άπειρο,

τα άτομα να συζευγνύονται μεταξύ τους τυχαία, δηλαδή ο πληθυσμός να είναι παμμεικτικός. Επιπλέον θα πρέπει όλα τα αλληλόμορφα να έχουν τις ίδιες πιθανότητες να μεταβιβαστούν στους απογόνους και να μην υπάρχει είσοδος νέων γονιδίων από κάποια εξωτερική πηγή ή από κάποια μετάλλαξη. Σπάνια στους φυσικούς πληθυσμούς όμως, δεν υπάρχουν παράγοντες που να προκαλούν παρεκκλίσεις από την ισορροπία αυτή.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η γονοτυπική σύνθεση

$$p^2 (RR) : 2pq (Rr) : q^2 (rr)$$

εκφράζει μία κατάσταση γενετικής ισορροπίας η οποία διατηρείται από γενεά σε γενεά. Όταν η ισορροπία αυτή διαταραχθεί, ο πληθυσμός τείνει να επανέλθει σε ισορροπία η οποία επιτυγχάνεται συνήθως έπειτα από μία γενεά τυχαίων συζεύξεων.

Προκειμένου να αξιολογηθεί αξιόπιστα η απόκλιση των γονοτυπικών συχνοτήτων που έχει παρατηρηθεί από τις θεωρητικά αναμενόμενες συχνότητες τους υπολογίζονται πρώτα οι γονιδιακές συχνότητες από το δείγμα του πληθυσμού. Από τις συχνότητες αυτές υπολογίζονται ακολούθως οι αναμενόμενες (απόλυτες) γονοτυπικές συχνότητες, οι οποίες κατόπιν συγκρίνονται με αυτές οι οποίες έχουν παρατηρηθεί και οι αποκλίσεις οι οποίες προκύπτουν ελέγχονται για στατιστική σημαντικότητα με τη δοκιμασία  $\chi^2$ .

Επιπλέον εξετάστηκε κατά πόσο διαφοροποιούνται οι αλληλομορφικές συχνότητες μεταξύ των φυλών ή μεταξύ των υποπληθυσμών εντός της ίδιας φυλής αλλά και ο τρόπος με τον οποίο τα αλληλόμορφα αυτά συνδυάζονται προκειμένου να παράγουν τους γονότυπους, δηλαδή εάν διαφοροποιούνται και οι γονοτυπικές συχνότητες.

Η ανισορροπία σύνδεσης (Linkagedisequilibrium) εξετάστηκε προκειμένου να εξακριβωθεί εάν υπάρχει κάποιου είδους συσχέτιση μεταξύ των γονοτύπων των πολυμορφισμών. Εάν παραδείγματος χάριν βρεθεί ότι δύο πολυμορφισμοί βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης αμέσως υποδηλώνεται ότι υπάρχει κάποιου είδους αλληλεξάρτησης των γονοτύπων για τους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς.

### **3.4.2. Συσχέτιση μεταξύ Μονονουκλεοτιδικών Πολυμορφισμών και Δείκτη Πολυδυμίας**

Η ανάλυση διενεργήθηκε ανά φυλή και περιελάμβανε την εφαρμογή ενός μικτού στατιστικού προτύπου με ανεξάρτητη μεταβλητή το Δείκτη Πολυδυμίας, εξαρτημένες μεταβλητές το γονότυπο ανά γονιδιακό τόπο (G1, G4, G8, B2, B4), τον αριθμό της γαλακτικής περιόδου, τον μήνα τοκετού, το μέγεθος της τοκετοομάδας και τυχαία επίδραση το ζώο (εντός της φυλής), λαμβάνοντας υπόψη την αυτοσυσχέτιση των υπολοίπων λόγω επαναλαμβανόμενων αποδόσεων ανά ζώο. Η ανάλυση έγινε με το `proc mixed` στο SAS (version 9.1). Ο αριθμός των παρατηρήσεων για το Δείκτη

Πολυδυμίας της φυλής Χίου ανήλθε σε 189 ενώ της Καραγκούνικης φυλής σε 259. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάστηκαν με τον μέσο όρο ελαχίστων τετραγώνων.

Υπολογίσθηκαν οι προσθετική δράση και επίδραση κυριαρχίας των αλληλομόρφων για κάθε πολυμορφισμό. Οι τιμές της προσθετικής δράσης των αλληλομόρφων υπολογίζονται από τον ακόλουθο τύπο (1):

$$(a) = \frac{\mu_{AA} - \mu_{GG}}{2} \quad (1)$$

ενώ οι τιμές της επίδρασης κυριαρχίας (αλληλεπίδραση αλληλομόρφων) στον ίδιο γονιδιακό τόπο δηλαδή η σύγκριση των ετεροζυγωτών με τον μέσο όρο των ομοζυγωτών ατόμων δίνονται από τον ακόλουθο τύπο (2):

$$(d) = \mu_{AG} - \frac{\mu_{AA} - \mu_{GG}}{2} \quad (2)$$

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Genepop (version 4.0) (Raymond and Rousset, 1995).

## **4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

## 4.1. Γενετική Ανάλυση

### 4.1.1. Σύνολο δειγμάτων

Στον Πίνακα 4.1.1.1. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης ανά φυλή.

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό G7, αυτός έχει αποκλεισθεί από την μελέτη ως μονομορφικός.

Για τους πολυμορφισμούς G1, G4, G8 ισχύει ότι μεταξύ των δύο φυλών παρατηρείται έντονη διαφοροποίηση στη συχνότητα των αλληλομόρφων ( $p < 0.05$ ). Όμως για τους υπόλοιπους πολυμορφισμούς (B2 και B4) δεν παρατηρείται διαφορά στις αλληλομορφικές συχνότητες μεταξύ των δύο φυλών ( $p > 0.05$ ).

Όμοια όσον αφορά τις γονοτυπικές συχνότητες και το αν αυτές διαφοροποιούνται μεταξύ των δύο φυλών από τον Πίνακα 4.1.1.1. γίνεται φανερό ότι για τους πολυμορφισμούς G1, G4 και G8 παρατηρείται έντονη διαφοροποίηση γονοτυπικών συχνοτήτων μεταξύ της Χιώτικης και της Καραγκούνικης φυλής ( $p < 0.05$ ). Αντίθετα για τους πολυμορφισμούς B2 και B4 δεν φαίνεται να ισχύει κάτι αντίστοιχο ( $p > 0,05$ ).

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό G1 τόσο τα άτομα της φυλής Χίου όσο και τα άτομα της Καραγκούνικης φυλής βρίσκονται σε ισορροπία ( $p > 0.05$ ). Για τον πολυμορφισμό G4 τα άτομα της φυλής Χίου βρίσκονται σε ισορροπία, σε αντίθεση με τα άτομα της Καραγκούνικης φυλής τα οποία βρίσκονται σε ανισορροπία. Επιπλέον τα άτομα της φυλής Χίου βρίσκονται σε ανισορροπία και για τους πολυμορφισμούς G8 και B4 ενώ τα άτομα της Καραγκούνικης φυλής βρίσκονται σε ανισορροπία για τους πολυμορφισμούς G4 και B2.

Συνολικά παρατηρείται ότι, οι δύο φυλές διαφοροποιούνται για τις αλληλομορφικές συχνότητες και συνεπώς και για τις γονοτυπικές συχνότητες.

Πίνακας 4.1.1.1. Αλληλομορφικές και γονοτυπικές συχνότητες των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) ανά φυλή και εξέταση ισορροπίας Hardy – Weinberg, μεταξύ των δύο φυλών.  $P_A$  επίπεδο σημαντικότητας στατιστικής διαφοράς αλληλομόρφων,  $P_G$  επίπεδο σημαντικότητας στατιστικής διαφοράς γονοτύπων,  $P_{X(HW)}$  και  $P_{K(HW)}$  επίπεδο σημαντικότητας απόκλισης από την ισορροπία Hardy – Weinberg μεταξύ των δύο φυλών (Χίου – καραγκούνικης αντίστοιχα).

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ (SNPs)	Συχνότητες Αλληλομόρφων				$P_A$	Αριθμός Γονοτύπων						$P_G$	Hardy - Weinberg	
	ΧΙΟΥ		ΚΑΡΑΓΚ/ΚΗ			ΧΙΟΥ			ΚΑΡΑΓΚ/ΚΗ				ΧΙΟΥ	ΚΑΡΑΓΚ/ΚΗ
	p	q	p	q		(AA)	(GA)	(GG)	(AA)	(GA)	(GG)		$P_{X(HW)}$	$P_{K(HW)}$
<b>G1</b>	(A)	(G)	(A)	(G)	<0,001	(AA)	(GA)	(GG)	(AA)	(GA)	(GG)	<0,001	0,147	1,000
	0,239	0,761	0,026	0,974		8	28	56	0	5	91			
<b>G4</b>	(A)	(G)	(A)	(G)	0,007	(AA)	(GA)	(GG)	(AA)	(GA)	(GG)	0,01	0,772	0,005
	0,234	0,766	0,125	0,875		4	35	53	5	14	77			
<b>G8</b>	(C)	(T)	(C)	(T)	<0,001	(CC)	(CT)	(TT)	(CC)	(CT)	(TT)	<0,001	<0,001	0,345
	0,706	0,293	0,88	0,119		60	10	22	73	23	0			
<b>B2</b>	(C)	(T)	(C)	(T)	0,376	(CC)	(CT)	(TT)	(CC)	(CT)	(TT)	0,434	0,49	<0,001
	0,652	0,348	0,698	0,302		37	46	9	59	16	21			
<b>B4</b>	(G)	(T)	(G)	(T)	0,412	(GG)	(GT)	(TT)	(GG)	(GT)	(TT)	0,438	0,018	1,000
	0,946	0,0543	0,922	0,078		84	6	2	81	15	0			
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>					<0,001							<0,001		



Η εξέταση της ανισοροπίας σύνδεσης (LinkageDisequilibrium) έδειξε ότι για τα άτομα της φυλής Χίου παρατηρείται ανισοροπία σύνδεσης μεταξύ των πολυμορφισμών G1 και B2, G8 και B2. Για τα άτομα της Καραγκούνικης φυλής παρατηρήθηκε ότι οι G4 και G8, G4 και B2, G8 και B2 βρίσκονται σε ανισοροπία σύνδεσης, γεγονός το οποίο υποδηλώνει κάποιου είδους αλληλεξάρτησης των γονοτύπων για τους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς (Πίνακας 4.1.1.2.).

**Πίνακας 4.1.1.2. Δοκιμασία γενετικής ανισοροπίας σύνδεσης των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) των γονιδίων GDF9 και BMP15.**

ΦΥΛΗ	ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ	ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ	p
Χίου	<b>G1</b>	<b>G4</b>	<b>&lt;0,001</b>
Χίου	G1	G8	0,411
Χίου	G4	G8	0,118
<b>Χίου</b>	<b>G1</b>	<b>B2</b>	<b>0,03</b>
Χίου	G4	B2	0,293
<b>Χίου</b>	<b>G8</b>	<b>B2</b>	<b>0,004</b>
Χίου	G1	B4	0,46
Χίου	G4	B4	0,411
Χίου	G8	B4	0,087
Χίου	B2	B4	0,052
Καραγκούνικη	G1	G4	1,00
Καραγκούνικη	G1	G8	0,333
<b>Καραγκούνικη</b>	<b>G4</b>	<b>G8</b>	<b>0,016</b>
Καραγκούνικη	G1	B2	0,821
<b>Καραγκούνικη</b>	<b>G4</b>	<b>B2</b>	<b>0,004</b>
<b>Καραγκούνικη</b>	<b>G8</b>	<b>B2</b>	<b>0,005</b>
Καραγκούνικη	G1	B4	1,00
Καραγκούνικη	G4	B4	0,682
Καραγκούνικη	G8	B4	0,759
Καραγκούνικη	B2	B4	0,783

#### 4.1.2. Ανάλυση ανά δειγματοληψία

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 4.1.2.1.) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης των δειγμάτων της φυλής Χίου, ύστερα από τον διαχωρισμό τους ανάλογα με την χρονολογία της δειγματοληψίας. Με **Δείγμα 1** συμβολίζονται τα δείγματα που συλλέχθηκαν το 2007 και με **Δείγμα 2** τα δείγματα που συλλέχθηκαν το 2005.

Σχετικά με τις συχνότητες των αλληλομόρφων μεταξύ των δύο δειγμάτων της φυλής Χίου, από τον Πίνακα 4.1.1.3., παρατηρείται ότι διαφοροποιούνται για τους πολυμορφισμούς G8, B2 και B4. Για τους υπόλοιπους πολυμορφισμούς, G1 και G4, δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση.

Σχετικά με τις γονοτυπικές συχνότητες, αυτές διαφοροποιούνται μεταξύ των δύο δειγμάτων. Αναλυτικότερα διαφοροποιούνται για τους πολυμορφισμούς G8, B2 και B4, ενώ για τους πολυμορφισμούς G1 και G4 δεν παρατηρείται διαφοροποίηση.

Όσον αφορά την ισορροπία Hardy – Weinberg αναφέρονται τα εξής: για τους πολυμορφισμούς G1 και G4, τα **Δείγμα 1** και **Δείγμα 2** βρίσκονται σε ισορροπία. Για τους πολυμορφισμούς όμως G8 και B2, μόνο το **Δείγμα 1** βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg, ενώ το **Δείγμα 2** βρίσκεται σε ανισορροπία. Τέλος για τον πολυμορφισμό B4 το δείγμα **Δείγμα 1** βρίσκεται σε ισορροπία. Ο δείκτης σημαντικότητας απόκλισης από την ισορροπία Hardy-Weinberg όσο αφορά το **Δείγμα 2** είναι κενό διότι βρέθηκαν μόνο γονότυποι GG (μονομορφικό).

Πίνακας 4.1.2.1. Αλληλομορφικές και γονοτυπικές συχνότητες των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) ανά δείγμα εντός της φυλής Χίου, εξέταση ισορροπίας Hardy – Weinberg.  $P_A$  επίπεδο σημαντικότητας στατιστικής διαφοράς αλληλομόρφων,  $P_G$  επίπεδο σημαντικότητας στατιστικής διαφοράς γονοτύπων,  $P_{\Delta 1(HW)}$  και  $P_{\Delta 2(HW)}$  επίπεδο σημαντικότητας απόκλισης των δύο δειγμάτων (Δείγμα 1 και Δείγμα 2 αντίστοιχα) από την ισορροπία Hardy – Weinberg.

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ (SNPs)	Συχνότητες Αλληλομόρφων				$P_A$	Συχνότητες Γονοτύπων						$P_G$	Hardy - Weinberg	
	ΔΕΙΓΜΑ 1		ΔΕΙΓΜΑ 2			ΔΕΙΓΜΑ 1			ΔΕΙΓΜΑ 2				ΔΕΙΓΜΑ 1	ΔΕΙΓΜΑ 2
	p	q	p	q		(AA)	(GA)	(GG)	(AA)	(GA)	(GG)		$P_{\Delta 1(HW)}$	$P_{\Delta 2(HW)}$
<b>G1</b>	(A)	(G)	(A)	(G)	0,393	(AA)	(GA)	(GG)	(AA)	(GA)	(GG)	0,43	0,71	0,06
	0,265	0,735	0,209	0,791		4	18	27	4	10	29			
<b>G4</b>	(A)	(G)	(A)	(G)	0,3	(AA)	(GA)	(GG)	(AA)	(GA)	(GG)	0,29	1,0	1,0
	0,265	0,735	0,198	0,802		3	20	26	1	15	27			
<b>G8</b>	(C)	(T)	(C)	(T)	<0,001	(CC)	(CT)	(TT)	(CC)	(CT)	(TT)	<0,001	0,09	<0,001
	0,888	0,112	0,477	0,523		40	7	2	19	3	21			
<b>B2</b>	(C)	(T)	(C)	(T)	<0,001	(CC)	(CT)	(TT)	(CC)	(CT)	(TT)	<0,001	1,0	0,006
	0,806	0,194	0,477	0,523		32	15	2	5	31	7			
<b>B4</b>	(G)	(T)	(G)	(T)	0,002	(GG)	(GT)	(TT)	(GG)	(GT)	(TT)	0,006	0,06	-
	0,898	0,102	1,0	0,0		41	6	4	43	0	0			
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>					<0,001							<0,001		

Στον Πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 4.1.2.2.) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης των δειγμάτων της Καραγκούνικης φυλής, ύστερα από τον διαχωρισμό τους ανάλογα με την χρονολογία της δειγματοληψίας. Με **Δείγμα 1** συμβολίζονται τα δείγματα που συλλέχθηκαν το 2009 και με **Δείγμα 2** τα δείγματα που συλλέχθηκαν το 2005.

Σχετικά με τις συχνότητες των αλληλομόρφων μεταξύ των δύο δειγμάτων της Καραγκούνικης φυλής από τον Πίνακα 4.1.2.2. γίνεται φανερό ότι τα δύο υποσύνολα διαφοροποιούνται για τους πολυμορφισμούς G4 και B2. Για τους υπόλοιπους πολυμορφισμούς, δηλαδή τους G1, G8 και B4 δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση.

Επιπλέον εξετάστηκε ο τρόπος με τον οποίο συνδυάζονται τα αλληλόμορφα προκειμένου να παράγουν τους γονότυπους, δηλαδή κατά πόσο οι γονοτυπικές συχνότητες διαφοροποιούνται μεταξύ των δύο δειγμάτων. Έτσι λοιπόν οι γονοτυπικές συχνότητες μεταξύ των δύο υποσυνόλων διαφοροποιούνται για τους πολυμορφισμούς G4 και B2, ενώ για τους πολυμορφισμούς G1, G8 και B4 δεν παρατηρείται διαφοροποίηση.

Όσον αφορά τους πολυμορφισμούς G8 και B4, τα δύο υποσύνολα **Δείγμα 1** και **Δείγμα 2** βρίσκονται σε ισορροπία. Για τους πολυμορφισμούς όμως G4 μόνο το **Δείγμα 1** βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg, ενώ το **Δείγμα 2** βρίσκεται σε ανισορροπία. Όσον αφορά τον πολυμορφισμό G1 το υποσύνολο **Δείγμα 2** βρίσκεται σε ισορροπία. Τέλος για τον πολυμορφισμό B2 και τα δύο δείγματα βρίσκονται σε ανισορροπία.

Πίνακας 4.1.2.1. Αλληλομορφικές και γονοτυπικές συχνότητες των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) ανά δείγμα εντός της Καραγκούνικης φυλής, εξέταση ισορροπίας Hardy – Weinberg.  $P_A$  επίπεδο σημαντικότητας στατιστικής διαφοράς αλληλομόρφων,  $P_G$  επίπεδο σημαντικότητας στατιστικής διαφοράς γονοτύπων,  $P_{\Delta 1(HW)}$  και  $P_{\Delta 2(HW)}$  επίπεδο σημαντικότητας απόκλισης μεταξύ των δειγμάτων (Δείγμα 1 και Δείγμα 2 αντίστοιχα) από την ισορροπία Hardy – Weinberg.

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ (SNPs)	Συχνότητες Αλληλομόρφων				$P_A$	Συχνότητες Γονοτύπων						$P_G$	Hardy - Weinberg	
	ΔΕΙΓΜΑ 1		ΔΕΙΓΜΑ 2			ΔΕΙΓΜΑ 1			ΔΕΙΓΜΑ 2				ΔΕΙΓΜΑ 1	ΔΕΙΓΜΑ 2
	p	q	p	q		(AA)	(GA)	(GG)	(AA)	(GA)	(GG)		$P_{\Delta 1(HW)}$	$P_{\Delta 2(HW)}$
<b>G1</b>	(A)	(G)	(A)	(G)	0,196	(AA)	(GA)	(GG)	(AA)	(GA)	(GG)	0,19	-	1,0
	0,01	0,99	0,043	0,957		0	1	49	0	4	42			
<b>G4</b>	(A)	(G)	(A)	(G)	<0,001	(AA)	(GA)	(GG)	(AA)	(GA)	(GG)	<0,001	0,21	0,01
	0,22	0,78	0,02	0,978		4	14	32	1	0	45			
<b>G8</b>	(C)	(T)	(C)	(T)	0,5	(CC)	(CT)	(TT)	(CC)	(CT)	(TT)	0,47	1,0	0,57
	0,9	0,1	0,859	0,141		40	10	0	33	13	0			
<b>B2</b>	(C)	(T)	(C)	(T)	<0,001	(CC)	(CT)	(TT)	(CC)	(CT)	(TT)	<0,001	0,03	0,03
	0,970	0,03	0,402	0,598		48	1	1	11	15	20			
<b>B4</b>	(G)	(T)	(G)	(T)	1,0	(GG)	(GT)	(TT)	(GG)	(GT)	(TT)	1,0	1,0	1,0
	0,92	0,08	0,924	0,076		42	8	0	39	7	0			
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>					<0,001							0,001		

## 4.2. Ανάλυση συσχέτισης μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών και δείκτη πολυδυμίας

### 4.2.1. Σύνολο δειγμάτων

#### 4.2.1.1. Φυλή Χίου

Στον Πίνακα 4.2.1.1.1. που ακολουθεί παρουσιάζονται οι μέσοι όροι ελαχίστων τετραγώνων του Δείκτη Πολυδυμίας με το τυπικό σφάλμα ( $\mu \pm SE_{\mu}$ ), η προσθετική δράση των αλληλομόρφων ( $\alpha$ ) και η επίδραση κυριαρχίας ( $d$ ) όσον αφορά την φυλή Χίου. Από τα στοιχεία του Πίνακα προκύπτει ότι οι διαφορετικοί γονότυποι εκάστου πολυμορφισμού παρουσιάζουν και διαφορετικό δείκτη πολυδυμίας.

Αναλυτικότερα, για τον πολυμορφισμό G1, παρατηρείται ότι τα ομοζυγωτά άτομα εμφανίζουν υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας από αυτόν των ετεροζυγωτών. Τα άτομα με γονότυπο AA παρουσιάζουν δείκτη πολυδυμίας 2,25, ενώ τα άτομα με γονότυπο GG παρουσιάζουν 1,55. Τα ετεροζυγωτά άτομα (GA) είναι αυτά που παρουσιάζουν τον μικρότερο δείκτη πολυδυμίας με τιμή που φτάνει το 1,40. Η προσθετική δράση του αλληλομόρφου A βρέθηκε στατιστικώς σημαντική και αυξάνει τον δείκτη πολυδυμίας κατά 0,345. Αντίθετα όμως η συνύπαρξη των αλληλομόρφων G και A οδηγεί σε μείωση του δείκτη κατά 0,5 και είναι στατιστικώς σημαντική.

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό G4, παρατηρείται ότι ο δείκτης πολυδυμίας των ετεροζυγωτών είναι υψηλότερος από αυτόν των ομοζυγωτών. Έτσι λοιπόν άτομα με γονότυπο AA ή GG παρουσιάζουν δείκτη πολυδυμίας 1,2 και 1,84 αντίστοιχα, ενώ τα ετεροζυγωτά άτομα (GA) παρουσιάζουν τον υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας (2,17). Η επίδραση κυριαρχίας αυξάνει τον δείκτη κατά 0,65 (στατιστικώς σημαντικό) ενώ η προσθετική δράση του A αλληλομόρφου βρέθηκε ότι αυξάνει τον δείκτη κατά 0,32 αλλά αυτό δεν είναι στατιστικώς σημαντικό.

Για τον πολυμορφισμό G8, ισχύει και εδώ, όπως και στον προηγούμενο πολυμορφισμό, ότι τα ετεροζυγωτά άτομα είναι αυτά με τον μεγαλύτερο δείκτη πολυδυμίας (2,02) έναντι των ομοζυγωτών. Όταν τα δύο αλληλόμορφα συνυπάρχουν ο δείκτης αυξάνεται κατά 0,42 ενώ δεν στάθηκε δυνατό να ανιχνευθεί στατιστικά η αρνητική προσθετική δράση των αλληλομόρφων (-0,003).

Ο πολυμορφισμός B2 φαίνεται να παρουσιάζει παρόμοια αποτελέσματα. Τα ετεροζυγωτά και εδώ παρουσιάζουν υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας (1,88) σε σχέση με αυτόν των ομοζυγωτών. Η προσθετική δράση δεν βρέθηκε να είναι στατιστικώς σημαντική, ενώ η επίδραση κυριαρχίας είναι στατιστικώς σημαντική και αυξάνει τον δείκτη πολυδυμίας κατά 0,22.

Τέλος για τον πολυμορφισμό B4 ο δείκτης πολυδυμίας βρέθηκε και εδώ ελαφρά υψηλότερος σε σχέση με των ομοζυγωτών όμως τόσο η προσθετική δράση όσο και η επίδραση κυριαρχίας δεν βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές.

**Πίνακας 4.2.1.1.1. Φυλή Χίου: Μέσοι όροι ελαχίστων τετραγώνων του Δείκτη Πολυδυμίας ( $\mu \pm SE_{\mu}$ ) για τους πολυμορφισμούς των γονιδίων GDF9 και BMP15. (α) προσθετική δράση αλληλομόρφων, (d) επίδραση κυριαρχίας. Μέσοι όροι με διαφορετικούς δείκτες διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0.05$ ). \* $p: \leq 0.05$ , \*\* $p: \leq 0.01$ , \*\*\* $p: \leq 0.001$ , NS: Non significant.**

G1			G4			G8			B2			B4		
Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$
AA	10	2,25 $\pm$ 0,23(α)	AA	5	1,2 $\pm$ 0,35(α)	CC	133	1,6 $\pm$ 0,13(α)	CC	84	1,70 $\pm$ 0,14(α)	GG	161	1,69 $\pm$ 0,11(α)
GA	62	1,40 $\pm$ 0,19(β)	GA	70	2,17 $\pm$ 0,15(β)	CT	22	2,02 $\pm$ 0,18(β)	CT	87	1,88 $\pm$ 0,15(α)	GT	17	1,89 $\pm$ 0,19(α)
GG	117	1,55 $\pm$ 0,17(αβ)	GG	114	1,84 $\pm$ 0,16(αβ)	TT	34	1,59 $\pm$ 0,16(αγ)	TT	18	1,62 $\pm$ 0,19(α)	TT	11	1,62 $\pm$ 0,22(α)
a		0,345 $\pm$ 0,15*	a		0,32 $\pm$ 0,2(NS)	a		-0,003 $\pm$ 0,066(NS)	a		0,043 $\pm$ 0,086(NS)	a		0,03 $\pm$ 0,101(NS)
d		-0,5 $\pm$ 0,19**	d		0,65 $\pm$ 0,22**	d		0,42 $\pm$ 0,151**	d		0,22 $\pm$ 0,11*	d		0,23 $\pm$ 0,18(NS)

#### 4.2.1.2.Καραγκούνικη Φυλή

Στον Πίνακα 4.2.1.2.1. που ακολουθεί παρουσιάζονται οι μέσοι όροι ελαχίστων τετραγώνων δείκτη πολυδυμίας με το τυπικό σφάλμα ( $\mu \pm SE_{\mu}$ ) καθώς και η προσθετική δράση των αλληλομόρφων (a) και η επίδραση κυριαρχίας (d) όσον αφορά την Καραγκούνικη φυλή.

Από τα στοιχεία του Πίνακα παρατηρείται ότι για τον πολυμορφισμό G1 τα άτομα που δεν είναι φορείς του πολυμορφισμού εμφανίζουν μεγαλύτερο δείκτη πολυδυμίας από τα άτομα που έχουν ένα αντίγραφο του A αλληλομόρφου.

Για τον G4, τα άτομα που φέρουν δύο αντίγραφα του A αλληλομόρφου παρουσιάζουν υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας από ότι τα άτομα που φέρουν ένα αντίγραφο του A αλληλομόρφου και από τα άτομα που δεν είναι φορείς του πολυμορφισμού. Η προσθετική δράση αλλά και η επίδραση κυριαρχίας δεν στάθηκε δυνατό να ανιχνευθούν στατιστικά.

Όσον αφορά τους πολυμορφισμό G8 και B4 παρατηρείται ότι τόσο τα άτομα που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό όσο και αυτά που φέρουν ένα αντίγραφο μόνο του T αλληλομόρφου παρουσιάζουν τον ίδιο δείκτη πολυδυμίας.

Τέλος για τον πολυμορφισμό B2 παρατηρείται ότι υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας παρουσιάζουν τα άτομα που δεν είναι φορείς του πολυμορφισμού ενώ χαμηλότερο δείκτη παρουσιάζουν τα άτομα που φέρουν δύο αντίγραφα του T αλληλομόρφου. Τα ετεροζυγωτά άτομα παρουσιάζουν ενδιάμεσο δείκτη πολυδυμίας. Τόσο όμως η προσθετική δράση όσο και η επίδραση κυριαρχίας των αλληλομόρφων δεν στάθηκε δυνατό να ανιχνευθούν στατιστικά.



**Πίνακας 4.2.1.2.1 Φυλή Καραγκούνικη: Μέσοι όροι ελαχίστων τετραγώνων του Δείκτη Πολυδυμίας ( $\mu \pm SE_{\mu}$ ) για τους πολυμορφισμούς των γονιδίων GDF9 και BMP15. (α) προσθετική δράση αλληλομόρφων, (d) επίδραση κυριαρχίας. Μέσοι όροι με διαφορετικούς δείκτες διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0.05$ ). \* $p: \leq 0.05$ , \*\* $p: \leq 0.01$ , \*\*\* $p: \leq 0.001$ , NS: Non significant.**

G1			G4			G8			B2			B4		
Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$
AA			AA	13	1,45 $\pm$ 0,16( $\alpha$ )	CC	199	1,12 $\pm$ 0,1	CC	185	1,45 $\pm$ 0,16( $\alpha$ )	GG	225	1,12 $\pm$ 0,1
GA	9	0,97 $\pm$ 0,17	GA	49	1,12 $\pm$ 0,11 ( $\alpha$ )	CT	60	1,1 $\pm$ 0,11	CT	31	1,12 $\pm$ 0,11 ( $\alpha$ )	GT	34	1,1 $\pm$ 0,11
GG	250	1,25 $\pm$ 0,07	GG	197	1,05 $\pm$ 0,09 ( $\alpha$ )	TT			TT	43	1,05 $\pm$ 0,09 ( $\alpha$ )	TT		
a			a		-0,05 $\pm$ 0,07(NS)	a			a		0,026 $\pm$ 0,042(NS)	a		
d			d		0,025 $\pm$ 0,099(NS)	d			d		-0,12 $\pm$ 0,1(NS)	d		

## 4.2.2. Ανάλυση ανά δειγματοληψία

### 4.2.2.1. Φυλή Χίου

Ακολούθησε ανάλυση συσχέτισης των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών με τον δείκτη πολυδυμίας ανά δειγματοληψία εντός της φυλής.

Στον Πίνακα 4.2.2.1.1. παρουσιάζονται τα στοιχεία από το **Δείγμα 1** της φυλής Χίου (δειγματοληψία 2007). Απεικονίζονται οι μέσοι όροι ελαχίστων τετραγώνων του Δείκτη Πολυδυμίας ( $\mu \pm SE_{\mu}$ ) ανά πολυμορφισμό καθώς και οι προσθετικές επιδράσεις αλλά και οι επιδράσεις κυριαρχίας των αλληλομόρφων.

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό G1 τα άτομα που παρουσιάζουν τον υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας είναι τα ομοζυγωτά άτομα που φέρουν τον πολυμορφισμό (2,91), ενώ τα άτομα που φέρουν μόνο ένα αντίγραφο του A αλληλόμορφου παρουσιάζουν μικρότερο δείκτη πολυδυμίας (1,86). Τον χαμηλότερο δείκτη έχουν τα άτομα που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό (1,15). Η προσθετική δράση του A αλληλομόρφου βρέθηκε ότι αυξάνει τον δείκτη κατά 0,88 και είναι στατιστικώς σημαντική. Η επίδραση κυριαρχίας όμως βρέθηκε αρνητική (-0,186) αλλά αυτό δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντικό.

Για τον G4 παρατηρήθηκε ότι τα άτομα που δεν είναι φορείς του πολυμορφισμού παρουσιάζουν υψηλό δείκτη, ενώ αυτός μειώνεται αναλογικά με τα αντίγραφα του A αλληλομόρφου που φέρει το άτομο. Δηλαδή άτομα που φέρουν δύο αντίγραφα του αλληλομόρφου αυτού παρουσιάζουν χαμηλότερο δείκτη από τα άτομα που φέρουν ένα αντίγραφο. Τόσο όμως η προσθετική δράση όσο και η επίδραση κυριαρχίας δεν βρέθηκαν να είναι στατιστικώς σημαντικά.

Για τους πολυμορφισμούς G8, B2 και B4 παρατηρήθηκε ότι τα ετεροζυγωτά άτομα είναι αυτά που παρουσιάζουν τον υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας, ακολουθούν τα ομοζυγωτά άτομα φορείς του πολυμορφισμού, ενώ τον μικρότερο δείκτη πολυδυμίας τον έχουν τα άτομα που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό. Και για τους τρεις πολυμορφισμούς όμως η προσθετική δράση και η επίδραση κυριαρχίας δεν βρέθηκαν να είναι στατιστικώς σημαντικά.

**Πίνακας 4.2.2.1.1. Φυλή Χίου – Δείγμα 1: Μέσοι όροι ελαχίστων τετραγώνων του Δείκτη Πολυδυμίας ( $\mu \pm SE_{\mu}$ ) για τους πολυμορφισμούς των γονιδίων GDF9 και BMP15. (α) προσθετική δράση αλληλομόρφων, (d) επίδραση κυριαρχίας. Μέσοι όροι με διαφορετικούς δείκτες διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ( $p < 0.05$ ). \* $p: \leq 0.05$ , \*\* $p: \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , NS: Non significant.**

G1			G4			G8			B2			B4		
Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- Τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$
AA	7	2,91 $\pm$ 0,38(α)	AA	4	1,07 $\pm$ 0,41(α)	CC	93	1,78 $\pm$ 0,15(α)	CC	73	1,88 $\pm$ 0,18(α)	GG	88	1,78 $\pm$ 0,16(α)
GA	37	1,86 $\pm$ 0,32(β)	GA	43	2,22 $\pm$ 0,2(α)	CT	15	2,18 $\pm$ 0,2(α)	CT	33	2,11 $\pm$ 0,18(α)	GT	17	2,08 $\pm$ 0,22(α)
GG	69	1,15 $\pm$ 0,33(βγ)	GG	66	2,63 $\pm$ 0,5(α)	TT	5	1,97 $\pm$ 0,41(α)	TT	7	1,93 $\pm$ 0,28(α)	TT	8	2,06 $\pm$ 0,26(α)
a		0,88 $\pm$ 0,31***	a		0,77 $\pm$ 0,38(NS)	a		0,09 $\pm$ 0,21(NS)	a		-0,03 $\pm$ 0,12(NS)	a		-0,14 $\pm$ 0,11(NS)
d		-0,168 $\pm$ 0,31(NS)	d		0,36 $\pm$ 0,31(NS)	d		0,31 $\pm$ 0,27(NS)	d		0,21 $\pm$ 0,15(NS)	d		0,16 $\pm$ 0,18(NS)



Στον Πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 4.2.2.1.2.) παρουσιάζονται τα στοιχεία από το **Δείγμα 2** της φυλής Χίου (δειγματοληψία 2005). Απεικονίζονται οι μέσοι όροι ελαχίστων τετραγώνων του Δείκτη Πολυδυμίας ( $\mu \pm SE_{\mu}$ ) ανά πολυμορφισμό καθώς και οι προσθετικές δράσεις αλλά και οι επιδράσεις κυριαρχίας των αλληλομόρφων.

Σχετικά με τον πολυμορφισμό G1 τα άτομα που φέρουν δύο αντίγραφα του A αλληλόμορφου χαρακτηρίζονται από υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας (1,55). Τα άτομα που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό χαρακτηρίζονται από δείκτη χαμηλότερο από αυτόν των ατόμων με γονότυπο AA (1,26) αλλά υψηλότερο από τον δείκτη των ατόμων με γονότυπο GA (0,91). Η προσθετική δράση βρέθηκε ότι αυξάνει τον δείκτη πολυδυμίας 0,144), ενώ η επίδραση κυριαρχίας είναι αρνητική (-0.5), όμως τόσο η πρώτη όσο και η δεύτερη δεν βρέθηκαν να είναι στατιστικώς σημαντικά.

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό G4, υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας παρουσιάζουν τα ετεροζυγωτά άτομα (1,73), ενώ τα άτομα με γονότυπο AA παρουσιάζουν τον χαμηλότερο δείκτη (0,57). Ο δείκτης πολυδυμίας των ατόμων που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό κυμαίνεται μεταξύ των δύο προηγούμενων (1,42). Τόσο η προσθετική δράση όσο και η επίδραση κυριαρχίας βρέθηκαν θετικές, αλλά δεν βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές.

Για τον πολυμορφισμό G8 παρατηρείται ότι τα ετεροζυγωτά άτομα παρουσιάζουν τον υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας (1,54) σε σχέση με τα άτομα που δεν είναι φορείς του πολυμορφισμού (1,11) και τα άτομα που φέρουν δύο αντίγραφα του T αλληλομόρφου (1,07). Η προσθετική δράση βρέθηκε ότι μειώνει τον δείκτη πολυδυμίας κατά 0,02 ενώ η επίδραση κυριαρχίας βρέθηκε θετική (0,45), όμως και οι δύο αυτές τιμές δεν βρέθηκαν να είναι στατιστικώς σημαντικές.

Σχετικά με τον πολυμορφισμό B2 όμως βρέθηκε ότι τα άτομα που έφεραν μόνο ένα αντίγραφο του T αλληλόμορφου και τα άτομα που δεν έφεραν καθόλου τον πολυμορφισμό B2 παρουσιάζουν τον ίδιο δείκτη πολυδυμίας (1,31-1,32). Τα άτομα που έφεραν δύο αντίγραφα του T αλληλομόρφου παρουσιάζουν χαμηλότερο δείκτη πολυδυμίας της τάξης του 1,1. Και εδώ όμως τόσο η προσθετική δράση όσο και η επίδραση κυριαρχίας δεν βρέθηκαν να είναι στατιστικώς σημαντικές.

Τέλος σχετικά με τον πολυμορφισμό B4 τα άτομα που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό παρουσιάζουν υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας (1,63) σε σχέση με τα άτομα που φέρουν δύο αντίγραφα του T αλληλομόρφου.

**Πίνακας 4.2.2.1.2. Φυλή Χίου – Δείγμα 2: Μέσοι όροι ελαχίστων τετραγώνων του Δείκτη Πολυδυμίας ( $\mu \pm SE_{\mu}$ ) για τους πολυμορφισμούς των γονιδίων GDF9 και BMP15. (α) προσθετική δράση αλληλομόρφων, (d) επίδραση κυριαρχίας. Μέσοι όροι με διαφορετικούς δείκτες διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ( $p < 0.05$ ). \* $p: \leq 0.05$ , \*\* $p: \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , NS: Non significant.**

G1			G4			G8			B2			B4		
Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$
AA	3	1,55 $\pm$ 0,47(α)	AA	1	0,57 $\pm$ 0,9(α)	CC	40	1,11 $\pm$ 0,31(α)	CC	11	1,31 $\pm$ 0,4(α)	GG	73	1,63 $\pm$ 0,26
GA	25	0,91 $\pm$ 0,47(α)	GA	27	1,73 $\pm$ 0,31(α)	CT	7	1,54 $\pm$ 0,47(α)	CT	54	1,32 $\pm$ 0,36(α)			
GG	48	1,26 $\pm$ 0,42(α)	GG	48	1,42 $\pm$ 0,3(α)	TT	29	1,07 $\pm$ 0,35(α)	TT	11	1,1 $\pm$ 0,37(α)	TT	3	0,85 $\pm$ 0,5
a		0,144 $\pm$ 0,29	a		0,42 $\pm$ 0,47	a		-0,02 $\pm$ 0,09	a		0,1 $\pm$ 0,15	a		
d		-0,5 $\pm$ 0,38	d		0,74 $\pm$ 0,54	d		0,45 $\pm$ 0,34	d		0,11 $\pm$ 0,21	d		

#### 4.2.2.2. Καραγκούνικη φυλή

Στον Πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 4.2.2.2.1.) παρουσιάζονται τα στοιχεία από το **Δείγμα 1** της Καραγκούνικης φυλής (δειγματοληψία 2009). Απεικονίζονται οι μέσοι όροι ελαχίστων τετραγώνων του Δείκτη Πολυδυμίας ( $\mu \pm SE_{\mu}$ ) ανά πολυμορφισμό καθώς και οι προσθετικές δράσεις αλλά και οι επιδράσεις κυριαρχίας των αλληλομόρφων.

Για τον πολυμορφισμό G1 άτομα που δεν είναι φορείς του πολυμορφισμού χαρακτηρίζονται από υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας (1,27) σε σχέση με τα άτομα που έφεραν ένα αντίγραφο του A αλληλομόρφου (0,89).

Σχετικά με τον πολυμορφισμό G4 τα ετεροζυγωτά άτομα χαρακτηρίζονται από υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας (1,16) σε σχέση με τα άτομα που έφεραν ένα αντίγραφο του A αλληλομόρφου (1,07) και τα άτομα που δεν έφεραν κανένα αντίγραφο (1,01). Η προσθετική δράση και η επίδραση κυριαρχίας δεν βρέθηκαν να είναι στατιστικώς σημαντικές.

Για τον πολυμορφισμό G8 βρέθηκε ότι άτομα με ένα αντίγραφο του T αλληλομόρφου έχουν υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας (1,12) σε σχέση με τα άτομα που δεν είναι φορείς του πολυμορφισμού (1,04). Το αντίθετο φαίνεται να ισχύει για τον πολυμορφισμό B4 στον οποίο παρατηρείται ότι άτομα που φέρουν ένα αντίγραφο του T αλληλομόρφου έχουν μικρότερο δείκτη πολυδυμίας (1,04) από τα άτομα που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό (1,12).

Τέλος σχετικά με τον πολυμορφισμό B2 τα άτομα που παρατηρούνται να έχουν τον υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας είναι τα ετεροζυγωτά (1,3), ακολουθούν τα άτομα με γονότυπο CC (1,11) και τέλος τα ομοζυγωτά άτομα με γονότυπο TT (0,82). Τόσο η προσθετική δράση όσο και η επίδραση κυριαρχίας δεν βρέθηκαν να είναι στατιστικώς σημαντικές.

**Πίνακας 4.2.2.2.1.Φυλή Καραγκούνικη – Δείγμα 1: Μέσοι όροι ελαχίστων τετραγώνων του Δείκτη Πολυδυμίας ( $\mu \pm SE_{\mu}$ ) για τους πολυμορφισμούς των γονιδίων GDF9 και BMP15. (α) προσθετική δράση αλληλομόρφων, (d) επίδραση κυριαρχίας. Μέσοι όροι με διαφορετικούς δείκτες διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0.05$ ). \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , NS: Non significant.**

G1			G4			G8			B2			B4		
Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$
AA			AA	12	1,07 $\pm$ 0,24(α)	CC	129	1,04 $\pm$ 0,2	CC	158	1,11 $\pm$ 0,15(α)	GG	144	1,12 $\pm$ 0,19
GA	3	0,89 $\pm$ 0,31	GA	49	1,16 $\pm$ 0,18(α)	CT	36	1,12 $\pm$ 0,2	CT	4	1,3 $\pm$ 0,29(α)	GT	21	1,04 $\pm$ 0,21
GG	162	1,27 $\pm$ 0,13	GG	104	1,01 $\pm$ 0,19(α)	TT			TT	3	0,82 $\pm$ 0,31(α)	TT		
<b>a</b>			<b>a</b>		-0,03 $\pm$ 0,07(NS)	<b>a</b>			<b>a</b>		0,154 $\pm$ 0,14(NS)	<b>a</b>		
<b>d</b>			<b>d</b>		0,12 $\pm$ 0,1(NS)	<b>d</b>			<b>d</b>		0,33 $\pm$ 0,29(NS)	<b>d</b>		



Στον Πίνακα 4.2.2.2. παρουσιάζονται τα στοιχεία από το **Δείγμα 2** της Καραγκούνικης φυλής (δειγματοληψία 2005). Απεικονίζονται οι μέσοι όροι ελαχίστων τετραγώνων του Δείκτη Πολυδυμίας ( $\mu \pm SE_{\mu}$ ) ανά πολυμορφισμό καθώς και οι προσθετικές δράσεις αλλά και οι επιδράσεις κυριαρχίας των αλληλομόρφων.

Για τον πολυμορφισμό G1 φαίνεται ότι άτομα που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό έχουν δείκτη πολυδυμίας 1,48 ενώ τα άτομα με γονότυπο GA παρουσιάζουν δείκτη χαμηλότερο (1,2).

Για τον πολυμορφισμό G4 από τον Πίνακα εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα ομοζυγωτά για τον πολυμορφισμό άτομα με γονότυπο AA έχουν υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας (1,6) σε σχέση με τα άτομα που δεν είναι φορείς του πολυμορφισμού (1,07). Το αντίθετο φαίνεται να ισχύει για τον πολυμορφισμό G8 για τον οποίο ισχύει ότι άτομα που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό έχουν υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας (1,43) σε σχέση με τα άτομα που φέρουν ένα αντίγραφο του T αλληλομόρφου (1,24). Όμως σχετικά με τον πολυμορφισμό B4 τόσο τα ετεροζυγωτά άτομα όσο και τα ομοζυγωτά μη φορείς του πολυμορφισμού έχουν τον ίδιο δείκτη πολυδυμίας (1,33).

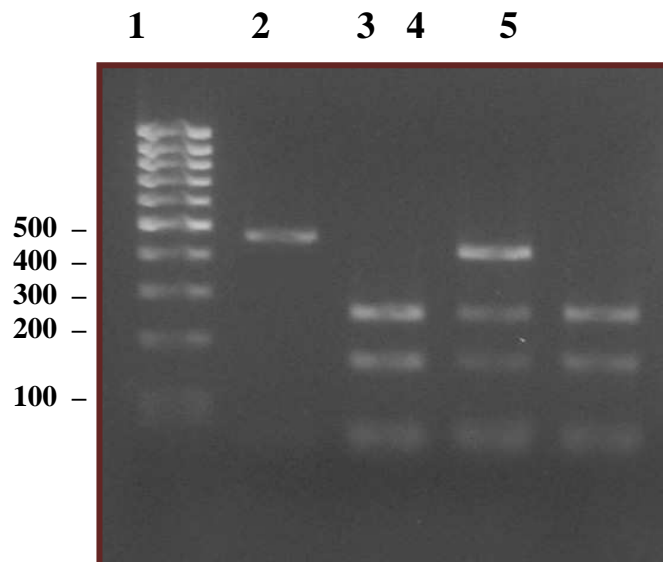
Τέλος σχετικά με τον πολυμορφισμό B2 υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας φαίνεται να έχουν τα άτομα που είναι ομοζυγωτά και δεν φέρουν τον πολυμορφισμό, με γονότυπο CC (1,5). Τα άτομα που είναι φορείς του πολυμορφισμού με γονότυπο TT παρουσιάζουν δείκτη της τάξης του 1,28, ενώ τα άτομα που φέρουν ένα αντίγραφο του T αλληλομόρφου έχουν δείκτη πολυδυμίας 1,22. Τόσο η προσθετική δράση όσο και η επίδραση κυριαρχίας δεν βρέθηκαν να είναι στατιστικά σημαντικές.

**Πίνακας 4.2.2.2.2. Φυλή Καραγκούνικη – Δείγμα 2: Μέσοι όροι ελαχίστων τετραγώνων του Δείκτη Πολυδυμίας ( $\mu \pm SE_{\mu}$ ) για τους πολυμορφισμούς των γονιδίων GDF9 και BMP15. (a) προσθετική δράση αλληλομόρφων, (d) επίδραση κυριαρχίας. Μέσοι όροι με διαφορετικούς δείκτες διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0.05$ ). \* $p$ :  $\leq 0.05$ , \*\* $p$ :  $\leq 0.01$ , \*\*\* $p$ :  $\leq 0.001$ , NS: Nonsignificant.**

G1			G4			G8			B2			B4		
Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$	Γονό- τυπος	N	$\mu \pm SE_{\mu}$
AA			AA	1	1,6 $\pm$ 0,49	CC	70	1,43 $\pm$ 0,25	CC	27	1,5 $\pm$ 0,27(a)	GG	81	1,33 $\pm$ 0,25
GA	6	1,2 $\pm$ 0,31	GA			CT	24	1,24 $\pm$ 0,28	CT	27	1,22 $\pm$ 0,27(a)	GT	13	1,33 $\pm$ 0,29
GG	88	1,48 $\pm$ 0,24	GG	93	1,07 $\pm$ 0,12	TT			TT	40	1,28 $\pm$ 0,28(a)	TT		
a			a			a			a		0,11 $\pm$ 0,06(NS)	a		
d			d			d			d		-0,17 $\pm$ 0,12(NS)	d		

### 4.3. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες της ανίχνευσης των πολυμορφισμών με PCR-RFLP ανάλυση

Εικόνα 4.3.1. Πολυμορφισμός G1



**Στήλη 1:** Δείκτηςμοριακώνβαρών (DNA 100 bpLadder, Fermentas)

**Στήλη 2:** PCR product (ζ.β. 462)

**Στήλες 3 και 5:** Φυσιολογικό άτομο με γονότυπο **GG**(ζ.β. 254, 156, 52)

**Στήλη 4:** Ετεροζυγωτό άτομο με γονότυπο **GA**(ζ.β. 410, 254, 156, 52)

### Εικόνα 4.3.2. Πολυμορφισμός G4



**Στήλη 1:** Δείκτηςμοριακώνβαρών (DNA 100 bpLadder, Fermentas)

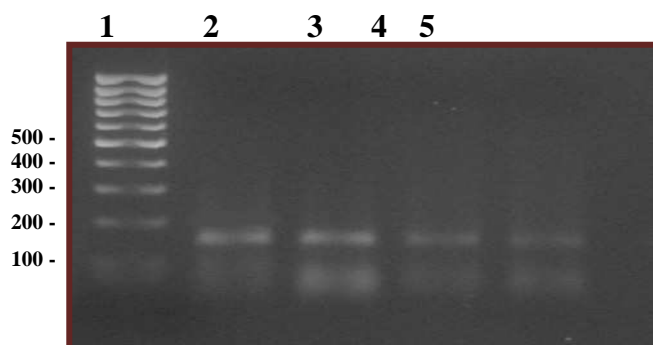
**Στήλη 2:** PCR product (ζ.β. 161)

**Στήλες 3, 4, 8, 10, 13, 14, 15:** Φυσιολογικό άτομο με γονότυπο **GG**(ζ.β. 161)

**Στήλες 5, 6, 7, 9, 11:** Ετεροζυγωτό άτομο με γονότυπο **GA** (ζ.β. 161, 131)

**Στήλη 12:** Ομοζυγωτό άτομο με γονότυπο **AA** (ζ.β. 131)

### Εικόνα 4.3.3. Πολυμορφισμός G7



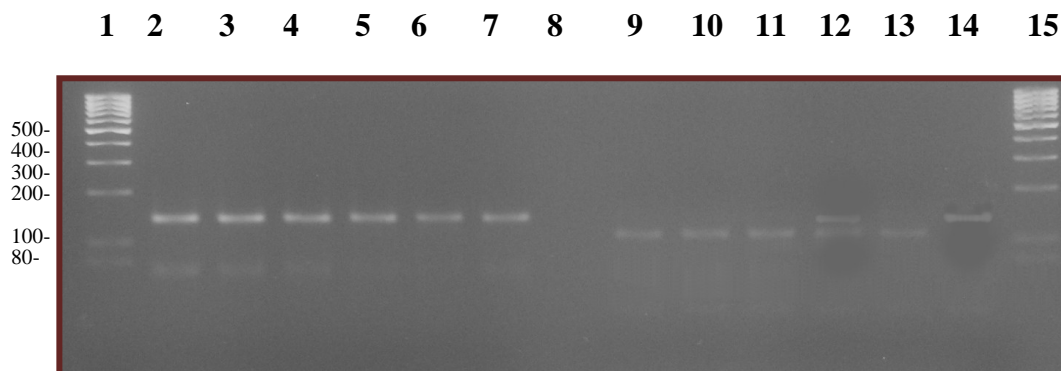
**Στήλη 1:** Δείκτηςμοριακώνβαρών (DNA 100 bpLadder, Fermentas)

**Στήλη 2:** PCR product (ζ.β. 158)

**Στήλες 3, 4, 5:** Φυσιολογικό άτομο με γονότυπο **GG**(ζ.β. 158)

Δεν βρέθηκαν ετεροζυγωτά ή ομοζυγωτά άτομα για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό.

**Εικόνα 4.3.4. Πολυμορφισμός G8**



**Στήλες 1 και 15:** Δείκτηςμοριακώνβαρών (DNA 100 bpLadder, Fermentas)

**Στήλες 2 – 7:** PCRproduct (ζ.β. 139)

**Στήλη 8:** Κενή

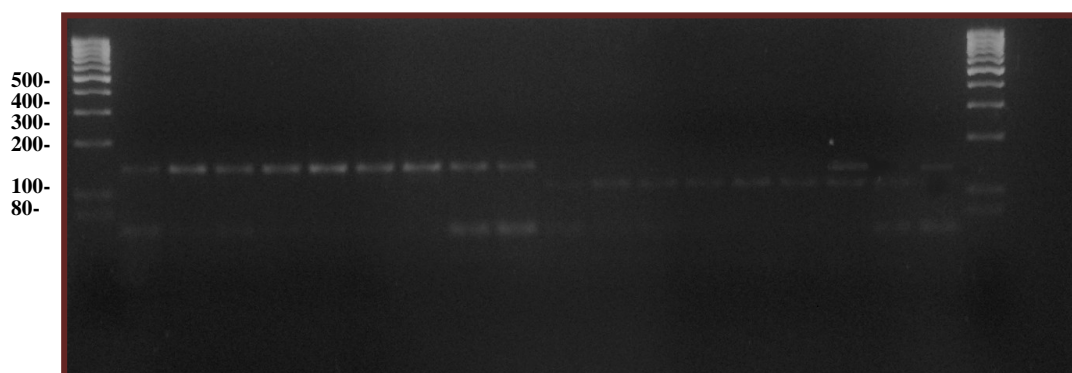
**Στήλες 9, 10, 11 και 13:** Φυσιολογικό άτομο με γονότυπο **CC**(ζ.β.109)

**Στήλη 12:** Ετεροζυγωτό άτομο με γονότυπο **CT**(ζ.β. 139, 109)

**Στήλη 14:** Ομοζυγωτό άτομο με γονότυπο **TT**(ζ.β. 139)

**Εικόνα 4.3.5. Πολυμορφισμός B2**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



**Στήλες 1 και 20:** Δείκτηςμοριακώνβαρών (DNA 100 bpLadder, Fermentas)

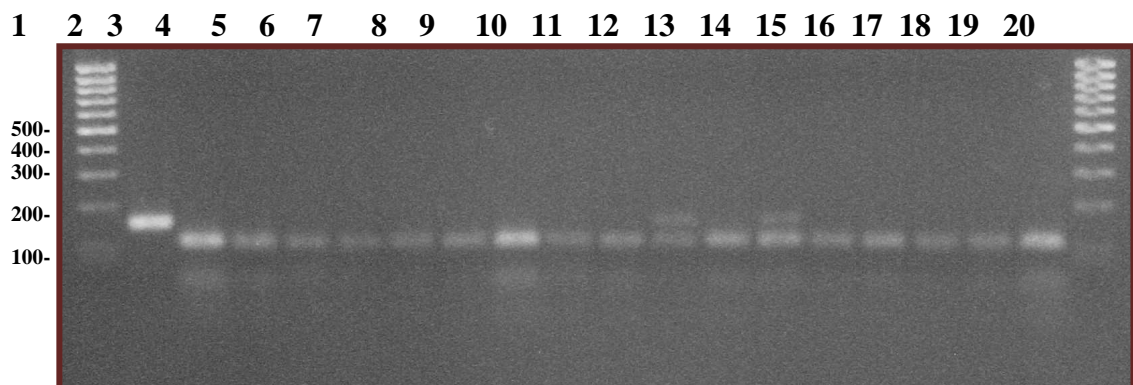
**Στήλες 2 έως 9:** PCRproduct (ζ.β. 141)

**Στήλες 11 έως 16 και 18:** Φυσιολογικά άτομα με γονότυπο **CC**(ζ.β.111)

**Στήλη 17:** Ετεροζυγωτό άτομο με γονότυπο **CT** (ζ.β. 141, 111)

**Στήλη 19:** Ομοζυγωτό άτομο με γονότυπο **TT** (ζ.β. 141)

#### Εικόνα 4.3.6. Πολυμορφισμός B4



Στήλες 1 και 20: Δείκτης μοριακών βαρών (DNA 100 bp Ladder, Fermentas)

Στήλη 2: PCR product (ζ.β. 153)

Στήλες 3 έως 11, 13 και 15 έως 19: Φυσιολογικά άτομα με γονότυπο **GG** (ζ.β. 123)

Στήλες 12 και 14: Ετεροζυγωτό άτομο με γονότυπο **GT** (ζ.β. 153, 123)

## **5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Η εμπλοκή των γονιδίων GDF9 και BMP15 στην έκφραση του δείκτη πολυδυμίας τεκμηριώνεται διεθνώς σε διάφορες φυλές προβάτων όπως οι Romney, Belclare, Cambridge, Inverdale, Hanna στη Μ. Βρετανία (Gallowayetal., 2000; Hanrahanetal., 2004), Moghani και Ghezel στο Ιράν (Barzegarietal., 2008) και η RasaAragonesa στην Ισπανία (Monteagudoetal., 2009). Τα δύο γονίδια κωδικεύουν πρωτεΐνες οι οποίες ανήκουν στην υπερικογενεία των αυξητικών μεταμορφωτικών παραγόντων β (TransformingGrowthFactor β – TGFβ). Εκφράζονται αποκλειστικά στην ωοθήκη και πιο συγκεκριμένα σε αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα τόσο στον άνθρωπο (Aaltonenetal., 1999) και στον ποντικό (Laitinenetal., 1998; Dubeetal., 1998; Jaatinenetal., 1999), όσο και στα μηρυκαστικά (βοοειδή και πρόβατα) (Bodensteineretal., 1999; Bodensteineretal., 2000). Ειδικότερα στα πρόβατα το γονίδιο GDF9 εκφράζεται ήδη κατά το στάδιο σχηματισμού των αρχέγονων ωοθυλακίων, ενώ για το γονίδιο BMP15 η έκφραση συμβαίνει πολύ αργότερα, στο στάδιο σχηματισμού των πρωτογενών ωοθυλακίων (Bodensteineretal., 1999; Bodensteineretal., 2000). Άτομα ομοζυγωτά για τους πολυμορφισμούς B2 και B4 του γονιδίου BMP15 ή που έχουν υποστεί υπερανοσοποίηση για το ίδιο γονίδιο αναφέρονται ως στείρα (Bodensteineretal., 1999; Juengeletal., 2002).

Στη χώρα μας ο αριθμός των μελετών που έχει διεξαχθεί με αντικείμενο τη μελέτη των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών στα δύο αυτά γονίδια παραμένει περιορισμένος. Σε έρευνα των Davisetal. (2005) στη φυλή Χίου, δεν ανιχνεύτηκαν πολυμορφισμοί FecX<sup>I</sup> για το BMP15, ενώ στα ίδια αποτελέσματα κατέληξε και μελέτη στο πρόβατο Φλώρινας (Μιχαηλίδης και συν., 2008). Με βάση την παρατηρούμενη έλλειψη σε εργασίες η παρούσα μελέτη προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τις σχέσεις μεταξύ μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών των γονιδίων GDF9 και BMP15 και το δείκτη πολυδυμίας, σε δύο ελληνικές φυλές προβάτων με ιδιαίτερη οικονομική σημασία, στη φυλή Χίου και στην Καραγκούνικη φυλή. Οι δύο φυλές διαφέρουν ως προς το δείκτη πολυδυμίας με την πρώτη να συγκαταλέγεται παγκοσμίως στις πολύδυμες φυλές με δείκτη 1,8 – 2,0, ενώ της δεύτερης είναι χαμηλότερος της τάξης του 1,3.

Η εξέταση για το σύνολο των δειγμάτων έδειξε διαφορές στις αλληλομορφικές συχνότητες μεταξύ των δύο φυλών με υψηλότερη συχνότητα στη φυλή Χίου για τα αλληλόμορφα A των πολυμορφισμών G1 και G4, καθώς και για το T αλληλομόρφο για τον πολυμορφισμό G8. Ενδιαφέρον παρουσιάζει εδώ η έλλειψη γονοτύπων AA (για τον πολυμορφισμό G1), TT (για τον πολυμορφισμό G8) και ο γονότυπος TT (για τον πολυμορφισμό B4), από την Καραγκούνικη φυλή. Όσον αφορά τους δύο τελευταίους πολυμορφισμούς, από τη βιβλιογραφία τα ομοζυγωτά αυτά άτομα χαρακτηρίζονται ως στείρα. Πιθανώς τέτοια άτομα μειωμένης γονιμότητας να είχαν απομακρυνθεί από το Κέντρο Γενετικής Βελτίωσης της Καρδίτσας (τεχνητή επιλογή).

Διαφορές στις αλληλομορφικές συχνότητες διαπιστώθηκαν και μεταξύ των δύο δειγμάτων ανά φυλή υποδηλώνοντας επίδραση της στρωματοποιημένης δειγματοληψίας (stratifiedsampling). Υπενθυμίζεται ότι η συλλογή των δειγμάτων



ανά φυλή πραγματοποιήθηκε σε δύο χρονικές στιγμές με μεσοδιάστημα δύο ετών για τη φυλή Χίου και τεσσάρων ετών για την Καραγκούνικη.

Σύμφωνα με την ανάλυση της γενετικής ισορροπίας (σύνολο δειγμάτων) η φυλή Χίου βρέθηκε σε ανισορροπία για τους πολυμορφισμούς G8 και B2 ενώ η Καραγκούνικη για τους G1, G8 και B4. Η εξέταση ανά δείγμα εντός εκάστης φυλής απεκάλυψε απόκλιση από τα παραπάνω. Αποκλίσεις από την ισορροπία υποδηλώνουν είτε επίδραση της διαστρωμάτωσης είτε διεξαγωγή λαθών κατά τη γονοτύπηση (Sobeletal., 2002; Hoskingetal., 2004). Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανότητες να ισχύει η δεύτερη περίπτωση, επαναλήφθηκε η διαδικασία της γονοτύπησης σε έναν αντιπροσωπευτικό αριθμό δειγμάτων.

Η περαιτέρω γενετική ανάλυση (ανισορροπίας σύνδεσης), έδειξε ότι για τη φυλή Χίου, οι πολυμορφισμοί G1 και G8 έχουν κάποιου είδους αλληλεξάρτησης με τον B2 πολυμορφισμό, ενώ για την Καραγκούνικη φυλή ο G4 βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με τους G8 και B2. Παρόμοια αποτελέσματα σχετικά με τους πολυμορφισμούς G8 και B2 έχουν αναφερθεί στις φυλές Cambridge και F-700 Belclare (Hanrahanetal., 2004).

Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκαν σχέσεις μεταξύ των πολυμορφισμών και του δείκτη πολυδυμίας για το σύνολο των δειγμάτων αλλά και ανά δείγμα.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία πολυμορφισμοί στην G1 περιοχή δε σχετίζονται με τη γονιμότητα (Hanrahanetal., 2004). Αντίθετα, στην παρούσα εργασία βρέθηκε ότι τα ομοζυγωτά άτομα (AA), για τον εν λόγω πολυμορφισμό στη φυλή Χίου, παρουσιάζουν τον υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας είτε κατά τη συνολική εξέταση είτε στην εξέταση ανά δείγμα. Τα ετεροζυγωτά άτομα (GA) εμφανίζουν τον χαμηλότερο δείκτη πολυδυμίας και στις δύο φυλές, αποτέλεσμα το οποίο είναι σε συμφωνία με την εκτιμώμενη αρνητική επίδραση κυριαρχίας. Η προσθετική δράση του A αλληλομόρφου για τη φυλή Χίου ανήλθε σε 0,345 αμνούς ανά έτος. Λόγω όμως του μικρού αριθμού των ζώων που βρέθηκαν ομοζυγωτά (AA, n=10), τα συμπεράσματα δεν μπορούν να γενικευθούν με ασφάλεια. Τυχόν σχέσεις μεταξύ πολυμορφισμών και δείκτη πολυδυμίας υπό καθεστώς γενετικής ανισορροπίας (όπως για τους πολυμορφισμούς G4 και B2) στην Καραγκούνικη φυλή δεν μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστες (Terwilligeretal., 1990; Abecasisetal., 2001) και επιπλέον ισχύουν μόνο κατά τη χρονική στιγμή της δειγματοληψίας.

Κατά τη συνολική εξέταση του πολυμορφισμού G4 για τη φυλή Χίου παρατηρήθηκε ο υψηλότερος (2,17) και ο χαμηλότερος δείκτης πολυδυμίας (1,2) για τα ετεροζυγωτά (GA) (n=70) και τα ομοζυγωτά (AA), (n=5) αντίστοιχα. Το αντίθετο φαίνεται να ισχύει για την Καραγκούνικη φυλή όπου τα ομοζυγωτά (AA), (n=13) βρέθηκαν με τον υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας (1,45) στο σύνολο των δειγμάτων. Η εξέταση όμως ανά δείγμα έδειξε για τη φυλή Χίου ότι για το πρώτο υποσύνολο (δειγματοληψία 2007) τον υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας (2,63) παρουσίαζαν τα άτομα GG (n=66), ενώ τον χαμηλότερο (1,07) τα ομοζυγωτά άτομα ως προς τον

πολυμορφισμό (AA), (n=4). Για το δεύτερο υποσύνολο (δειγματοληψία 2005) ελήφθησαν αποτελέσματα ομοιάζοντα με αυτά του συνόλου των παρατηρήσεων. Όσον αφορά την ανάλυση ανά υποσύνολο για την Καραγκούνικη φυλή αυτή έδειξε ότι για το πρώτο υποσύνολο (δειγματοληψία 2009) τον υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας (1,16) παρουσιάζουν τα ετεροζυγωτά άτομα (GA), (n=49), ενώ τον χαμηλότερο (1,01) τα άτομα με γονότυπο GG (n=104). Στο δεύτερο υποσύνολο όμως (δειγματοληψία 2005) δεν βρέθηκαν ετεροζυγωτά άτομα με γονότυπο GA. Όπως στη 1<sup>η</sup> δειγματοληψία τα GG άτομα (n=93) παρουσίαζαν και πάλι τον χαμηλότερο δείκτη πολυδυμίας (1,07).

Αναφορικά με τον G8 πολυμορφισμό είναι γνωστό ότι τα ετεροζυγωτά άτομα (CT) παρουσιάζουν υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας κατά 1,4 αμνούς έναντι των ομοζυγωτών ατόμων (CC) ενώ τα ομοζυγωτά άτομα (TT) αναφέρονται ως στείρα (Hanrahanetal., 2004). Στην παρούσα μελέτη στη φυλή Χίου βρέθηκαν ομοζυγωτά άτομα με γονότυπο TT (n= 34), παρόλα αυτά κανένα άτομο δεν καταγράφηκε ως στείρο. Άτομα μειωμένης γονιμότητα πιθανότατα απομακρύνονται από την εκτροφή υποδηλώνοντας κάποιου είδους τεχνητή επιλογή. Εάν ισχύει το σενάριο αυτό θα μπορούσε να δικαιολογηθεί και η παρατηρούμενη ανισορροπία για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό στη φυλή Χίου. Στην Καραγκούνικη φυλή δεν ανιχνεύθηκαν άτομα με αυτόν τον γονότυπο (TT). Αναφορικά με τη φυλή Χίου τα ετεροζυγωτά άτομα (CT) βρέθηκαν να έχουν τον υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας (2,02) έναντι των ομοζυγωτών CC (1,6) και των ομοζυγωτών TT (1,59) είτε κατά τη συνολική εξέταση είτε ανά υποσύνολο. Για την Καραγκούνικη φυλή τα αποτελέσματα ήταν διαφορετικά: η συνολική εξέταση έδειξε παρόμοιους δείκτες πολυδυμίας για τα ετεροζυγωτά (CT) (1,1) και τα ομοζυγωτά άτομα (CC) (1,12). Όμως κατά την εξέταση των δειγμάτων ανά υποσύνολο στο πρώτο βρέθηκε ότι τα ομοζυγωτά άτομα (CC) είχαν χαμηλότερο δείκτη πολυδυμίας (1,04) έναντι των ετεροζυγωτών (CT) (1,12), ενώ στο δεύτερο υποσύνολο βρέθηκε ότι τα ομοζυγωτά άτομα CC παρουσίαζαν υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας (1,43) από αυτόν των ετεροζυγωτών ατόμων CT (1,24). Η διαφορά αυτή οφείλεται πιθανότατα στην επίδραση της διαστρωμάτωσης.

Αναφορικά με τον πολυμορφισμό B2, από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι τα ετεροζυγωτά άτομα (CT) εμφανίζουν υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας κατά έναν αμνό από τα άτομα με γονότυπο CC, ενώ τα ομοζυγωτά άτομα TT χαρακτηρίζονται από στείριότητα (Bodensteineretal., 1999; Gallowayetal., 2000; Bodinetal., 2003; Hanrahanetal., 2004). Παρόλο που βρέθηκαν όμως άτομα ομοζυγωτά με γονότυπο TT, αυτά δεν αναφέρθηκαν ως στείρα. Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι ειδικά για τη φυλή Χίου ο πληθυσμός βρίσκεται σε γενετική ανισορροπία για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό. Αν συνυπολογισθεί και το γεγονός ότι οι G8 και B2 πολυμορφισμοί είναι σε έντονη ανισορροπία σύνδεσης, η απόκλιση από τη γενετική ισορροπία μπορεί να οφείλεται και στη δράση της τεχνητής επιλογής (απομάκρυνση ζώων μειωμένης γονιμότητας). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης για τη φυλή Χίου φαίνεται να συμφωνούν με τη βιβλιογραφία αφού τα ετεροζυγωτά άτομα με γονότυπο CT παρουσίασαν τον υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας είτε όταν εξετάστηκαν στο

σύνολό τους (1,88) είτε ανά υποσύνολο (2,11 και 1,32). Όσον αφορά την Καραγκούνικη φυλή τα αποτελέσματα διαφοροποιούνται, αφού μόνο για το πρώτο υποσύνολο (δειγματοληψία 2009) βρέθηκε υψηλότερος δείκτης πολυδυμίας για τα ετεροζυγωτά (CT) (1,3) έναντι των ομοζυγωτών ατόμων CC και TT.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα ετεροζυγωτά άτομα GT για τον B4 πολυμορφισμό παρουσιάζουν υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας (κατά 0,6 αμνούς) σε σύγκριση με τα ομοζυγωτά άτομα GG, ενώ τα ομοζυγωτά άτομα με γονότυπο TT είναι στείρα (Bodensteineretal., 1999; Gallowayetal., 2000; Bodinetal., 2003; Hanrahanetal., 2004). Λόγω του ότι ο αριθμός των ατόμων που βρέθηκαν ομοζυγωτά (TT) είναι μικρός (n= 11 (φυλή Χίου), n=0 (φυλή Καραγκούνικη)), ίσως ο συγκεκριμένος γονότυπος να έχει εξαλειφθεί λόγω τεχνητής επιλογής. Αναφορικά με τη φυλή Χίου η εξέταση στο σύνολο ή ανά δείγμα έδειξε τον υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας (1,89) για τα ετεροζυγωτά άτομα (GT). Όσον αφορά την Καραγκούνικη φυλή στο σύνολο των δειγμάτων τον υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας (1,12) είχαν τα άτομα που δεν έφεραν τον πολυμορφισμό (GG). Τα ετεροζυγωτά άτομα (GT) παρουσίαζαν χαμηλότερο δείκτη από τα άτομα με γονότυπο GG. Όταν τα δείγματα εξετάστηκαν ανά υποσύνολο βρέθηκε ότι για την δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε το 2009 τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με την εξέταση στο σύνολο των δειγμάτων, όμως στο δεύτερο υποσύνολο ο δείκτης πολυδυμίας είναι ίδιος (1,33) τόσο για τα ομοζυγωτά άτομα (GG) όσο και για τα ετεροζυγωτά άτομα (GT).

Τέτοιου είδους σχέσεις αναδεικνύουν τη σημασία της διαστρωμάτωσης στην ορθή διεξαγωγή συμπερασμάτων κατά την ανάλυση σχέσεων μεταξύ πολυμορφισμών και ποσοτικών ιδιοτήτων. Από τη βιβλιογραφία τεκμηριώνεται ότι η διαστρωμάτωση εάν δεν γίνει αντιληπτή και δε ληφθεί υπ' όψη σε αναλύσεις συσχέτισης, μπορεί να οδηγήσει σε επίπλαστες σχέσεις μεταξύ πολυμορφισμών και μελετώμενων ιδιοτήτων (DevlinandRoeder, 1999; VoightandPitchard, 2005, Freedmanetal., 2004; Marchinietal., 2004; CardonandPalmer, 2003) και αποτελεί την κύρια αιτία για τη μη επαναληπτικότητα των αποτελεσμάτων σε τέτοιου είδους πειράματα. Το φαινόμενο είναι συχνό και μοιάζει να αποτελεί μάλλον τον κανόνα, παρά την εξαίρεση (Taboretal., 2002; TerwilligerandGoring, 2000). Η επίδραση της διαστρωμάτωσης θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στις μελέτες κατά τις οποίες διενεργείται απευθείας συσχέτιση γονοτύπου – φαινοτύπου, είτε στις μελέτες στις οποίες η συσχέτιση πολυμορφισμών ή γονιδίων και μελετώμενων ιδιοτήτων γίνεται έμμεσα μέσω της χαρτογράφησης της ανισορροπίας σύνδεσης (Jorde, 2000).

Σε τέτοιου είδους αναλύσεις επιχειρείται διόρθωση της διαστρωμάτωσης με διάφορους τρόπους, είτε λαμβάνοντας υπόψη την ετερογένεια των δειγμάτων, είτε με εξέταση ανά υποσύνολο ξεχωριστά όπως στην παρούσα μελέτη (Devlinetal., 2001; PritchardandDonnelly, 2001). Αναφορικά με τις μεθόδους διόρθωσης έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι: γενωμικού ελέγχου (genomiccontrol), (Devlin και Roeder, 1999), δομημένης σχέσης (structureassociation) (Devlinetal., 2001; PritchardandDonnelly, 2001) και ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PrincipalComponentAnalysis – PCA)

(Hotelling, 1933; Jolliffe, 2002). Η εφαρμογή των μεθόδων αυτών δεν ήταν δυνατή στην παρούσα μελέτη καθώς απαιτείται μεγάλος αριθμός SNPs που καλύπτουν το γονιδίωμα και μελέτη σε προγόνους.

Αναφορικά με την επίδραση των συνδυασμένων γονοτύπων (επιστατικές επιδράσεις) για το ένα γονίδιο (GDF9) ξεχωριστά και τα δύο μαζί παρατηρήθηκαν κάποιοι συνδυασμοί όπως οι: AAGACC (n=3, ΔΠ=2,7), GGGACT (n=3, ΔΠ=2,7) και AAGGCC (n=5, ΔΠ=3,2) για το GDF9 και οι AAGGCCCT (n=5, ΔΠ=3,2) GGGACTCT (n=3, ΔΠ=2,7) και AAGACCCC (n=3, ΔΠ=2,7) για το σύνολο οι οποίοι συνδέονται με πολύ υψηλό ΔΠ (>2,6). Τα αποτελέσματα αυτά εάν και εξαιρετικά ενδιαφέροντα δεν μπορούν να γενικευτούν με ασφάλεια λόγω περιορισμένου αριθμού παρατηρήσεων και για το λόγο αυτό δεν παρουσιάζονται εδώ.

Οι συντελεστές επαναληπτικότητας για τις φυλές Χίου και Καραγκούνικη (με τη μέθοδο REML) ανήλθαν σε 0,30 και 0,09, αντίστοιχα. Ο σχετικά υψηλός συντελεστής για την πρώτη φυλή συνηγορεί και αυτός υπέρ του σενάριου ύπαρξης γονιδίων με μείζονα δράση στην έκφραση της ιδιότηταςόπως τεκμηριώνεται από τα επίπεδα των εκτιμώμενων προσθετικών και κυριαρχικών επιδράσεων. Η περαιτέρω ανάλυση της διακύμανσηςέδειξε ωστόσο ότι εάν και οι πολυμορφισμοίG1, G4 και B2 (με σειρά σημαντικότητας) εξηγούν ένα σημαντικό τμήμα της διακύμανσης για την εν λόγω ιδιότητα στη φυλή Χίου, υπάρχει ένα υπόλοιπο το οποίο οφείλεται πιθανόν στη δράση (πολλών) άλλων γονιδίων (συνήθως μικρότερης δράσης). Η υπόθεση τηςύπαρξης πολλών γονιδίων με μικρή επίδραση έκαστο στο φαινότυπο φαίνεται να ισχύει κυρίως για τη φυλή Καραγκούνικη δεδομένου ότι δεν ανιχνεύτηκαν γονίδια με μείζονα δράση. Επομένως απαιτείται περαιτέρω έρευνα με σκοπό τον εντοπισμό και τη διερεύνηση της δράσης των γονιδίων που εμπλέκονται στην έκφραση της ιδιότητας στις πολύδυμες και μη φυλές.

Τα παρόντα ευρήματα θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν στα πλαίσια ενός προγράμματος επιλογής με σκοπό την αξιοποίηση κυρίως των επιδράσεων κυριαρχίας, ιδιαίτερα στη φυλή Χίου. Ειδικότερα για τον πολυμορφισμό G1 λόγω του ότι η επίδραση κυριαρχίας προκαλεί μείωση του δείκτη πολυδυμίας κύριος στόχος του προγράμματος θα ήταν η μείωση των ετεροζυγωτών ατόμων (GA) και η αύξηση των ομοζυγωτών ατόμων (AA). Για τον πολυμορφισμό G4 θα ίσχυε το αντίθετο δεδομένου ότι τον υψηλότερο δείκτη πολυδυμίας τον παρουσιάζουν τα ετεροζυγωτά άτομα (GA), ενώ θα ήταν επιθυμητή μείωση των ομοζυγωτών ατόμων (AA). Παρόμοια και για τους G8 και B2, ο πιθανός στόχος θα ήταν αύξηση των ετεροζυγωτών ατόμων

## **6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## 6.1. Διεθνής Βιβλιογραφία

- Abecasis, G.R., Cherny, S.S., Cardon, L. 2001. The impact of genotyping error on family based analysis of quantitative traits. *European Journal of Human Genetics* 9: 130– 134.
- Alexander G., and Davies H.L., 1959. Relationship of milk production to number of lambs born or suckled. *Australian Journal of Agricultural Research* 10:720-724.
- Allen D.M., and Lamming G.E., 1961. Nutrition and reproduction in the ewe. *Journal of Agricultural Science* 56: 69-79.
- Baird DT and Cambell B.K., 1998. Follicle selection in sheep with breed differences in ovulation rate *Molecular and Cellular Endocrinology* 145: 89-95.
- Barzegari, A., Atashpaz, S., Ghabili, K., Nemati, Z., Rustaei, M., Azarbaijani, R., 2009. Polymorphisms in GDF9 and BMP15 associated with fertility and ovulation rate in Moghani and Ghezel sheep in Iran. *Reproduction in Domestic Animals* DIGITAL OBJECT IDENTIFIER (DOI) 10.1111/j.1439-0531.2008.01327.x
- Bindon B.M., and Piper L.R., 1976. Assessment of new and traditional techniques of selection for reproduction rate. In Sheep Breeding (eds G.J. Tomes, D.E. Robertson and R.J. Lightfoot). *Proceeding of the 1976 International Congress, Muresk, Western Australian Institute of Technology*, pp. 357-371.
- Bindon B.M., Piper L.M., Curtis Y.M., and Nethery R.D., 1987. Freemartins in Booroola Merino populations. *Proceedings of the Australian Society of Reproductive Biology* 17:108(Abstract).
- Bodensteiner K.J., McNatty K.P., Clay C.M., Moeller C.L., Sawyer H.R., 2000. Expression of growth and differentiation factor-9 in the ovaries of fetal sheep homozygous or heterozygous for the Inverdale prolificacy gene (FecX<sup>1</sup>). *Biology of Reproduction* 62:1479-1485.
- Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL & Sawyer HR 1999 Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biology of Reproduction* 60: 381–386.
- Bodin L, Lecerf F, Pisslelet C, SanCristobal M, Bibé B, Mulsant P., 2003. How many mutations are associated with increased ovulation rate and litter size and progeny of Lacaune meat sheep? In: *Proc. Workshop on Major genes and QTL in Sheep and Goat, Toulouse, France*, 8-11 December 2003, CD-ROM.
- Bodin, L., Elsen, J.M., Poivey, J.P., SanCristobal-Gaudy, M., Belloc, J.P., Eychenne, F., 1998. Hyper-prolificacy in the French Lacaune sheep breed a possible

- major gene. In: *Proceedings of the Sixth World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Armidale, Australia*, 27: pp. 1–14.
- Bodin, L., SanCristobal, M., Lecerf, F., Mulsant, P., Bibe, B., Lajous, D., Belloc, J.P., Eychenne, F., Amigues, Y., Elsen, J.M., 2002. Segregation of a major gene influencing ovulation in progeny of Lacaune meat sheep. *Genetics Selection Evolution*34: 447–464.
- Bradford, G.E., Quirke, J.F., Sitorus, P., Ismeth Inounu, Bess Tiesnamurti, Bell., F.L., Fletcher, I.C., Torell, D.T, 1986. Reproduction in Javanese sheep: Evidence for a gene with large effect on ovulation rate and litter size. *Journal of Animal Science*63:418-431.
- Braw-Tal R., McNatty K.P., Smith P., Heath D.A., Hudson N.L., Philips D.J., McLeod B.J., Davis G.H, 1993. Ovaries of ewes homozygous for the X-linked Inverdale gene (FecX<sup>l</sup>) are devoid of secondary and tertiary follicles but contain many abnormal structures. *Biology of Reproduction*49: 895-907.
- Bristol SK & Woodruff TK 2004 Follicle-restricted compartmentalization of transforming growth factor beta superfamily ligands in the feline ovary. *Biology of Reproduction* 70: 846–859.
- Campbell, B.K., Scaramuzzi, R.J. and Webb, R., 1995. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*49: 335-350.
- Carabatsos, M.J., Elvin, J., Matzuk, M.M.& Albertini, D.F. 1998. Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Developmental Biology* 204: 373–384.
- Cardon, L.R., Palmer, L.J. 2003. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* 361: 598–604.
- Chan, J.S.D., Robertson, H.A. and Friesen, H.G., 1976. The purification and characterization of ovine placental lactogen. *Endocrinology*98:65-76.
- Chang, H., Brown, C.W.& Matzuk, M.M. 2002 Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocrine Reviews* 23: 787–823.
- Christodoulou, V., Bampidis, V.A., Sossidou, E., Ambrosiadis, J. 2007. Evaluation of Florina (Pelagonia) sheep breed for growth and carcass traits. *Animal Feed Science and Technology*70: 239-247
- Cox, R.I., Wilson, P.A., and Mattner, P.E., 1976. *Theriogenology*6:607.
- Cribiu, E.P., Durand, V., and Chaffaux, St., 1990. Frequency of freemartinism in Booroola Arles Merino ewe lambs. *Récueil de Médecine Vétérinaire*16:919-922.
- Dain, A., 1971. The incidence of freemartinism in sheep. *Journal of reproduction and Fertility*24:91-97.

- Davis, G.H., 2005. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetique Selection et Evolution*37(Suppl. 1):S11-S23.
- Davis, G.H., Balakrishnan, L., Ross, I.K., Wilson, T., Galloway, S.M., Lumsden, B.M., Hanrahan, J.P., Mullen, M., Mao, X.Z., Wang, G.L., Zhao, Z.S., Zeng, Y.Q., Robinson, J.J., Mavrogenis, A.P., Papachristoforou, C., Pteter, C., Baumung, R., Cardyn, P., Boujenane, I., Cockett, N.E., Eythorsdottir, E., Arranz, J.J., Notter, D.R. 2006b. Investigation of the Booroola (FecB) and the Inverdale (FecX<sup>1</sup>) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. *Animal Reproduction Science*92:87-96.
- Davis, G.H., Bruce, G.D., Dodds, K.G., 2001a. Ovulation rate and litter size of prolific Inverdale (FecXI) and Hanna (FecXH) sheep. *Proc. Assoc. Adv. Anim. Breed. Genet.* 14:175–178.
- Davis, G.H., Dodds, K.G., Bruce, G.D., 1999: Combined effect of the Inverdale and Booroola prolificacy genes on ovulation rate in sheep. *Proc. Assoc. Adv. Anim. Breed. Genet.* 13:74-77.
- Davis, G.H., Dodds, K.G., Wheeler, R., Jay, N.P., 2001b. Evidence that an imprinted gene on the X chromosome increases ovulation rate in sheep. *Biology of Reproduction*64: 216-221.
- Davis, G.H., Galloway, S.M., Ross, I.K., Gregan, S.M., Ward, J., Nimbkar, B.V., Ghalsasi, P.M., Nimbkar, C., Gray, G.D., Inounu, I., Tiesnamurti, B., Martyniuk, E., Eythorsdottir, E., Mulsant, P., Lecerf, F., Hanrahan, J.P., Bradford, G.E., Wilson, T., 2002. DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation. *Biology of Reproduction*66: 1869-1874.
- Davis, G.H., Galloway, S.M., Wilson, T., McNatty, K.P., 2003. Major genes for prolificacy in NZ flocks. *Proc. Soc. Sheep Beef Cattle Vet.* 33: 35–42.
- Davis, G.H., McEwan, J.C., Fenessy, P.F., Dodds, K.G., Farkuhar, P.A., 1991. Evidence for the presence of a major gene influencing ovulation rate on the X-chromosome of sheep. *Biology of Reproduction*44: 620-624.
- Davis, G.H., McEwan, J.C., Fenessy, P.F., Dodds, K.G., McNatty, K.P., Wai Sum, O., 1992. Infertility due to bilateral ovarian hypoplasia in sheep homozygous (FecX<sup>1</sup> FecX<sup>1</sup>) for the Inverdale prolificacy gene located on the X chromosome. *Biology of Reproduction*46: 636-640.
- Davis, G.H., Montgomery, G.W., Allison, A.J., Kelly, R.W. and Bray, A.R., 1982. Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep New Zealand. *Journal of Agricultural Research*25: 525-529.
- de Jong, F.H., 1979. *Molecular and Cellular Endocrinology*13:1-10.



- Delouis C., Djiane J., Houdebine L.M., and Terqui M., 1980. Relation between hormones and mammary gland function. *Journal of Dairy Science*63:1492-1513.
- Devlin, B., Roeder, K. 1999. Genomic control for association studies. *Biometrics*55: 997–1004.
- Devlin, B., Roeder, K., Bacanu, S.A. 2001. Unbiased methods for population-based association studies. *Genetic Epidemiology* 21: 273–284.
- Devlin, B., Roeder, K., Wasserman, L. 2001. Genomic control, a new approach to genetic-based association studies. *Theoretical Population Biology*60:155–66.
- Di Pasquale, E., Beck – Peccoz, P. And Persani, L., 2004. Hypergonadotrophic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein 15 (BMP15) gene. *American Journal of Human Biology*75:106-111.
- Dong, J., Albertini, D.F., Nishimori, K., Kumar, T.R., Lu, N., Matzuk, M.M., 1996: Growth differentiation factor – 9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383:531-535.
- Driancourt, M.A., Bodin, L. And Fry, R.C. (1991): FSH secretion, its regulation and its relationship with ovulation rate in a range of prolific and non-prolific breeds of sheep. In *Major Genes for Reproduction in Sheep* pp. 125-134 Eds JM Elsen et al. INRA, Paris.
- Drummond AE, Dyson M, Le MT, Ethier JF & Findlay JK 2003 Ovarian follicle populations of the rat express TGF-beta signalling pathways. *Molecular and Cellular Endocrinology* 202: 53–57.
- Dube J.L., Wang P., Elvin J., Lyons K.M., Celeste A.J., Mastzuk M.M., 1998. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Molecular Endocrinology*12:1809-1817.
- Duffy, D.L., Montgomery, G.W., Hall, J., Mayne, C., Healy, S.C., Brown, J., Boomsma, D.I., Martin, N.G. 2001. Human twinning is not linked to the region of chromosome 4 syntenic with the sheep twinning gene FecB. *American Journal of Medical Genetics*1100:182-186
- Elvin, J.A., Yan, C.& Matzuk, M.M. 2000. Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology* 159: 1–5.
- Elvin, J.A., Yan, C., Wang, P., Nishimori, K.& Matzuk, M.M. 1999. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Molecular Endocrinology* 13: 1018–1034.
- Eppig, J.J. 2001 Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122: 829–838.

- Erickson, G.F. & Shimasaki, S. 2003. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family intra ovary cell types during the estrous cycle. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1: 9.
- Evans, A. 2003. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reproduction in Domestic Animals* 38:240-246
- FAOSTAT <http://www.faostat.fao.org>
- Fatehi, A.N., van den Hurk, R., Colenbrander, B., Daemen, A.J., van Tol, H.T., Monteiro, R.M., Roelen, B.A. & Bevers, M.M. 2005. Expression of bone morphogenetic protein2 (BMP2), BMP4 and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP2 and BMP4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. *Theriogenology* 63: 872–889.
- Freedman, M.L., Reich, D., Penney, K.L., McDonald, G.J., Mignault, A.A. 2004. Assessing the impact of population stratification on genetic association studies. *Nature Genetics* 36: 388–393.
- Galloway, S.M., McNatty, K.P., Cambridge, L.M., Laitinen, M.P.E., Juengel, J.L., Jokiranta, T.S., McLaren, R.J., Luiro, K., Dodds, K.G., Montgomery, G.W., Beattie, A.E., Davis, G.H., Ritvos, O. 2000. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics* 25:279-283.
- Galloway, S.M., McNatty, K.P., Cambridge, L.M., Laitinen, M.P.E., Juengel, J.L., Jokiranta, T.S., McLaren, R.J., Luiro, K., Dodds, K.G., Montgomery, G.W., Beattie, A.E., Davis, G.H., Ritvos, O. 2002. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics* 25:279-283
- Gilchrist, R.B., Ritter, L.J. & Armstrong, D.T. 2004. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal Reproduction Science* 82: 431–446.
- Gill, J.J.B., and Davies, D.A.R., 1991. XX/XY chromosomal chimaerism in infertile sheep of the Cambridge breed. *Genetique Selection et Evolution* 23(Supplement 1): 126-130.
- Glister, C., Kemp, C.F. & Knight, P.G. 2004. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction* 127: 239–254.
- Glister, C., Richards, S.L. & Knight, P.G. 2005. Bone morphogenetic proteins (BMP) -4, -6, and -7 potently suppress basal and luteinizing hormone-induced androgen production by bovine theca interna cells in primary culture: could

- ovarian hyperandrogenic dysfunction be caused by a defect in thecal BMP signaling. *Endocrinology* 146: 1883–1892.
- Guan, F., Liu, S.R., Shi, G.Q., Yang, L.G. 2007. Polymorphism of FecB gene in nine sheep breeds or strains and its effects on litter size, lamb growth and development. *Animal Reproduction Science* 99:44-52
- Hanrahan, J.P., Gregan, S.M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G.H., Powell, R., and Galloway, S.M., 2004. Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction* 70:900-909.
- Hanrahan, J.P. 1991. Evidence for single gene effects on ovulation rate in the Cambridge and Belclare breeds. In *Major Genes for Reproduction in Sheep* pp 93-102 Eds JM elsen et al., INRA Paris.
- Hayashi, M., McGee, E.A., Min, G., Klein, C., Rose, U.M., van Duin, M. & Hsueh, A.J. 1999 Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology* 140: 1236–1244.
- He, Y.Q., Chu, M.X., Wang, J.Y., Fang, L., Ye, S.C. 2006. Polymorphism on BMP15 as a candidate gene for prolificacy in six goat breeds. *Journal of Anhui Agricultural University* 33:61-64
- Heath, D.A., Caldani, M., McNatty K.P. 1996. Relationships between the number of immunostaining gonadotropes and the plasma concentrations of gonadotrophins in ewes with and without the FecBB gene. *Journal of Reproduction and Fertility* 106:73-78
- Hosking, L. 2004. Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. *European Journal of Human Genetics* 12:395–399.
- Hotelling, H. (1933), 'Analysis of a complex of statistical variables into principal components', *Journal of Educational Psychology* 24: 417–441, 498–520.
- Hreinsson, J.G., Scott, J.E., Rasmussen, C., Swahn, M.L., Hsueh, A.J. & Hovatta, O. 2002 Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87: 316–321.
- Hua, G.H., Chen, S.L., Ai, J.T., Yang, L.G. 2008. None of polymorphism of ovine fecundity major genes FecB and FecX was tested in goat. *Animal Reproduction Science* 108:279-286
- Hunter, M.G., Brankin, V., Quinn, R.L., Ferguson, E.M., Edwards, S.A. and Ashworth, C.J. 2005. Oocyte – somatic cell – endocrine interactions in pigs. *Domestic Animal Endocrinology* 29:371-384

- Isaacs, K.L., McNatty, K.P., Condell, L., Shaw, L., Heath, D.A., Hudson, N.L., Littlejohn, R.P. and McLeod, B.J. 1998. Plasma FSH and LH immunoreactive inhibin concentrations in FecBB/FecB and FecB+/FecB+ Booroola ewes and rams from birth to 12 months of age. *Journal of Reproduction and Fertility* 103: 89-97.
- Jaatinen, R., Laitinen, M.P., Vuojolainen, K., Aaltonen, J., Louhio, H., Heikinheimo, K., Lehtonen, E. & Ritvos, O. 1999. Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B. *Molecular and Cellular Endocrinology* 156: 189–193.
- Jolliffe, I. T. (2002), *Principal Component Analysis, 2nd edn, Springer, Heidelberg and New York.*
- Jommundsson, J.V., Adalsteinsson, S. 1985. Single genes for fecundity in Icelandic sheep. In: Land R.B., Robinson, D.W. (Eds), *Genetics of Reproduction in Sheep*. Butterworths, London, UK, pp. 159-168
- Jorde, L.B. 2000. Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes. *Genome Research* 69: 1357-1369
- Juengel, J.L., Quirke, L.D., Tisdall, D.J., Smith, P., Hudson, N.L., and McNatty, K.P., 2000. Gene expression in abnormal ovarian structures of ewes homozygous for the Inverdale prolificacy gene. *Biology of Reproduction* 62:1467-1478
- Juengel, J.L., Hudson, N.L., Heath, D.A., Smith, P., Reader, K.L., Lawrence, S.B., O'Connell, A.R., Laitinen, M.P.E., Cranfield, M., Groome, N.P., Ritvos, O., McNatty, K.P., 2002. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biology of Reproduction* 67:1777-1789.
- Juengel, J.L. & McNatty, K.P. 2005. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Human Reproduction Update* 11: 143–160.
- Laitinen, M., Vuogolainen, K., Jaatinen, R., Ketola, I., Aaltonen., J., Lehtonen, E., Heikinheimo, M., Ritvos, O. 1998. A novel growth differentiation factor – 9 (GDF9) related factor is co-expressed with GDF9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mechanisms of Development* 78:135-140
- Land, R.B., 1977. Genetic variation and improvement. In: H.H. Cole and P.T. Cupps (Editors), *Reproduction in Domestic Animals*. Academic Press, New York, NY, San Francisco and London, pp. 577-604.
- Land, R.B., Morris B.A., Baxter G., Fordyce M., and Forster J., 1982. *Journal of Reproduction and Fertility* 66:625-634.
- Lecerf, F., Mulsant, P., Elsen, J.M., Bodin, L., 2002. Localisation and mapping of a major gene controlling ovulation rate in Lacaune sheep. In: *Proceedings of the*

- Seventh World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Montpellier, France, CD-ROM Communication 08-31, 4pp.
- Long, S.E., 1980. Some pathological conditions of the reproductive track of the ewe. *Veterinary Record*106:175-176.
- Malher, X., Le Chere, A.K., 1998. High prolificacy in Belle-Ile sheep (Brittany, France): major effects of a putative single gene and the Awh colour gene on ovulation rate and litter size. *Reproduction Nutrition Development*38:473–484.
- Marchini, J., Cardon, L.R., Phillips, M.S., Donnelly, P.2004. The effects of human population structure on large genetic association studies. *Nature Genetics* 36:512–517
- Martal, J., Djiane, J., and Delouis, G., 1976. Purification and lactogenic activity of an ovine placental hormone. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*16:162.
- Martyniuk, E., Radomsa, M.J., A single gene for prolificacy in Olkuska sheep, in: Elsen J.M., Bodin L., Thimonier J. (Eds.), *Major Genes for Reproduction in Sheep*, Inra, Paris, France, 1991, pp. 85–92.
- Mason, I.L. 1996. *A World Dictionary of Livestock Breeds, Types and Varieties*, 4<sup>th</sup> edn. CAB International, Wallingford, UK, pp.273
- Massague J & Wotton D 2000 Transcriptional control by the TGFbeta/ Smad signaling system. *EMBO Journal* 19 1745–1754.
- Massague, J., and Chen, Y. G. 2000. Controlling TGF beta signaling. *Genetic Development*14:627-644
- Matejka M., Crihiu E.P., Ricordeau G., and Chaffeaux St., 1987. Frequency of freemartinism in Romanov ewes. *Recueil de Medicine veterinaire*163:635-638.
- Mauleon, P., and Mariana J.C., 1977. In *Reproduction in Domestic Animals* (eds H.H. Cole and P.T. Cupps), 3<sup>rd</sup> edition, pp. 175-198. Academic Press, New York.
- McEntee, K., 1990. *Reproductive Pathology of domestic mammals*. Academic Press Inc, New York.
- McGrath, S.A., Esquela AF & Lee SJ 1995 Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Molecular Endocrinology* 9:131–136.
- McLeod, B.J., Kyle, S.E., Ramsey, M.R., Manley, T.R., 1995: Hormone secretion patterns associated with increased ovulation rates or with ovarian dysfunction in Inverdale (FecX) ewes. *Proc. NZ Soc. Animal Production*55: 304-306
- McNatty, K.P. and Henderson, K.M.1987. Gonadotrophins, fecundity genes and ovarian follicular function *Journal of Steroid Biochemistry* 27: 365–373

- McNatty, K.P., Hudson, N.L., Shaw, L., Condell, L.A., Ball, K., Seah, S-L. And Clarke, I.J. 1991. GnRH-induced gonadotrophin secretion in ovariectomized Booroola ewes with hypothalamic-pituitary disconnection. *Journal of Reproduction and Fertility*91:583-592
- McNatty, K.P., Hudson, N.L., Lun, S., Heath, D.A., Shaw, L., Condell, L., Phillips, D.J. and Clarke, I.J. 1993. Gonadotrophin-releasing hormone and the control of ovulation rate by the FecB gene in Booroola ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*98:97-105
- McNatty, K.P., Hudson, N.L., Shaw, L. and Moore, L. 1994. Plasma concentrations of FSH, LH, thyroid - stimulating hormone and growth hormone after exogenous stimulation with GnRH, TRH and GHRH in Booroola ewes that are homozygous carriers or non-carriers of the FecB gene. *Journal of Reproduction and Fertility*102:177-183
- McNatty, K.P., Smith, P., Hudson, N.L., Lun, S., Heath, D., Shackell, G. and Korrigan, K. 1995b. Ovarian characteristics in Inverdale ewes heterozygous (I+) and Homozygous (II) for the Inverdale gene. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*55:301-303
- McNatty, K.P., Heath, D.A., Lundy, T., Fidler, A.E., Quirke, L., O'Connell, A., Smith, P., Groome, N. and Tisdal, D.J. 1999. Control of early ovarian follicular development *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*54: 3-16
- McNatty, K.P., Juengel, J.L., Wilson, T., Galloway, S.M., Davis, G.H. 2001. Genetic mutations influencing ovulation rate in sheep. *Reproduction, Fertility and Development*13(8):549-555
- McNatty, K.P., Juengel, J.L., Wilson, T., Galloway, S.M., Davis, G.H., Hudson, N.L., Moeller, C.L., Cranfield, M., Reader, K.L., Laitinen, M.P.E., Groome, N.P., Sawyer, H.R., Ritvos, O. 2003. Oocyte derived growth factors and ovulation rate in sheep. *Reproduction (Suppl. 64)*1-13
- McNatty, K.P., Smith, P., Moore, L.G., Reader, K., Lun, S., Hanrahan, J.P., Groome, N.P., Laitinen, M., Ritvos, O., Juengel, J.L., 2005. Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate. *Molecular and Cellular Endocrinology*234:57-66.
- Michailidis, G., Avdi, M., Pappa, V. 2008. Reproductive performance and investigation of BMPR-IB and BMP15 gene mutations in Greek Chios and Florina sheep breeds. *Archiva Zootechnica* 11:1, 24-31
- Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T. & Miyazono, K. 2002. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signaling. *Genes and Cells* 7: 1191-1204.
- Monteagudo, L.V., Ponz, R., Tejedor, M.T., Laviña, A., Sierra, I. 2009. A 17 bp deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) gene is associated to

- increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed *Animal Reproduction Science* 110: 139–146
- Montgomery, G.W., McNatty, K.P. and Davis, G.H. 1992. Physiology and molecular genetics of mutations that increase ovulation rate in sheep. *Endocrine Reviews* 13: 309-328
- Montgomery, G.W., Galloway, S.M., Davis, G.H., McNatty, K.P. 2001. Genes controlling ovulation rate in sheep, *Reproduction* 121:843-852
- Mulsant, P., Lecerf, F., Fabre, S., Schibler, L., Monget, P., Lanneluc, I., Pisselet, C., Riquet, J., Monniaux, D., Callebaut, I., Cribiu, E., Thimonier, J., Teyssier, J., Bodin, L., Cognie, Y., Chitour, N., Elsen, J.M. 2001. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5104-5109
- Nilsson, E.E.& Skinner, M.K. 2002. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biology of Reproduction* 67: 1018–1024.
- Nilsson, E.E.& Skinner, M.K. 2003 Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biology of Reproduction* 69: 1265–1272.
- Nimbkar, C., Ghalsasi, P.M., Walkden-Brown, S.W., Kahn, L.P. 2002. Breeding program for the genetic improvement of Deccani sheep of Maharashtra, India. In: *Proceedings of the Seventh World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Montpellier, France, CD-ROM Communication 25-11, 4pp.
- Nooriyan Sooroor E. 2000. Ghezel or Red Karaman. Department of Animal Sciences at Oclahoma State University. <http://www.ansi.okstate.edu/breeds/sheep/ghezel/index.htm>; accessed 13 october 2008
- Otsuka, F., Yao, Z., Lee, T., Yamamoto, S., Erickson, G.F.& Shimasaki, S. 2000. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *Journal of Biological Chemistry* 275: 39523–39528.
- Otsuka, F., Moore, R.K.& Shimasaki, S. 2001a Biological function and cellular mechanism of bone morphogenetic protein-6 in the ovary. *Journal of Biological Chemistry* 276: 32889–32895.
- Otsuka, F., Moore, R.K., Iemura, S., Ueno, N.& Shimasaki, S. 2001b. Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289: 961–966.
- Pangas, S.A., Jorgez, C.J. & Matzuk, M.M. 2004. Growth differentiation factor 9 regulates expression of the bone morphogenetic protein antagonist gremlin. *Journal of Biological Chemistry* 279: 32281–32286.

- Patterson, G. I., and Padgett, R. W. 2000. TGF beta – related pathways. Roles in *Caenorhabditis elegans* development. *Trends Genetics* 16:27-33
- Peart J.N., Edwards R.A., and Donaldson E., 1972. The yield and composition of the milk of Finnish Landrace x Blackface ewes. I. Ewes and lambs maintained indoors. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 79:303-313.
- Peters, H., Byskov, A.G., Himelstein-Braw, R., and Faber, M. 1975. *Journal of Reproduction and Fertility*45: 559-566.
- Philips, D.J., Hudson, N.L. and McNatty, K.P. 1993. Effects on ovariectomy and genotype on bioactive FSH in plasma and pituitary of Booroola ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*98: 559-565
- Pierre, A., Pisselet, C., Dupont, J., Bontoux, M.& Monget, P. 2005. Bone morphogenetic protein 5 expression in the rat ovary: biological effects on granulosa cell proliferation and steroidogenesis. *Biology of Reproduction* 73: 1102–1108.
- Piper, L.R. and Bindon, B.M. 1982. The Booroola Merino and the performance of medium non-Peppin crosses at Armidale. In the Booroola Merino pp 9-20 Eds LR Piper, BM Bindon and RD Nethery. CSIRO, Melbourne
- Piper, L.R., Bindon, BM, Davis G.H. 1985. The single gene inheritance of the high litter size of the Booroola Merino In: Land, R.B., Robinson D.W., (Eds), *Genetics of Reproduction in sheep*. Butterworths, London, UK, pp. 115-125
- Pritchard, J.K., Donnelly, P. 2001. Case-control studies of association in structured or admixed populations. *Theoretical Population Biology* 60: 227–237.
- Raymond, M. and Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2), population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248–249.
- Rhind, S.M., Gittus, G., Potts, J.M., Bishop, S.C. 2000. Reproductive performance of the Thoca Cheviot sheep, *Proc. Brit. Soc. Anim. Sci.* p. 44
- Richards, J.S., Russell, D.L., Ochsner, S., Hsieh, M., Doyle, K.H., Falender, A.E., Lo, Y.K., and Sharma, S.C. 2002. Novel signaling pathway that control ovarian follicular development, ovulation and luteinization. *Recent Progress in Hormone Research*57:195-220
- Roberts S.J., 1986. Veterinary obstetrics and genital diseases (*Theriogenology*). Self-published. Ithaca, N.Y.
- Rodgers, M., Popper, S., Wirth, D. 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. *Experimental Parasitology*71: 267-275.
- Russel, A.J.F., Alexieva, S.A., Elston, D.A., 1997. The effect of the introduction of the Thoca gene for fecundity on lamb production from Cheviots ewes, *Animal Science*. 64: 503-508



- Sadighi M., Bodensteiner K.J., Beattie A.E., Galloway S.M., 2002. Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (GDF9) to sheep chromosome 5. *Animal Genetics*33:244-245.
- Scaramuzzi R.J., Davidson W.R., and Van Look P.F.A., 1977. *Nature*(Lond.) 269:817-818.
- Scherf B.D. 2000. World Watch List for Domestic Animal Diversity, 3rd edn., FAO, Rome.
- Shackell, G.H., Hudson, N.L., Heath, D.A., Lun, S., Shaw, L., Condell, L., Blay, L.R., McNatty, K.P. 1993. Plasma gonadotropin concentrations and ovarian characteristics in Inverdale ewes that are heterozygous for a major gene (FecX<sup>1</sup>) on the X chromosome that influences ovulation rate. *Biology of Reproduction*48: 1150-1156
- Shi, Y., and Massague, J. 2003. Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*113:685-700
- Shimasaki, S., Moore, R.K., Otsuka, F.& Erickson, G.F. 2004. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Reviews* 25: 72–101.
- Shimasaki, S., Zachow, R.J., Li, D., Kim, H., Iemura, S., Ueno, N., Sampath, K., Chang, R.J.& Erickson, G.F. 1999. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *PNAS* 96 7282–7287.
- Sierra, I. 1992. La raza ovina Rasa Aragonesa: Caracteres morfológicos y productivos. *Animal Genetic Resources Information*10:65-74
- Silva, J.R.V., van den Hurk, R., van Tol, H.T.A., Roelen, B.A.J., and Figueiredo, J.R. 2004. Gene expression and protein localization for activin – A, follistatin and activin receptors in goat ovaries. *Journal of Endocrinology*183:405-415
- Smith, P., O., W.-S., Corrigan, K.A., Smith, T., Lundy, T., Davis, G.H., McNatty, K.P. 1997. Ovarian morphology and endocrine characteristics of female sheep foetuses that are heterozygous or homozygous for the Inverdale prolificacy gene (FecX<sup>1</sup>). *Biology of Reproduction*57:1183-1192
- Sobel, E., Papp, J.C., Lange, K. 2002. Detection and integration of genotyping errors in statistical genetics. *Am J Hum Genet.* 70: 496–508.
- Solloway, M.J., Dudley, A.T., Bikoff, E.K., Lyons, K.M., Hogan, B.L.& Robertson, E.J. 1998 Mice lacking Bmp6 function. *Developmental Genetics* 22: 321–339.
- Souza, C.J., Campbell, B.K., McNeilly, A.S.& Baird, D.T. 2002. Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. *Reproduction* 123: 363–369.

- Souza, C.J., Campbell, B.K., Webb, R. and Baird, D.T. 1997. Secretion of inhibin A and follicular dynamics throughout the estrous cycle in the sheep with or without the Booroola gene (FecB). *Endocrinology* 138: 5333-5340
- Souza, C.J., MacDougall, C., Cambell, B.K., McNeilly, A.S., Baird, D.T. 2001. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type IB (BMPR-IB) gene, *Journal of Endocrinology* 169 :R1-R6
- Tabor, H.K., Risch, N.J., Myers, R.M. 2002. Candidate - genes approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat. Rev. Genet.* 3: 391-397
- Takebayashi, K., Takakura, K., Wang, H.-Q., Kimura, f., Kasahara, K, Noda, Y. 2000. Mutation analysis of the growth differentiation factor – 9 and – 9B genes in patients with premature ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 74:976-979
- Terwilliger, J.D., Weeks, D.E., Ott, J. 1990. Laboratory errors in the reading of marker alleles cause massive reductions in lod score and lead to gross over-estimations of the recombination fraction. *Am J Hum Genet* 47: A201.
- Terwillinger, J.D., Goring, H.H. 2000. Gene mapping in the 21<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> centuries: statistical methods, data analysis and experimental design. *Human Biology.* 72: 63-132
- Thomas, G.B., Oldman, C.M., Hoskinson, R.M., Scaramuzzi, R.J. and Martin, G.B., 1987. *Australian Journal of Biological Sciences* 40:307-313.
- Treacher, T.T. 1985. The possibilities for improving the performance of ewes suckling three or more lambs in grazing systems. In *Genetics of Reproduction in Sheep* (eds R.B. Land and D.W. Robinson), pp.371-381. Butterworths, London.
- Vitt, U.A., Hayashi, M., Klein, C.& Hsueh, A.J. 2000a. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biology of Reproduction* 62: 370–377.
- Vitt, U.A., McGee, E.A., Hayashi, M.& Hsueh, A.J. 2000b. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology* 141: 3814–3820.
- Voight, B.F., Pritchard, J.K. 2005. Confounding from Cryptic Relatedness in Case-Control Association Studies. *PLoS Genet* 1: e32
- Walling, G.A., Bishop, S.C., Pong-Wong, R., Gittus, G., Russel, A.J.F., Rhind, S.M. 2002. Detection of a major gene for litter size in Thoca Cheviot sheep using Bayesian segregation analyses, *Animal Science* 75: 339-347

- Wang, J.& Roy, S.K. 2004 Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone. *Biology of Reproduction* 70: 577–585.
- Wang, G.L., Mao, X.Z, Davis, G.H., Zhao, Z.S., Zhang, L.J., Zeng, Y.Q. 2003. DNA test in Hu sheep and Han sheep (small tail) showed the existence of Booroola (FecB) mutation. *Journal of Nanjing Agricultural University*26:104-106
- Webb, R., Driancourt, M.A. and Hanrahan, J.P.1998. Ovulation rate in the ewe: mechanisms underlying genetic variation. In *The 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, University of New England, Armidale, Australia pp 3–10
- Wheaton, J.E., Thomas, D.L., Kusina, N.T., Gottredson, R.G. and Meyer, R.L. 1996. Effects of passive immunization against inhibin-peptide on secretion of follicle-stimulating hormone and ovulation rate in ewes carrying the Booroola fecundity gene. *Biology of Reproduction*55:1351-1355
- Wilson, T., Wu, X.Y., Juengel, J.L., Ross, I.K., Lumsden, J.M., Lord, E.A., Dodds, K.G., Walling, G.A., McEwan, J.C., O’Connell, A.R., McNatty, K.P. and Montgomery, G.W. 2001. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of the bone morphogenetic protein IB receptor (ALK – 6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biology of Reproduction*64:1225-1235.
- Yamamoto, N., Christenson, L.K., McAllister, J.M.& Strauss, J.F. 2002. Growth differentiation factor-9 inhibits 3050-adenosine monophosphate- stimulated steroidogenesis in human granulosa and theca cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87: 2849–2856.
- Yan, C., Wang, P., DeMayo, F.J., Elvin, J., Carino, C., Prasad, S.V., Skinner, S.S., Dunbar, B.S., Dube, J.L., Celeste, A.J., Matzuk, M.M. 2001. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular and Cellular Endocrinology*15: 854-866
- Yi, S.E., LaPolt, P.S., Yoon, B.S., Chen, J.Y.-C., Lu, J.k.H., Lyons, K.M. 2001. The type I BMP receptor Bmpr IB is essential for female reproductive function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 7994-7499

## 6.2. Ελληνική Βιβλιογραφία

- Βολάνης Μ., Τζεράκης Κ., 1997. Μελέτη του προβάτου φυλής Σφακιών. Ι. Αναπαραγωγικές και παραγωγικές ιδιότητες αμνάδων. *Επιθεώρηση Ζωοτεχνικής Επιστήμης*23:5-8.
- Γαβριηλίδης Γ.Χ., Ζέρβας Ν., Χατζημηνάογλου Ι., Γεωργούδης Α., Βογιατζόγλου Ι., 1988. Ειδικό δελτίο αποτελεσμάτων από την αρχική επεξεργασία των

- στοιχείων της περιόδου 1977-1986 του προβάτου της φυλής Χίου, στο *Σ.Γ.Ε. Χαλκιδικής. Ειδικό δελτίο*.
- Ζέρβας Γ., Καλαϊσάκης Π., Φεγγερός Κ. 2000. Διατροφή Αγροτικών Ζώων. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη
- Ζέρβας Ν.Π., 1965. Συμβολή εις την φαινοτυπικήν και γενετικήν έρευναν της αναπαραγωγής και της γαλακτοπαραγωγής των Χιώτικων προβάτων. *Διατριβή επί υφηγεσία Α.Γ.Σ.Α.*
- Ζυγογιάννης Δ., 1978. Επίδραση της πολυδυμίας και του γονότυπου επί της κρεοπαραγωγικής ικανότητας των γαλουχούμενων αμνών. *Επιστημονική δημοσίευση Κτηνιατρικής Σχολής* **18**: 91-109.
- Ζυγογιάννης Δ., 2006. Εκτροφή και Παθολογία του προβάτου. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Κορδάλη Χρ. & Β. Ο.Ε. – Σύγχρονη Παιδεία
- Κατσαούνης Ν., 1996. *Προβατοτροφία, Εκτροφή Μικρών Μηρυκαστικών*, τόμος Α (εκδ. Αδελφοί Κυριακίδη).
- Κιτσοπανίδης Π. 2006. *Οικονομική Ζωικής Παραγωγής - Αρχές, Εφαρμογές, Τεχνικοοικονομική Ανάλυση*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Ζήτη.
- Μπιζέλης Ι.Α., 1989. Ηλικία της ήβης και χαρακτηριστικά της πρώτης οιστρικής περιόδου αμνάδων των φυλών Χίου και Καραγκούνικης σε σχέση με το επίπεδο διατροφής. *Διδακτορική Διατριβή, Γ.Π.Α.*
- Παπαβασιλείου Δ., 2003. Μελέτη των μορφολογικών, παραγωγικών και αναπαραγωγικών χαρακτηριστικών του προβάτου Άρτας ως βάση ζωοτεχνικών επεμβάσεων προς βελτίωση της φυλής. *Διδακτορική διατριβή, Γ.Π.Α.*
- Παπαβασιλείου Δ., Μπιζέλης Ι., Λασκαρίδης Γ., Ρογδάκης Ε., 1998. Μορφολογικά, αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά της φυλής προβάτων Λέσβου. *Επιθεώρηση Ζωοτεχνικής Επιστήμης* **25**: 29-43.
- Παπαδημητρίου Τ., 1975. Συμβολή στην μελέτη της αναπαραγωγής και γαλακτοπαραγωγής των Καραγκούνικων προβάτων. *Διατριβή επί διδακτορία Α.Γ.Σ.Α.*
- Παπά – Μιχαηλίδου Β., Αδή Μ., Μιχαηλίδης Γ., Παμπουκίδου Α., Τριανταφυλλίδης Δ., 2000. Συγκριτική μελέτη ορισμένων αναπαραγωγικών ιδιοτήτων των φυλών προβάτων Χίου, Καραγκούνικης και Φλώρινας. *Επιθεώρηση Ζωοτεχνικής Επιστήμης* **27**: 27-36.
- Ρογδάκης Ε., 2002. *Εγχώριες Φυλές Προβάτων, Περιγραφή, Φυλογένεια, Γενετική Βελτίωση, Διαφύλαξη* (εκδ. Αγρότυπος α.ε.).
- Ρογδάκης Ε., 2004. *Αναπαραγωγή του προβάτου* (εκδ. Αθ. Σταμούλης).

Ρογδάκης Ε., Παππάς Β., Παπαδημητρίου Τ., 1988. Ανάλυση των στοιχείων από τον έλεγχο της γαλακτοπαραγωγής του Καραγκούνικου προβάτου. *Επιθεώρηση Ζωοτεχνικής Επιστήμης* 8:17-34.