



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΦΥΛΩΝ ΧΟΙΡΩΝ ΜΕ
ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ»

«THE USE OF MOLECULAR MARKERS IN
BREEDING OF PIG RACES»

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΠΑΡΑΛΥΚΙΔΟΥ ΙΣΙΔΩΡΑ

ΕΤΟΣ: 2017

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ & ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Ζ. Μαμούρης: Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών (Υπεύθυνος Καθηγητής)

Θ. Σαραφίδου: Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών

Κ. Σταμάτης: Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό

Περίληψη

Ο χοίρος ανήκει στα χορδωτά, θηλαστικά, αρτιοδάκτυλα με επιστημονική ονομασία *Sus scrofa*. Στο είδος αυτό ανήκουν τόσο οι αγριόχοιροι (*Sus scrofa*) καθώς και οι οικόσιτοι εξημερωμένοι χοίροι (*Sus scrofa domesticus*). Ο χοίρος αποτελεί σημαντική πηγή εσόδων για την κτηνοτροφία, καθώς είναι ένα από τα κύρια οικόσιτα ζώα. Γι' αυτό το λόγο, έχουν γίνει προσπάθειες από την επιστημονική κοινότητα, να αυξήσουν το μέγεθος του χοίρου, στοχεύοντας στην αύξηση του αριθμού των σπονδύλων του, με αποτέλεσμα να παράγονται μεγαλύτερες ποσότητες χοιρινού κρέατος. Το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία των πλευρών στα θηλαστικά ονομάζεται *vertnin* (*VRTN*) και ορθολογικά του έχουν βρεθεί τόσο στα ψάρια όσο και στα πουλιά. Σύμφωνα με έρευνες, έχουν εντοπιστεί δύο παραλλαγές του γονιδίου που συνδέονται στενά με τον αυξημένο αριθμό των πλευρών στους χοίρους: Η πρώτη παραλλαγή αφορά στην ένθεση ενός μεταθετού στοιχείου μεγέθους 291bp στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου. Η ενσωμάτωση της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας αλλάζει τη φυσιολογική έκφραση του γονιδίου, αυξάνοντας τον αριθμό των σπονδύλων του χοίρου κατά ένα για κάθε αλληλόμορφο που φέρει την ένθεση. Η δεύτερη παραλλαγή αφορά σε μία μη νοηματική μετάλλαξη, δηλαδή μία αλλαγή της βάσης A με C, οδηγώντας σε αλλαγή του αμινοξέος 461 από Ser σε Tyr στην παραγόμενη πρωτεΐνη. Στην παρούσα μελέτη, απομονώσαμε το ολικό DNA από δείγματα αίματος χοίρων και με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) και κατάλληλων εκκινήτων ενισχύσαμε το αντίστοιχο επιθυμητό τμήμα. Με βάση τα αποτελέσματα της γονοτύπησης, αναμένεται μελλοντικά να σχεδιαστεί ένα μοντέλο διασταυρώσεων που θα οδηγήσει στην αύξηση της συχνότητας των επιθυμητών γονοτύπων στον πληθυσμό και στην αύξηση στο μήκος των σωμάτων των ζώων.

Abstract

The pig is a mammal that belongs to chordata, artiodactyla with the scientific name *Sus scrofa*. In this species, belong both the wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and the domestic pigs (*Sus scrofa domesticus*). The number of vertebrae in pigs varies considerably. It is an important trait in pig production because it directly determines the size of important meat cuts such as the loin and also has an overall effect on carcass conformation. For this reason, efforts have been made by the scientific community to increase the pig's carcass (body) length & the number of vertebrae and as a result to produce larger quantities of pork. The responsible gene for the creation of ribs in mammals is called *vertnin* (*VRTN*) and its orthologs have been found in fishes and birds. Two variants of the gene are found to be closely associated with increased number of vertebrae in pigs: The first one involves an insertion of an 291bp - element in the promoter region of the gene. This insertion alters the normal expression of the *VRTN* gene leading to the increase of vertebral number. The second variant concerns a missense mutation; a change A > C leads to the change of amino acid in the position 461 from Ser to Tyr in the produced protein. In this study, genomic DNA was extracted from pigs' blood and with the aid of polymerase chain reaction (PCR), was amplified the desirable part of the gene. Based on the results of genotyping, a cross-breeding model is expected to be designed in the future to increase the frequency of desired genotypes in the population and to increase the length of the animals' bodies.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	5
1.1 <i>Sus scrofa</i>	5
1.2 Γενετική βελτίωση	8
1.3 Γονίδιο <i>Vertnin</i> (<i>VRTN</i>)	9
1.3.1 Δευτερεύοντα χαρακτηριστικά	12
1.4 Μοριακοί δείκτες	13
1.4.1 SNP: Πολυμορφισμοί μεμονωμένων νουκλεοτιδίων	14
1.5 Βιοπληροφορική	15
1.6 Σκοπός	16
2. Υλικά και Μέθοδοι	17
2.1 Αντιδραστήρια	17
2.2 Μέθοδοι	18
2.2.1 Για την ταυτοποίηση της ένθεσης	20
2.2.2 Για την ταυτοποίηση του SNP	24
3. Αποτελέσματα	26
A. Για την ταυτοποίηση της ένθεσης (<i>g.20311_20312ins291</i>) ...	26
B. Για την ταυτοποίηση του SNP (<i>g.19034 A>C</i>)	30
4. Συζήτηση	36
5. Βιβλιογραφία	39

1. Εισαγωγή

1.1 *Sus scrofa*

Ο χοίρος ανήκει στα χορδωτά, θηλαστικά αρτιοδάκτυλα (ζώα με άρτιο αριθμό δακτύλων) και είναι οπληφόρο. Η επιστημονική ονομασία είναι *Sus scrofa*, ονομασία που δόθηκε από τον Carl Linnaeus το 1758. Ταξινομικά, ανήκει στην οικογένεια Suidae, η οποία περικλείει οκτώ γένη και δεκαέξι είδη. (International Taxonomic Information System, ITIS, www.itis.gov)

Πίνακας 1: Η ταξινομική κυριαρχία του χοίρου σύμφωνα με το International Taxonomic Information System (ITIS)

<u>Συστηματική ταξινόμηση</u>	<u>Χοίρος</u>
Βασίλειο	Ζώα (<i>Animalia</i>)
Υποβασίλειο	Αμφίπλευρα (<i>Bilateria</i>)
Κατώτερο βασίλειο	Δευτεροστόμια (<i>Deuterostomia</i>)
Συνομοταξία/Φύλο	Χορδωτά (<i>Chordata</i>)
Υπόφυλο	Σπονδυλωτά (<i>Vertebrata</i>)
Κατώτερο φύλο	Γναθοστόματα (<i>Gnathostomata</i>)
Υπερκλάση	Τετράποδα (<i>Tetrapoda</i>)
Κλάση	Θηλαστικά (<i>Mammalia</i>)
Υποκλάση	Θηρία (<i>Theria</i>)
Κατώτερη κλάση	Ευθήρια (<i>Eutheria</i>)
Τάξη	Αρτιοδάκτυλα (<i>Artiodactyla</i>)
Οικογένεια	Συίδες (<i>Suidae</i>)
Υποοικογένεια	Συίνες (<i>Suinae</i>)
Φυλή	<i>Suiformes (Suini)</i>
Γένος	<i>Sus</i>
Είδος	<i>Sus scrofa</i>

Σε πλήρη ανάπτυξη, ο χοίρος φτάνει τα 153-240 cm σε μήκος και τα 66-272 Kg σε βάρος. Έχει πολύ ανεπτυγμένη όσφρηση και ακοή, ενώ η όρασή του είναι περιορισμένη: αντιλαμβάνεται κυρίως την κίνηση και όπως τα

περισσότερα θηλαστικά δεν βλέπει τα χρώματα. Ο χρωματισμός του ποικίλλει ανάλογα με τις εποχές, τις τοπικές γενιές και τον τόπο διατροφής του: καφεκόκκινος, γκρι ή μαύρος. (Animal Diversity Web, ADW, University of Michigan, www.animaldiversity.org)

Ο χοίρος ζει και αναπαράγεται σε όλη την Ευρωπαϊκή ήπειρο, στην βόρεια Αφρική, καθώς και στην κεντρική και νότια Ασία. Ακόμα, έχει εισαχθεί με επιτυχία στη βόρεια Αμερική και την Αυστραλία. (Animal Diversity Web, ADW, University of Michigan, www.animaldiversity.org)

Υπάρχουν πολλές διαφορετικές ράτσες η κάθε μια με τα δικά της μοναδικά χαρακτηριστικά. Ένα από τα πιο γνωστά υποείδη των *Sus scrofa* είναι ο οικόσιτος χοίρος (*Sus scrofa domesticus* ή ***Sus domesticus***), το οποίο χρησιμοποιείται κυρίως στην κτηνοτροφία για την παραγωγή χοιρινού κρέατος.

Μια από τις παλαιότερες ράτσες του χοίρου είναι τα ***Duroc*** (Εικ.1), τα οποία αναπτύχθηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής και αποτέλεσαν τη βάση πολλών εμπορικών μικτών φυλών χοίρων. Η ράτσα αυτή προήλθε από την Αφρική και είναι μία από τις πολλές με κόκκινα στελέχη χοίρων, που αναπτύχθηκε γύρω στο 1800 στη Νέα Αγγλία. Οι χοίροι *Duroc* είναι κόκκινοι, μεσαίου μήκους και μυώδεις, ενώ τείνουν να είναι ένας από τις λιγότερο επιθετικές φυλές χοίρων. Ο πρώτος χοίρος του οποίου το γονιδίωμα αλληλουχήθηκε ήταν θηλυκός *Duroc* (Briggs, Hilton M. 1969. *Modern Breeds of Livestock*. Third Edition, MacMillan Company).

Μία ακόμα ράτσα που ανήκει στους χοίρους είναι τα ***Piétrain*** (Εικ.2), μια φυλή οικόσιτου χοίρου που προέρχεται από τη Βαλλονία, και παίρνει το όνομά της από το "Piétrain", ένα μικρό χωριό του δήμου της Βαλλονίας. Οι χοίροι *Piétrain* εισήχθησαν στη Γερμανία το 1960-61. Χρησιμοποιούνται συνήθως σε διασταυρώσεις για τη βελτίωση της ποιότητας του χοιρινού κρέατος που παράγεται. Η φυλή βελτιώθηκε από τους ερευνητές του Πανεπιστημίου της Λιέγης το 2004 (Briggs, Hilton M. 1983. *International Pig Breed Encyclopedia*. Elanco Animal Health).

Τα ***Welsh pigs*** (Εικ.3) είναι μια ράτσα χοίρου, που προέρχεται από την Ουαλία. Πρόκειται για μια μεγάλη λευκή φυλή που είναι γνωστή για την ανθεκτικότητά της στην υπαίθρια καλλιέργεια, για το μακρύ σώμα και τα ανοιχτά της αυτιά (Briggs, Hilton M. 1983. *International Pig Breed Encyclopedia*. Elanco Animal Health).

Τα ***American Landrace pigs (Large White Pigs)*** (Εικ.4) είναι μια μεσαίου έως μεγάλου μεγέθους ράτσα χοίρου, λευκού χρώματος, με επιμήκη σώματα, μακριές μύτες και βαριά, χαραγμένα αυτιά. Εκτρέφονται κυρίως για την παραγωγή χοιρινού κρέατος. Η αμερικανική *Landrace* προέρχεται από τη δανέζικη *Landrace* (Briggs, Hilton M. 1983. *International Pig Breed Encyclopedia*. Elanco Animal Health).

Τα ***British Landrace pigs (Large White Pig)*** (Εικ.4) είναι μια βρετανική εγχώρια φυλή χοίρων και μία από τις πιο δημοφιλείς στο Ηνωμένο Βασίλειο. Οι χοίροι είναι λευκοί με βαριά αυτιά που καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος του

προσώπου τους και εκτρέφονται για την παραγωγή χοιρινού κρέατος και μπέικον. Η φυλή προέρχεται από τη Σκανδιναβία (Briggs, Hilton M. 1983. International Pig Breed Encyclopedia. Elanco Animal Health).



Εικόνα 1: Duroc pig



Εικόνα 2: Pietrain pig



Εικόνα 3: Welsh pig



Εικόνα 4: Large White Pig

Ο χοίρος αποτελεί σημαντική οικονομική πηγή στην κτηνοτροφία, καθώς χρησιμοποιείται κυρίως για το κρέας του, το χοιρινό κρέας. Για το λόγο αυτό έχουν γίνει αρκετές έρευνες πάνω στον τρόπο αύξησης του ρυθμού ανάπτυξης και διαμόρφωσης των χοίρων, προκειμένου να αυξηθεί η παραγωγή τους.

Παρακάτω, παρατίθενται ενδεικτικά επιθυμητά χαρακτηριστικά των χοίρων:

- Πολυδημία: η ικανότητα γέννησης μεγάλου αριθμού απογόνων (Duijvesteijn et al, 2014)
- Ανθεκτικότητα σε ασθένειες (Stear et al, 2001)
- Ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες (Θερμοανθεκτικότητα) (Gourdine et al, 2016)
- Κατανομή λίπους: χαμηλότερο ποσοστό λίπους κατά μήκος του σκελετού (Hirose et al, 2013)
- Μέση ημερήσια αύξηση βάρους (Hirose et al, 2013)
- Μεγαλύτερο αριθμό θηλών για την τροφοδοσία μεγαλύτερου αριθμού απογόνων χαρακτηριστικό που σχετίζεται και με τον αριθμό πλευρών. Πιο συγκεκριμένα, ο μεγαλύτερος αριθμός πλευρών επιφέρει σχηματισμό μεγαλύτερων σωμάτων και άρα περισσότερες θηλές (Duijvesteijn et al, 2014).

1.2 Γενετική βελτίωση

Ο κλασικός ορισμός της γενετικής βελτίωσης των ζώων αναφέρει ότι:

Η γενετική βελτίωση συνίσταται στην εφαρμογή βιολογικών, οικονομικών και μαθηματικών αρχών με στόχο την ανακάλυψη βέλτιστων στρατηγικών για την εκμετάλλευση της γενετικής ποικιλίας που υπάρχει σε ένα ζωικό είδος, ώστε να μεγιστοποιήσει την αξία του.

Βασίζεται στη χρήση μοριακών δεικτών που είναι συνδεδεμένοι με επιθυμητές χρωμοσωμικές περιοχές. Η χρήση δεικτών δίνει τη δυνατότητα διαλογής των υπό αξιολόγηση γενοτύπων είτε πρόκειται για υλικό στο οποίο θα εφαρμοστεί επιλογή, είτε πρόκειται για έλεγχο απογόνων, ώστε να αξιολογούνται μόνο ζώα που φέρουν την επιθυμητή χρωμοσωμική περιοχή. Η διαδικασία της γενετικής βελτίωσης απαιτεί επιλογή γονέων με υψηλό γενετικό υπόβαθρο και μεταξύ τους διασταύρωση προκειμένου να παράγουν γενετικά βελτιωμένους απογόνους. Η επιστημονική αυτή διαδικασία είναι σύνθετη και απαιτεί συνεργασία με ποικίλους παράγοντες.

Τα βασικά βήματα σε οποιοδήποτε πρόγραμμα γενετικής βελτίωσης είναι:

1. Αναγνώριση των ζώων με τις καλύτερες επιδόσεις για την παραγωγή επόμενης γενιάς με βελτιωμένα χαρακτηριστικά, μια διαδικασία που ονομάζεται "επιλογή" (selection). Ο όρος «καλά ζώα» δε σημαίνει απαραίτητα δυνατά και όμορφα, αλλά ζώα με γενετική ικανότητα να παράγουν περισσότερα.
2. Μεγιστοποίηση της χρήσης των επιλεγμένων ζώων στο πρόγραμμα αναπαραγωγής, διαδικασία που ονομάζεται "πολλαπλασιασμός" (multiplication).

Στην συγκεκριμένη μελέτη, γίνεται προσπάθεια γενετικής βελτίωσης χοίρων με στόχο:

- την παραγωγή χοίρων με αυξημένο αριθμό σπονδύλων (και άρα παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας χοιρινού κρέατος) και
- αυξημένο αριθμό θηλών που προσδίδει στους θηλυκούς χοίρους την ικανότητα να τρέφουν μεγαλύτερο αριθμό νεογνών.

Τα χαρακτηριστικά αυτά, έχουν μελετηθεί εκτενώς σε πλήθος ερευνών (Mikawa et al, 2011 Yang et al 2016 Rohrer et al 2017) με τη χρήση γονιδιωματικών προσεγγίσεων (Arakawa et al, 2015 Wang et al, 2017), πολλές εκ των οποίων κατέληξαν στο συμπέρασμα πως το γονίδιο της βερνίνης σχετίζεται με το χαρακτηριστικό αυτό.

1.3 Γονίδιο Vertnin (VRTN)

Ο αριθμός των πλευρών στους χοίρους, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, (§1.1) αποτελεί σημαντικό φαινοτυπικό χαρακτηριστικό με αυξημένη κληρονομησιμότητα (Fan et al, 2013). Το γεγονός αυτό έχει διεγείρει το ενδιαφέρον των επιστημόνων για έρευνα οικονομικής σημασίας, καθώς το χαρακτηριστικό αυτό είναι σημαντική πηγή εσόδων για την κτηνοτροφία. Από τη μία πλευρά, αποτελεί ισχυρό εργαλείο αναπαραγωγής για τη βελτίωση του αριθμού των σπονδύλων ενώ από την άλλη, καθορίζει το μέγεθος των τεμαχίων κρέατος (φιλέτα) καθώς και τη συνολική διαμόρφωση του σκελετού του ζώου (Burgos et al, 2014).

Έχουν βρεθεί πολλά γονίδια που σχετίζονται με τον αριθμό των σπονδύλων τα οποία χαρτογραφούνται σε διάφορα χρωμοσώματα (*Sus scrofa* chromosomes, (SSC): SSC1, SSC7, SSC12) (Mikawa et al, 2011). Ένα από τα γονίδια που καθορίζει τον αριθμό των πλευρών σε σημαντικό αριθμό θηλαστικών, όπως είναι ο άνθρωπος (*Homo sapiens*), ο χοίρος (*Sus scrofa*) καθώς και ο ποντικός (*Mus musculus*) ονομάζεται **Vertnin**. (Εικ.5A) Συγκεκριμένα, στο χοίρο ο γενετικός τόπος, που σχετίζεται με τον αριθμό των σπονδύλων, εντοπίζεται σε μία περιοχή 947 Kb στο **χρωμόσωμα 7 (SSC 7)**, (Εικ.5B) μέσα στην οποία περιέχεται μια αλληλουχία 100 Kb, όπου βρίσκεται το γονίδιο Vertnin (Fan et al, 2013). Το γονίδιο κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη, που ελέγχει τον αριθμό των σπονδύλων. Η πρωτεΐνη αυτή θεωρείται ότι έχει ικανότητες πρόσδεσης στο DNA, γιατί έχει παρόμοιο μοτίβο με την επικράτεια έλικα – στροφή – έλικα της τρανσποζάσης (Mikawa et al, 2011). Το γονίδιο της vertnin εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία, με αποτέλεσμα οι πολυμορφισμοί του να χρησιμοποιούνται για τη γενετική βελτίωση των χοίρων. Ορθόλογα του γονιδίου έχουν βρεθεί στα πουλιά και τα ψάρια, (Mikawa et al, 2011) γεγονός που καθιστά το γονίδιο σημαντικό ρυθμιστή της σωματογένεσης κατά την ανάπτυξη του εμβρύου (Rohrer et al, 2015).

(A)

VRTN vertebrae development associated [*Sus scrofa* (pig)]

Gene ID: 100157734, updated on 11-Jul-2017

Summary
⌵ ?

Gene symbol	VRTN
Gene description	vertebrae development associated
Gene type	protein coding
RefSeq status	PROVISIONAL
Organism	Sus scrofa
Lineage	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Suina; Suidae; Sus
Orthologs	human mouse all

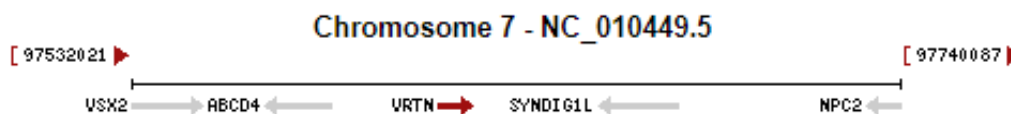
Genomic context
⌵ ?

Location: 7; 7 See VRTN in [Genome Data Viewer](#) [Map Viewer](#)

Exon count: 2

Annotation release	Status	Assembly	Chr	Location
106	current	Sscrofa11.1 (GCF_000003025.6)	7	NC_010449.5 (97614707..97624273)
105	previous assembly	Sscrofa10.2 (GCF_000003025.5)	7	NC_010449.4 (103457506..103467076)

(B)



Εικόνα 5: (A) Πληροφορίες του γονίδιου *VRTN* όπως εμφανίζονται στο NCBI. (B) Το γονίδιο *VRTN* στο χρωμόσωμα 7. (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)

Δύο πολυμορφισμοί έχουν βρεθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στον αριθμό των πλευρών και φαίνεται να βρίσκονται σε πλήρη ανισορροπία σύνδεσης. Οι δύο παραλλαγές του γονιδίου εμφανίζονται σε σχετικά υψηλές συχνότητες σε δυτικές ράτσες (Western pigs) και σε σχετικά χαμηλές σε αρκετές κινέζικες ράτσες (Chinese pigs).

Από τη μία πλευρά, έχει εντοπιστεί ένθεση ενός τμήματος 291 bp στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της *vertnin* (g. 20311_20312ins291). Το τμήμα των 291bp είναι μία επαναλαμβανόμενη αλληλουχία που λειτουργεί ως μεταθετό στοιχείο και η ενσωμάτωσή της στον υποκινητή του γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της φυσιολογικής έκφρασης του γονιδίου, επηρεάζοντας τον αριθμό των πλευρών στο ζώο (Fontanesi et al, 2014 Burgos et al, 2014). Για κάθε αλληλόμορφο, που φέρει την ένθεση (αλληλόμορφο Q), ο αριθμός των θωρακικών σπονδύλων αυξάνεται κατά 1. Ο επιπλέον σπόνδυλος έχει την ικανότητα να αυξήσει το συνολικό μήκος του χοίρου 80mm (Fan et al, 2013).

Το αλληλόμορφο Q είναι πιο συχνό στις ράτσες Italian Landrace & Italian Duroc (Western pigs), με το 71% των μεταλλάξεων να εντοπίζονται στα Landrace pigs, γεγονός που εξηγεί και το μεγάλο μέγεθος της ράτσας (Fontanesi et al, 2014). Οι υπόλοιπες ράτσες εμφανίζουν το αλληλόμορφο Q σπανιότερα, ενώ από τους αγριόχοιρους το αλληλόμορφο απουσιάζει πλήρως (Fan et al, 2013). Έχουν βρεθεί τρεις απλότυποι με κυρίαρχους να είναι ο απλότυπος WT (Wild Type) καθώς και ο απλότυπος Q (το αλληλόμορφο με την ένθεση) (Hirose et al, 2012).

Από την άλλη πλευρά, ο δεύτερος πολυμορφισμός που έχει βρεθεί είναι το SNP 19034 A>C, το οποίο εντοπίζεται στην υπερευαίσθητη περιοχή της DNase I (Fan et al, 2013). Η αλλαγή της βάσης A με τη βάση C πραγματοποιείται στο κωδικόνιο 461 του γονιδίου και έχει ως αποτέλεσμα μία μη νοηματική (missense) μετάλλαξη. Έτσι, το αρχικό κωδικόνιο, που κωδικοποιεί το αμινοξύ Ser, αντικαθίσταται από το κωδικόνιο, που κωδικοποιεί το αμινοξύ Tyr και η παραγόμενη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη προκαλεί την αύξηση του αριθμού των θωρακικών πλευρών στους χοίρους. (Εικ. 6, 7)

Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs705735733

RefSNP	Allele
Organism: pig (<i>Sus scrofa</i>)	Variation Class: SNV: single nucleotide variation
Molecule Type: Genomic	RefSNP Alleles: A/C (FWD)
Created/Updated in build: 143/150	Allele Origin:
Map to Genome Build: 106/Weight 1	Ancestral Allele: Not available
Validation Status:	

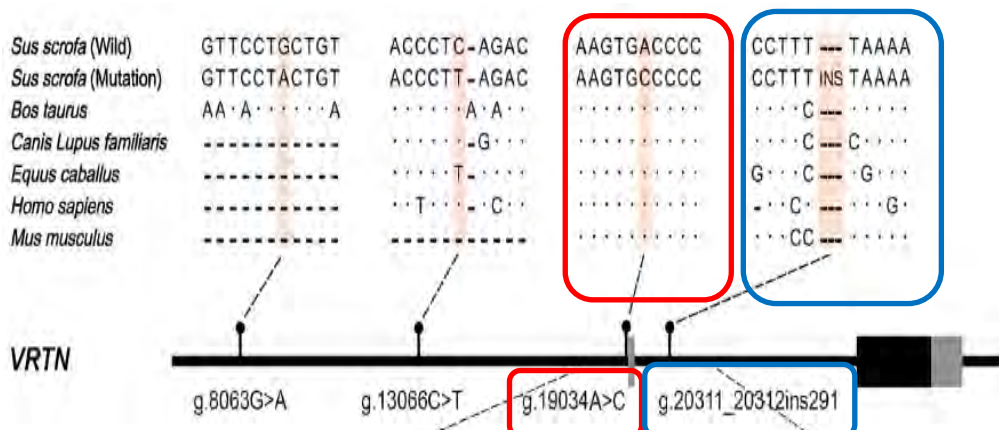
Εικόνα 6: Πληροφορίες του SNP στο NCBI dbSNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)

Gene Model(s)							
Function	mRNA				Protein		
	SNP to mRNA	Accession	Position	Allele change	Accession	Position	Residue change
missense	Fwd	NM_001195113.1	1535	TCT ⇒ TAT	NP_001182042.1	461	S [Ser] ⇒ Y [Tyr]

Εικόνα 7: Η αλλαγή του αμινοξέος στην παραγόμενη πρωτεΐνη (κόκκινο πλαίσιο) καθώς και η θέση του SNP στην αλληλουχία του γονιδίου (πράσινο πλαίσιο), (dbSNP, NCBI).

Το SNP μαζί με την ένθεση βρίσκονται σε ανισορροπία θέσης. Επίσης, εμφανίζουν εξελικτικούς περιορισμούς, καθώς εντοπίζονται αποκλειστικά στους χοίρους (Fan et al, 2013).

Επειδή οι δύο πολυμορφισμοί βρίσκονται σε λειτουργικά στοιχεία ενός ενεργού υποκινητή, πιθανότατα επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου *vertnin* (Εικ.8) (Fan et al, 2013). Ωστόσο, δεν μπορούμε να γνωρίζουμε εάν λειτουργούν συνεργιστικά ή κάποια από αυτές τις μεταλλάξεις συνεισφέρει μόνο στην φαινοτυπική ποικιλομορφία (Yang et al, 2016).

Εικόνα 8: Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου της *VRTN*. Με κόκκινο πλαίσιο οι παραλλαγές του πολυμορφισμού g.19034A>C και με μπλε οι παραλλαγές του πολυμορφισμού g.20311_20312ins291 στους διάφορους οργανισμούς. (Fan et al, 2013)

Πέρα από τους παραπάνω πολυμορφισμούς του γονιδίου, σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των σπονδύλων έχει βρεθεί ότι παίζουν τα γονίδια *Hox*. Έτσι, ο αριθμός τους στα θηλαστικά είναι αρκετά συντηρημένος και συγκεκριμένα γονίδια συμμετέχουν στην ανάπτυξη συγκεκριμένων σπονδύλων (Rohrer et al, 2015). Ειδικότερα, ο γενετικός τόπος στο χρωμόσωμα 7 επηρεάζει τον αριθμό των θωρακικών σπονδύλων, αλλά όχι τον αριθμό των οσφυϊκών της μέσης, ενώ ο γενετικός τόπος στο χρωμόσωμα 1 επηρεάζει τόσο τους ραχιαίους, όσο και τους οσφυϊκούς σπονδύλους (Mikawa et al, 2011 & Nakano et al, 2014). Ο βαθμός της συντήρησης είναι εξαρτώμενος από τη θέση του σπονδύλου: τη μεγαλύτερη συντήρηση την έχει το πρόσθιο άκρο του ζώου (Fan et al, 2013).

1.3.1 Δευτερεύοντα χαρακτηριστικά

Η *VRTN* λειτουργεί ως αποτελεσματικός δείκτης επιλογής για την απόκτηση χοίρων με αυξημένο αριθμό θωρακικών σπονδύλων και χαρακτηριστικών που σχετίζονται με το μήκος, χωρίς, όμως, να επηρεάζεται η ποιότητα του κρέατος. Αυτό συμβαίνει καθώς το γονίδιο *vertnin* σχετίζεται και με άλλα χαρακτηριστικά εκτός από τον αριθμό των σπονδύλων, ενώ οι διαφορετικές παραλλαγές του γονιδίου μπορεί να επηρεάσουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, όπως ο ρυθμός ανάπτυξης, η κατανομή λίπους και η σωματική διαμόρφωση. Ειδικότερα, το γονίδιο εμφανίζει υψηλά θετικές γενετικές συσχετίσεις με χαρακτηριστικά που συνδέονται με το μήκος του ζώου, το δυναμικό περιεχόμενο λίπους αλλά και με τον αριθμό των θηλών, ενώ παρουσιάζει χαμηλές συσχετίσεις με παραγωγικά χαρακτηριστικά καθώς και με το βάρος του ζώου (Nakano et al, 2014).

Ένα από τα πιο χαρακτηριστικά που επηρεάζονται από το γονίδιο *vertnin* είναι οι θηλές των θηλυκών χοίρων. Γενικά, οι θηλές αναπτύσσονται σαν προσάρτημα σε ήδη υπάρχοντες μαστικούς αδένες που σχηματίστηκαν κατά τη διάρκεια της προγεννητικής ζωής. Ο αριθμός των μαστικών αδένων ποικίλει ανάμεσα στα είδη των θηλαστικών. Ακόμα και στους ανθρώπους, που φυσιολογικά σχηματίζουν ζεύγος θηλών, υπάρχουν το λιγότερο έξι άλλες θέσεις για επιπλέον μαστούς, οι οποίοι μπορεί να σχηματίζονται σε όποια πλευρά του σώματος. Κατά την εμβρυονική ζωή, αυτές οι γραμμές υπάρχουν ως ιστολογικά και μοριακά διακριτές ζώνες στην επιφάνεια του εκτοδέρματος, συνδέοντας όλες τις θέσεις όπου οι μαστικοί αδένες μπορεί να σχηματιστούν. Μηχανιστικά, γενετική σύνδεση ανάμεσα στον αριθμό των σπονδύλων και των θηλών μπορεί να εξηγηθεί από τους σωματίτες που είναι οι πρόγονοι των σπονδύλων, όπως και του δερματικού μεσεγγύματος που σχηματίζει τους μαστικούς αδένες (Duijvesteijn et al, 2014).

Καθώς το γονίδιο της *vertnin* σχετίζεται και με τον αριθμό των θηλών, εφαρμόστηκε πίεση στην επιλογή του αριθμού των θηλών, ώστε να υπάρχουν αρκετές θηλές για τον αυξημένο αριθμό των νεογνών. Για το σκοπό αυτό,

έγιναν εκτιμήσεις της αναπαραγωγικής ικανότητας με χρήση τόσο του γονότυπου των θηλυκών, όσο και των αρσενικών χοίρων. SNPs του γονιδίου *vertnin* χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή (Duijvesteijn et al, 2014).

Ένα δεύτερο χαρακτηριστικό που επηρεάζεται από το γονίδιο *vertnin* είναι το διαμυϊκό λίπος στους χοίρους. Έχει βρεθεί σε μελέτες ότι, τα άτομα, που φέρουν την ένθεση, φέρουν λιγότερο διαμυϊκό λίπος από εκείνα χωρίς την ένθεση (wild type pigs) (Burgos et al, 2014).

➤ Πιθανή ανωμαλία που σχετίζονται με τον αυξημένο αριθμό πλευρών:

Παρόλα αυτά, αρκετά άρθρα υπονοούν ότι χοίροι με μεγαλύτερο αριθμό σπονδύλων υποφέρουν από δομικά προβλήματα και δίνουν γέννηση σε νεκρά νεογνά. Οι αναφορές αυτές προσπαθούν να συνδέσουν την σπονδυλική ανάπτυξη με άλλες ανωμαλίες (Rohrer et al, 2015).

1.4 Μοριακοί δείκτες

Ως μοριακός δείκτης μπορεί να χαρακτηριστεί ένας συγκεκριμένος πολυμορφισμός (για παράδειγμα μία ένθεση) ή ένα SNP ορισμένου τμήματος DNA ενός συγκεκριμένου γονιδιώματος. Ο πολυμορφισμός, αυτός, μπορεί να συνδεθεί με κάποια γνωστή γενετική ασθένεια ή να προσδίδει κάποιο πλεονέκτημα στο άτομο που τη φέρει.

Οι μοριακοί δείκτες είναι ευρέως διαδεδομένοι στη διάκριση των πληθυσμών, καθώς (α) ενυπάρχουν στα άτομα (δηλαδή, δεν μπορούν να χαθούν), (β) είναι κληρονομήσιμοι και (γ) δεν απαιτείται θανάτωση του ζώου για τη μελέτη τους.

Τα κριτήρια επιλογής μοριακών δεικτών είναι πολλά και *σχετίζονται τόσο με αυτούς καθ' αυτούς του δείκτες* όπως η αφθονία, ο πολυμορφισμός, η εξειδίκευση για ορισμένο γενετικό τόπο, *όσο και με τη διαδικασία παραγωγής τους*. Αναφορικά με τη διαδικασία παραγωγής τους, θα πρέπει:

1. να δίνει επαναλήψιμα αποτελέσματα,
2. να έχει χαμηλές απαιτήσεις σε ανθρώπινο δυναμικό και τεχνική εξειδίκευση,
3. να έχει μικρό κόστος εφαρμογής και εξέλιξης,
4. να απαιτεί μικρή ποσότητα DNA και
5. να επιδέχεται αυτοματισμούς.

Γενικότερα, υπάρχει ποικιλία μοριακών δεικτών καθώς υπάρχουν πολλά διαφορετικά γονιδιώματα με διαφορετικούς τύπους γενετικών δεικτών (υπερέχοντες, συνυπερέχοντες, πολύ-αλληλομορφικοί).

Υπάρχουν δύο κατηγορίες μοριακών δεικτών: οι DNA και οι πρωτεϊνικοί δείκτες. Οι πρώτοι αφορούν τόσο το πυρηνικό όσο και το εξωπυρηνικό DNA, ενώ στους πρωτεϊνικούς δείκτες ανήκουν τα ισοένζυμα και τα αλλοένζυμα.

Οι DNA ή γενετικοί δείκτες είναι γενετικοί, πολυμορφικοί τύποι, με περισσότερα του ενός αλληλόμορφα, που χρησιμοποιούνται για την παρατήρηση της γενετικής ποικιλότητας. Όμως, οι ίδιοι δεν αποτελούν αντικείμενο πρωταρχικού ενδιαφέροντος. Οι γενετικοί δείκτες μπορεί να προέρχονται από:

1. Αλληλουχίες μιτοχονδριακού (mt) DNA
2. Αλληλουχίες χλωροπλαστικού (cp) DNA
3. Αλληλουχίες πυρηνικού DNA

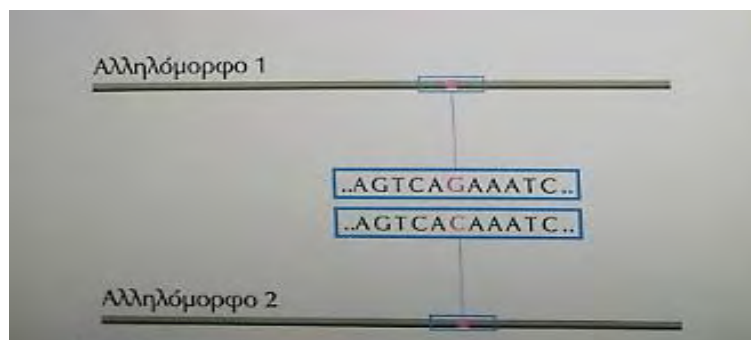
3.1. *Μικροδορυφορικό DNA*: Μικροδορυφόροι” είναι τύποι όπου μικρές αλληλουχίες DNA επαναλαμβάνονται στη σειρά η μια αμέσως μετά την άλλη.

3.2. *Χρωμόσωμα Y*: Μικρό χρωμόσωμα που προσδιορίζει το φύλο ενός ατόμου. Έμβρυα με χρωμόσωμα Y γίνονται αρσενικά. Έτσι, η γενετική πληροφορία του χρωμοσώματος Y είναι μόνο πατρικής προέλευσης.

3.3. *Μιτοχονδριακό DNA*: Το σπέρμα δίνει μόνο γενετικό υλικό και όχι κυτταρικά οργάνδια. Έτσι, όλο το mtDNA προέρχεται από το ωάριο, το οποίο είναι μητρικής προέλευσης

1.4.1 SNP: Πολυμορφισμοί μεμονωμένων νουκλεοτιδίων

Οι πολυμορφισμοί μεμονωμένων νουκλεοτιδίων (SNP) είναι θέσεις του γονιδιώματος, στις οποίες ορισμένα άτομα φέρουν ένα συγκεκριμένο νουκλεοτίδιο, ενώ άλλα άτομα φέρουν ένα διαφορετικό νουκλεοτίδιο (Εικ.12).



Εικόνα 9: Παραλλαγές ενός SNP

Κάθε γονιδίωμα έχει τεράστιο αριθμό SNP. Σε κάθε θέση του γονιδιώματος θα μπορούσε να υπάρχει οποιοδήποτε από τα τέσσερα

νουκλεοτίδια. Έτσι, κατ' αρχήν, κάθε SNP θα έπρεπε να έχει τέσσερα αλληλόμορφα. Θεωρητικά, αυτό είναι δυνατόν αλλά, στην πράξη, οι περισσότεροι SNP υφίστανται έως και δύο παραλλαγές. Αυτό συμβαίνει, επειδή ένα SNP προκύπτει, όταν στο γονιδίωμα συμβεί μία σημειακή μετάλλαξη, η οποία μετατρέπει ένα νουκλεοτίδιο σε ένα άλλο. Αν η μετάλλαξη βρίσκεται στα αναπαραγωγικά κύτταρα του ατόμου, τότε ένας ή περισσότεροι από τους απογόνους του θα μπορούσε να την κληρονομήσει και, μετά από πολλές γενιές, το SNP τελικά να καθιερωθεί στον πληθυσμό. Ωστόσο, υπάρχουν ακριβώς δύο αλληλόμορφα: η αρχική αλληλουχία και η μεταλλαγμένη εκδοχή. Για να προκύψει ένα τρίτο αλληλόμορφο, πρέπει να συμβεί μία νέα μετάλλαξη στην ίδια θέση του γονιδιώματος ενός άλλου ατόμου και, έπειτα, τόσο το ίδιο το άτομο όσο και οι απόγονοί του να αναπαραχθούν κατά τέτοιο τρόπο, ώστε το νέο αλληλόμορφο να καθιερωθεί. Αυτό το σενάριο, αν και εφικτό, είναι μάλλον απίθανο. Συνεπώς, στη συντριπτική πλειονότητα οι SNP υφίστανται σε δύο αλληλόμορφα.

Χρησιμοποιώντας μοριακούς δείκτες που είναι στενά συνδεδεμένοι ή βρίσκονται μέσα σε έναν ή περισσότερους γενετικούς τόπους ποσοτικών χαρακτήρων QTL (Quantitative trait loci), η επιλογή γίνεται περισσότερο αποτελεσματική (marker-assisted selection). Άλλη εφαρμογή αποτελεί η ενσωμάτωση γονιδίων από άγρια είδη με την βοήθεια δεικτών (marker assisted introgression). Επίσης, οι μοριακοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες γενετικής ποικιλομορφίας και ταξονομικών /φυλλογενετικών αναλύσεων διαφορετικών φυτικών ειδών ή πληθυσμών συγκεκριμένων ειδών. Τέλος μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε μελέτες βιολογικών διεργασιών.

❖ PCR

Η PCR έχει αποκτήσει κεντρική σημασία σε πολλούς ερευνητικούς τομείς της μοριακής βιολογίας. Η αντίδραση PCR οδηγεί σε επαναλαμβανόμενη αντιγραφή μιας επιλεγμένης περιοχής ενός μορίου DNA, η οποία εκτελείται από την καθαρή, θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση του *Thermus aquaticus*. Η ανάπτυξη και η εξέλιξη της μεθόδου της PCR έχει δώσει τη δυνατότητα για έλεγχο των μοριακών δεικτών.

1.5 Η συμβολή της Βιοπληροφορικής σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης

Η Βιοπληροφορική είναι ο επιστημονικός χώρος, όπου η σύμπραξη της Βιολογίας με την Πληροφορική, τη Στατιστική και τα Μαθηματικά εξερευνά νέους τρόπους για την προσέγγιση των βιολογικών προβλημάτων, καθώς και την αντίληψη βασικών αρχών της Βιολογίας. Πρόκειται για γνωστικό χώρο με συγκεκριμένο όσο και ευρύ πεδίο εφαρμογών και αλληλεπίδρασης με τη

σύγχρονη δομική, μοριακή, πληθυσμιακή και περιβαλλοντική βιολογία. Ο κλάδος της βιοπληροφορικής σήμερα θεωρείται, παγκόσμια, ένας από τους πλέον αναπτυσσόμενους, ενώ έχει ήδη επιδείξει σημαντικά επιτεύγματα και έχει ιδιαίτερα σημαντικές επενδύσεις.

Οι σημαντικές αλλαγές που συντελέστηκαν τις τελευταίες δεκαετίες στο πεδίο της Μοριακής Βιολογίας, σε συνδυασμό με την εξέλιξη της τεχνολογίας της γονιδιωματικής, αλλά και στη μελέτη της βιοποικιλότητας και της διατήρησης της φύσης, οδήγησαν σε εκθετική αύξηση των πληροφοριών, που παράγονται από τη βιολογική κοινότητα. Το γεγονός αυτό κατέστησε απόλυτα αναγκαία τη διαχείριση, τον έλεγχο και την ανάλυση όλων αυτών των δεδομένων με τελικό σκοπό την αξιοποίησή τους για την εξαγωγή σημαντικών Βιολογικών συμπερασμάτων. Άμεση συνέπεια όλων των παραπάνω, ήταν η ανάγκη για την ανάπτυξη εξειδικευμένων εργαλείων (λογισμικού) αλλά και την προσαρμογή ήδη υπάρχοντων δοκιμασμένων συστημάτων για την αποθήκευση, οπτικοποίηση, και ανάλυση των δεδομένων.

Σύμφωνα με το *National Institutes of Health (NIH)*, η **Βιοπληροφορική** ορίζεται ως η έρευνα, η ανάπτυξη ή η εφαρμογή υπολογιστικών εργαλείων και προσεγγίσεων για την επέκταση της χρήσης δεδομένων βιολογίας, ιατρικής, συμπεριφοράς ή υγείας, συμπεριλαμβανομένων εκείνων για την απόκτηση, αποθήκευση, οργάνωση, αρχειοθέτηση, ανάλυση ή οπτικοποίηση αυτών των δεδομένων.

Υπάρχουν γονιδιώματα, τα οποία, λόγω του μεγέθους τους, είναι δύσκολο να μελετηθούν εύκολα από τους επιστήμονες, καθιστώντας στάσιμη την εξέλιξη των ερευνών. Με τα βιοπληροφορικά εργαλεία μπορούμε να σχεδιάσουμε καταλληλότερα τις προσεγγίσεις για γονοτύπηση, με αποτέλεσμα την ευκολότερη διαχείριση των βιολογικών δεδομένων.

1.6 ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στη γενετική βελτίωση φυλών χοίρων *Sus scrofa* με τη χρήση μοριακών δεικτών. Με αυτό τον τρόπο, επιτυγχάνεται η επιλογή χοίρων με βελτιωμένα χαρακτηριστικά, που τους προσδίδουν πλεονέκτημα. Στη συνέχεια, η διασταύρωση των ζώων που πλεονεκτούν, μεταξύ τους έχει ως στόχο την απόκτηση απογόνων με βελτιωμένα χαρακτηριστικά. Το μέσο για την πραγματοποίηση είναι η χρήση πολυμορφικών δεικτών (στην προκειμένη περίπτωση: οι δείκτες χαρτογραφούνται στο γονίδιο της Βερτνίνης (Vertnin)) για την ταυτοποίηση του γονότυπου του κάθε ζώου.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Αντιδραστήρια

Acrylamide

Agarose

Bis-Acrylamide

Bromophenol Blue

SDS

dNTPs

EDTA

EtOH

Proteinase K

HCl 37%

NaOH

Formaldehyde

MgCl₂ x 6H₂O

NaBH₄

TEMED

AgNO₃

100bp Ladder

Kappa Taq Polymerase

2.2 Μέθοδοι

❖ Δείγματα

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία απομονώθηκαν από αίμα χοίρων και απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2):

Πίνακας 2: Οι κωδικοί των δειγμάτων και οι αντίστοιχες ράτσες τους

<u>Sample code</u>	<u>Race</u>	<u>Sex</u>	<u>Tube</u>
694	Duroc	female	1
680	Duroc	female	2
6473	Large White	female	3
6307	Large White	female	4
6447	Large White	female	5
6534	Large White	female	6
8484	Pietrain	female	7
7141	Welsh	female	8
6511	Large White	female	9
6545	Large White	female	10
702	Duroc	female	11
6480	Large White	female	12
6378	Large White	female	13
6306	Large White	female	14
7105	Welsh	female	15
690	Duroc	female	16
2026	Landrace	female	17
6381	Large White	female	18
6496	Large White	female	19
6373	Large White	female	20
691	Duroc	female	21
6280	Large White	female	22
2044	Landrace	female	23
6379	Large White	female	24
663	Duroc	female	25
6398	Large White	female	26
6446	Large White	female	27
668	Duroc	female	28
5180	Large White	female	29
6490	Large White	female	30
6552	Large White	female	31
2056	Landrace	female	32
6380	Large White	female	33
2053	Landrace	female	34
670	Duroc	female	35
6364	Large White	female	36
6397	Large White	female	37

<u>Sample code</u>	<u>Race</u>	<u>Sex</u>	<u>Tube</u>
6315	Large White	female	38
6547	Large White	female	39
6488	Large White	female	40
2059(2052)	Landrace	female	41
6445	Large White	female	42
7159	Welsh	female	43
6487	Large White	female	44
7150	Welsh	female	45
3221	Pietrain	female	46
O111501	Large White	female	47
O117305	Large White	female	48
7098	Welsh	male	49
O100901	Large White	female	50
O116206	Large White	female	51
O107106	Large White	female	52
O110101	Large White	female	53
O116305	Large White	female	54
O101304	Large White	female	55
O102202	Large White	female	56
O100301	Large White	female	57
O115602	Large White	female	58
O115804	Large White	female	59
8041	Pietrain	female	60
O100603	Large White	female	61
O107404	Large White	female	62
4975	Large White	male	63
O100403	Large White	female	64
O112302	Large White	female	65
O115503	Large White	female	66
O105202	Large White	female	67
6375	Large White	male	68
O102404	Large White	female	69
O113902	Large White	female	70
O102506	Large White	female	71
O552	Duroc	male	72
2042	Landrace	male	73
8468	Pietrain	female	74
O101709	Large White	female	75
O115704	Large White	female	76
O116401	Large White	female	77
O100506	Large White	female	78
O114807	Large White	female	79
4175	Large White	male	80
O101203	Large White	female	81
O111403	Large White	female	82
O110402	Large White	female	83
O105102	Large White	female	84

2.2.1 Για την ταυτοποίηση της ένθεσης

A. Σχεδιασμός Εκκινητών

Οι εκκινητές, που χρησιμοποιήθηκαν, στη συγκεκριμένη μελέτη, προήλθαν από συγκεκριμένη βιβλιογραφία. Πιο συγκεκριμένα, οι Fan και οι συνεργάτες (2013) μελέτησαν την επίδραση της ένθεσης *g. 20311_20312ins291* στον αριθμό των θωρακικών σπονδύλων. Στον παρακάτω πίνακα, παρατίθενται οι αλληλουχίες των εκκινητών:

Fw	5'- GGC AGG GAA GGT GTT TGT TA - 3'
Rv	5'- GAC TGG CCT CTG TCC CTT G - 3'

B. Απομόνωση DNA

Το ολικό γενωμικό DNA απομονώθηκε από αίμα, που είχε ληφθεί από το κάθε ζώο ξεχωριστά, σύμφωνα με τη διαδικασία που προέβλεπε το NucleoSpin® Tissue “Genomic DNA from tissue” kit. Πριν την προσθήκη των διαλυμάτων του kit, ποσότητα αίματος (1mL) προστέθηκε σε erpendorf tubes 2mL, ακολούθησε προσθήκη 1mL SSC και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1'. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε δύο φορές, ώστε να απομακρυνθούν τα συστατικά του πλάσματος και να απομονωθούν μόνο τα κύτταρα. Στη συνέχεια, προστέθηκαν στα tubes 10μL proteinase K (10mg/μL), η οποία προκαλεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και προστατεύει το DNA από τη δράση νουκλεασών.. Τα Eppendorf με το διάλυμα της proteinase K επωάστηκαν στους 55°C για 2h περίπου. Ακολούθησε η προσθήκη των υπόλοιπων διαλυμάτων του kit.

Γ. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης

Το DNA, που απομονώθηκε, ηλεκτροφορήθηκε σε gel αγαρόζης 1% και φωτομετρήθηκε στα 260nm ώστε, να γίνει ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των δειγμάτων. Η ηλεκτροφόρηση μας δίνει πληροφορίες για την ακεραιότητα του απομονωμένου DNA και μια πρώτη ένδειξη της ποσότητας, η οποία προσδιορίζεται ακριβέστερα μέσω της φωτομέτρησης.

Για την παρασκευή της πήκτης αγαρόζης 1%, διαλύσαμε 0,3gr αγαρόζης σε 50 mL TAE 1x με θέρμανση και στη συνέχεια προσθέσαμε 1μL της χρωστικής SERVA® Electrophoresis GmbH. Η χρωστική προστίθεται για να είναι ορατές οι ζώνες του DNA κατά την παρατήρηση της πήκτης στη συσκευή UV. Όταν πήξει το gel αγαρόζης, αυτό τοποθετείται σε ειδική συσκευή και τα

δείγματα μαζί με ειδικό loading buffer φορτώνονται στις εξής ποσότητες: σε 3μL DNA προστίθενται 3μL loading buffer.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε 150 Volts και ακολούθησε οπτική παρατήρηση σε συσκευή UV.

Για τη φωτομέτρηση, χρησιμοποιείται δείγμα αραιωμένου DNA σε φωτόμετρο Eppendorf, το οποίο διαθέτει επιλογές για την άμεση μετατροπή της τιμής απορρόφησης σε τιμές συγκέντρωσης DNA στο διάλυμα.

Δ. PCR – Συνθήκες – Ποσότητες

Η PCR, που πραγματοποιήθηκε, αποτελούνταν από 40 κύκλους. Η συνολική ποσότητα του κάθε διαλύματος PCR (ποσότητα DNA + ποσότητα από το mix) ήταν 50 μL και για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν Eppendorf tubes ειδικά για PCR. Το κάθε tube περιείχε τα εξής συστατικά στις παρακάτω ποσότητες (Πίνακας 3):

Πίνακας 3: Τα αντιδραστήρια της PCR και οι αντίστοιχες ποσότητές τους

<u>Συστατικά</u>	<u>Αρχική συγκέντρωση</u>	<u>Τελική συγκέντρωση</u>	<u>Ποσότητες/ tube pcr</u>
Buffer 10x	10x	1x	5 μL
MgCl ₂	50mM	2mM	2 μL
Primers Fw	50pM	1pM	1 μL
Primers Rv	50pM	1pM	1 μL
dNTPs	10mM	0,2 mM	1 μL
DNA πολυμεράση: <i>Kappa Taq</i>	5 U/μL	1 U	0,2 μL
Εκμαγείο DNA	100ng		
ddH₂O έως	50 μL		

Οι συνθήκες της αντίδρασης της PCR παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4):

Πίνακας 4: Οι συνθήκες της αντίδρασης της PCR που χρησιμοποιήθηκαν.

<u>Στάδια</u>	<u>Θερμοκρασίες / Χρόνοι</u>
Αρχική Αποδιάταξη	89°C για 4 min
Αποδιάταξη (Denaturing stage)	95°C για 20 sec
Υβριδισμός εκκινητών (Annealing stage)	56°C για 20 sec
Επιμήκυνση (Extending stage)	72°C για 20 sec
Τελική επιμήκυνση	72°C για 10min

} 40 κύκλοι

Μετά το τέλος της PCR, τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης 2% ώστε να ελεγχθεί η επιτυχία της αντίδρασης.

E. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Κύριοι στόχοι της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης είναι η ποσοτικοποίηση και ο έλεγχος της ποιότητας των προϊόντων της PCR. Στην προκειμένη περίπτωση, τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης 2%, προκειμένου να διαχωριστούν με βάση το μέγεθός τους. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA (ladder 100bp).

Για την παρασκευή της πηκτής αγαρόζης 2%, διαλύσαμε 0,6gr αγαρόζης σε 50 mL TAE 1x με θέρμανση και στη συνέχεια προσθέσαμε 1μL της χρωστικής SERVA© Electrophoresis GmbH. Η χρωστική προστίθεται για να είναι ορατές οι ζώνες του DNA κατά την παρατήρηση της πηκτής στη συσκευή UV. Όταν πήξει το gel αγαρόζης, τοποθετείται σε ειδική συσκευή και τα δείγματα μαζί με ειδικό loading buffer φορτώνονται στις εξής ποσότητες: σε 3μL προϊόντος PCR προστίθενται 5μL loading buffer.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε 150 Volts και ακολούθησε οπτική παρατήρηση σε συσκευή UV.

ΣΤ. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

Τα δείγματα, στη συνέχεια, ηλεκτροφορήθηκαν σε gel πολυακρυλαμίδης με στόχο τη μελέτη των διαφορών, που εμφανίζουν στο μέγεθός τους.

❖ Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης 10%

Για την παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης 10% χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 5: Οι ποσότητες των συστατικών για την δημιουργία gel πολυακρυλαμιδης 10%.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ποσότητες</i>
Acrylamide	6,25 g
Bis-Acrylamide	0,16 g
TBE 10%	6,5 mL
Urea	8gr
TEMED**	62,5 μ L
APS 20%**	375 μ L
<i>H2O έως</i>	<i>62,5mL</i>

** Πριν την προσθήκη του TEMED και του APS, το διάλυμα φιλτράρεται σε έναν ογκομετρικό σωλήνα και μόλις ο τελικός όγκος του διαλύματος είναι 62,5mL προστίθεται το TEMED και το APS. Το τελικό διάλυμα εισάγεται στο ειδικό καλούπι προκειμένου να πήξει.

Μετά την πήξη του gel, 10 μ L του κομμένου DNA φορτώνονται στο gel μαζί με 1 μ L Ladder 100bp και 3 μ L άκοππου DNA. Για την ηλεκτροφόρηση του DNA χρησιμοποιήθηκαν 3 μ L χρωστικής SERVA© Electrophoresis GmbH για κάθε δείγμα DNA που φορτώθηκε.

❖ Χρώση της πηκτής με νιτρικό άργυρο

Η τεχνική αυτή γίνεται προκειμένου να εμφανιστούν τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης. Ο νιτρικός άργυρος χρησιμοποιείται γιατί έχει την ικανότητα να προσδένεται στο DNA. Στη συνέχεια, αντιδρά με το διάλυμα της φορμαλδεΐδης, που προστίθεται, παρουσία βάσης (NaOH) εμφανίζοντας τις ζώνες του DNA με καφέ χρώμα σε κίτρινο gel.

Για τη χρώση χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα (οι ποσότητες των οποίων αντιστοιχούν για τη χρώση ενός μόνο gel):

Διάλυμα No. 1: (400mL)

0,5mL οξικού οξέος και απεσταγμένο νερό (ddH₂O) έως τα 400mL

Διάλυμα No. 2: (200mL)

0,2g νιτρικού αργύρου διαλύεται με ανάδευση σε 200mL απεσταγμένου νερού (ddH₂O)

Διάλυμα No. 3: (200mL)

Προσθήκη απεσταγμένου νερού (ddH₂O) μέχρι τα 200mL σε κωνική φιάλη που περιέχει 3gr NaOH, ~0,01gr NaBH₄ (διαβρωτικό) & 1mL φορμαλδεΐδης.

Μεθοδολογία

1. Πλύση των πηκτών με 200mL του διαλύματος 1 για περίπου 2 min.

2. Μετά το πέρας των 2 min, το διάλυμα απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται το πρώτο βήμα.
3. Οι πηκτές ξεπλένονται από το πρώτο διάλυμα με ανάδευση σε απεσταγμένο νερό για περίπου 1 min.
4. Ακολουθεί η προσθήκη του διαλύματος νιτρικού αργύρου. Οι πηκτές παραμένουν εμβαπτισμένες στο διάλυμα για περίπου 15 min.
5. Μετά την απόρριψη του διαλύματος, οι πηκτές ξεπλένονται δύο φορές με απιονισμένο νερό (1 min η κάθε πλύση).
6. Προσθήκη του διαλύματος 3, το οποίο παραμένει μέχρι την εμφάνιση των ζωνών στην πηκτή.
7. Τέλος, πραγματοποιείται μία τελευταία πλύση με απιονισμένο νερό για περίπου 1 min, προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του αργύρου που έχει παραμείνει στο gel.

Με το πέρας της διαδικασίας, οι πηκτές εισάγονται σε ζελατίνη, ώστε να προστατευτεί από αλλοίωση και μελετάται. Μ' αυτόν τον τρόπο, προσδιορίζονται οι γονότυποι των ατόμων.

2.2.2 Για την ταυτοποίηση του SNP (19034 A>C)

Για την ταυτοποίηση του SNP, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Sequenom UNIT MassARRAY iPLEX Platform. Το πρόγραμμα MassARRAY Designer ελέγχει και αποτρέπει τον συνδυασμό των εκκινητών και την nontemplate επέκταση προϊόντων που πιθανά θα οδηγούσε σε μη ειδική επέκταση. Το λογισμικό Sequenom RealSNP χρησιμοποιείται για την επισήμανση αλληλουχιών και την ανίχνευση εκκινητών PCR πάνω σε συγκεκριμένο γονιδίωμα (ώστε να επικυρωθεί ότι θα παράγεται μόνο ένα μοναδικό προϊόν ενίσχυσης, το οποίο θα περιέχει τον στόχο για έναν εκτεταμένο εκκινητή).

Για την πραγματοποίηση της τεχνικής, απομονώθηκε γενωμικό DNA και προσδιορίστηκε, με τη βοήθεια προγραμμάτων βιοπληροφορικής, η αλληλουχία που περιβάλλει την πολυμορφική θέση. Πιο συγκεκριμένα, απαιτείται η αλληλουχία 150 βάσεων εκατέρωθεν του SNP, όπως παρουσιάζεται παρακάτω. Τα δείγματα, αφού προετοιμάστηκαν, στάλθηκαν στην εταιρεία BGI όπου και πραγματοποιήθηκε η γονοτύπηση.

>VRTN_19034

```

OOOCTOOOOCAAACTCTTTGGAAATCTTTCAACTTTCTTTCAAGTTTCTGCGGCGAGCTCGGGAATCT
GAGCTAGGTCAGGGCGCTTTACACOOOOCAGCTGGGTAGAGTGGACGAGACAATAGCTGCTATCAC
TTTACCATTTGGAAGTG[A/C]OOOOCGAATTTGCACCTCTTTTCATCTCGGGACTGCAGCACTTGAGGGT

```

GGGOGATTTCTGGGGGGAGTGGCTTAAGCCGCTTCTOCAOOGAOCAGTTGGCTGTAGACGGTCCAT
GCTCAATGGTCCACCACAGATATGAAAACA

Όπως φαίνεται, η θέση του SNP παρουσιάζεται με τη μορφή [Νουκλεοτίδιο_1/Νουκλεοτίδιο_2], ώστε να είναι δυνατός ο σχεδιασμός των ειδικών εκκινητών για κάθε αλληλόμορφο.

Η μέθοδος Sequenom UNIT MassARRAY iPLEX Platform αποτελείται από: μία αρχική τοποειδική αντίδραση PCR, η οποία ακολουθείται από μία επίσης τοποειδική αντίδραση επέκτασης εκκινητών (αντίδραση iPLEX). Στην προκειμένη περίπτωση, οι εκκινητές προσδένονται ακριβώς πριν την πολυμορφική θέση, που έχει γονοτυπηθεί.

Η αρχική τοποειδική αντίδραση PCR αποσκοπεί στην ενίσχυση ενός συγκεκριμένου θραύσματος γενωμικού DNA, ώστε να προσδιοριστεί ο γονότυπος αυτού του θραύσματος στην πλατφόρμα Sequenom. Έτσι, επιτυγχάνεται ομοιόμορφη ενίσχυση μεμονωμένων τόπων DNA με ελάχιστα μη ειδικά παραπροϊόντα. Ακολούθησε απομάκρυνση των dNTPs, που δεν ενσωματώθηκαν, από τα ενισχυμένα προϊόντα, με τη βοήθεια μιας αλκαλικής φωσφατάσης.

Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την αντίδραση iPLEX, κατά την οποία οι εκκινητές σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο ώστε 40 διαφορετικοί προσδιορισμοί SNP να μπορούν να ενισχυθούν και να αναλυθούν σε ένα μείγμα PCR. Η αντίδραση iPLEX χρησιμοποιεί dNTPs, αλλά η ανίχνευση του αλληλόμορφου SNP εξαρτάται από την πραγματική μάζα του προϊόντος επέκτασης και όχι από ένα φθορίζον μόριο. Μετά την αντίδραση, τα προϊόντα καθαρίζονται, καθώς διέρχονται από πολτό ρητίνης, η οποία απομακρύνει άλατα, όπως ιόντα Na⁺, K⁺ και Mg²⁺, μια διαδικασία απαραίτητη για τη βελτίωση της ανάλυσης των προϊόντων με φασματομετρία μάζας. Στην περίπτωση, που δεν αφαιρεθούν τα ιόντα, μπορούν να προκαλέσουν υψηλό «θόρυβο» στα φάσματα μάζας.

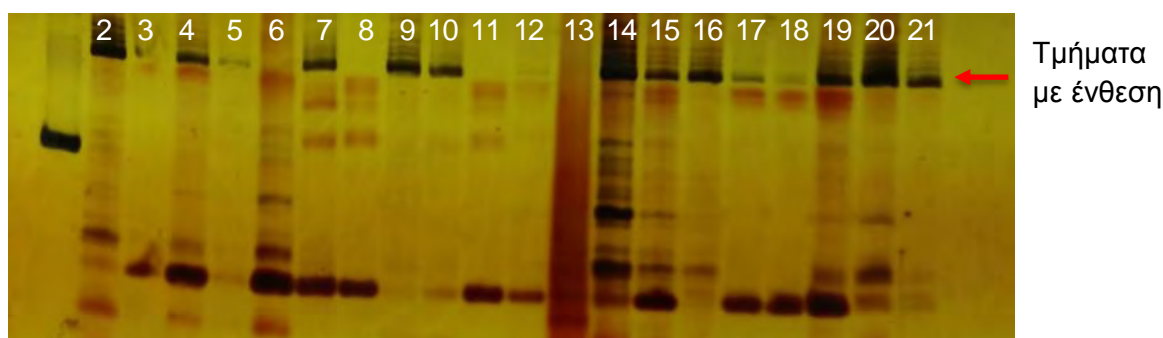
Τέλος, το πρωτόκολλο περιγράφει ανίχνευση των εκτεταμένων προϊόντων, χρησιμοποιώντας ένα φασματόμετρο μάζας MassARRAY Compact και λογισμικό real-time ανίχνευσης Sequenom.

3. Αποτελέσματα

A. Για την ταυτοποίηση της ένθεσης (g.20311_20312ins291)

Τα τμήματα, που φέρουν την ένθεση, είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος και δεν μπορούν να «τρέξουν» σε μεγάλη απόσταση κατά μήκος του gel. Αντίθετα, τα τμήματα, που δεν έχουν ενσωματώσει την επιπλέον αλληλουχία, είναι μικρότερα και μετακινούνται περισσότερο κατά μήκος του gel. Έτσι, τα άτομα, που είναι ομόζυγα για την ένθεση (BB), εμφανίζουν μία έντονα σκούρα ζώνη σχετικά ψηλά στο gel (περίπου στα 400bp σύμφωνα με το ladder), τα άτομα, που είναι ομόζυγα για το αλληλόμορφο, χωρίς την ένθεση (SS), εμφανίζουν μία έντονη σκούρα μπάντα χαμηλότερα στο gel, ενώ άτομα, που είναι ετερόζυγα για την ένθεση (BS), εμφανίζουν δύο ζώνες: μία ζώνη στα 400bp και μία στα 100bp.

Παρακάτω, εμφανίζονται, ενδεικτικά, τα αποτελέσματα, που πήραμε:



Εικόνα 10: Οι γονότυποι των δειγμάτων 2 με 21. Τα δείγματα: 2,9,16,21 είναι ομόζυγα για την ένθεση (BB) ενώ τα 3,6,8,11,12,18 είναι ομόζυγα χωρίς την ένθεση (SS). Τα υπόλοιπα άτομα είναι ετερόζυγα (BS).

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6) παρατίθενται οι γονότυποι των χοίρων για την ένθεση:

Πίνακας 6: Οι γονότυποι των χοίρων που προέκυψαν.

<u>Tube</u>	<u>Sample code</u>	<u>Race</u>	<u>Sex</u>	<u>VRTNins.</u>
2	680	Duroc	female	BB
3	6473	Large White	female	SS
4	6307	Large White	female	BS
5	6447	Large White	female	BS
6	6534	Large White	female	SS
7	8484	Pietrain	female	BS
8	7141	Welsh	female	SS
9	6511	Large White	female	BB

<u>Tube</u>	<u>Sample code</u>	<u>Race</u>	<u>Sex</u>	<u>VRTNins.</u>
10	6545	Large White	female	BS
11	702	Duroc	female	SS
12	6480	Large White	female	SS
13	6378	Large White	female	SS
14	6306	Large White	female	BS
15	7105	Welsh	female	BS
16	690	Duroc	female	BB
17	2026	Landrace	female	BS
18	6381	Large White	female	SS
19	6496	Large White	female	BS
20	6373	Large White	female	BS
21	691	Duroc	female	BB
22	6280	Large White	female	BB
23	2044	Landrace	female	BS
24	6379	Large White	female	BS
25	663	Duroc	female	SS
26	6398	Large White	female	BS
27	6446	Large White	female	BS
28	668	Duroc	female	BS
29	5180	Large White	female	BS
30	6490	Large White	female	BS
31	6552	Large White	female	BS
32	2056	Landrace	female	SS
33	6380	Large White	female	BS
34	2053	Landrace	female	SS
35	670	Duroc	female	BS
36	6364	Large White	female	BS
37	6397	Large White	female	BS
38	6315	Large White	female	BB
39	6547	Large White	female	BB
40	6488	Large White	female	BS
41	2059(2052)	Landrace	female	BS
42	6445	Large White	female	BS
43	7159	Welsh	female	BS
44	6487	Large White	female	SS
45	7150	Welsh	female	BS
46	3221	Pietrain	female	BS
47	O111501	Large White	female	BS
48	O117305	Large White	female	BS
49	7098	Welsh	male	SS
50	O100901	Large White	female	BB
51	O116206	Large White	female	SS
52	O107106	Large White	female	BS
53	O110101	Large White	female	SS

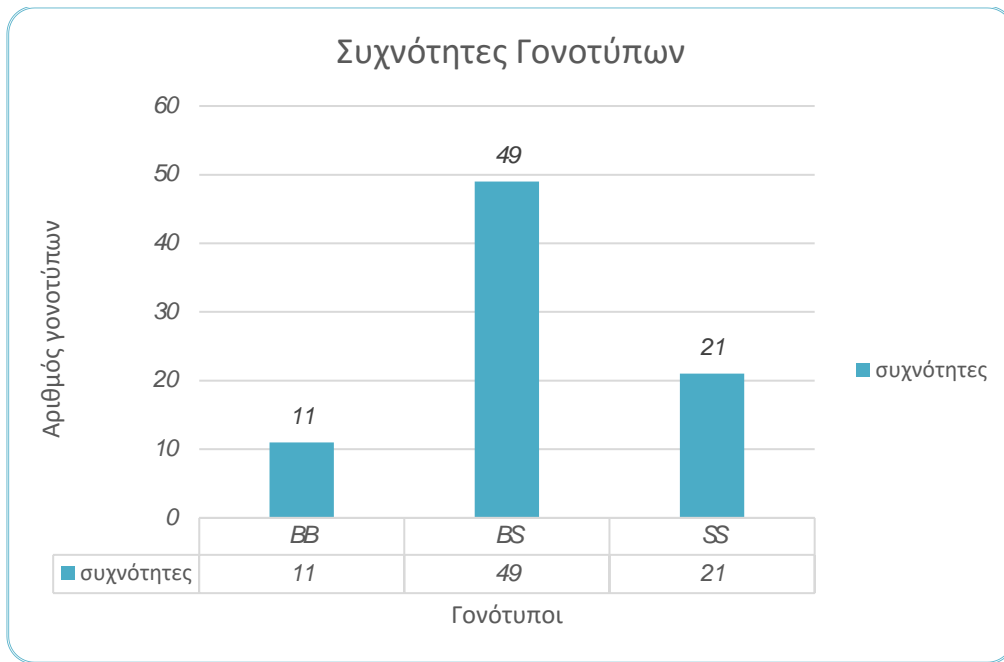
<u>Tube</u>	<u>Sample code</u>	<u>Race</u>	<u>Sex</u>	<u>VRTNins.</u>
54	O116305	Large White	female	BS
55	O101304	Large White	female	BS
56	O102202	Large White	female	SS
57	O100301	Large White	female	BS
58	O115602	Large White	female	SS
59	O115804	Large White	female	BS
60	8041	Pietrain	female	SS
61	O100603	Large White	female	BB
62	O107404	Large White	female	BS
63	4975	Large White	male	SS
64	O100403	Large White	female	BS
65	O112302	Large White	female	BS
66	O115503	Large White	female	BS
67	O105202	Large White	female	BS
69	O102404	Large White	female	BS
70	O113902	Large White	female	BS
71	O102506	Large White	female	BS
72	O552	Duroc	male	BB
73	2042	Landrace	male	SS
74	8468	Pietrain	female	BS
75	O101709	Large White	female	BS
77	O116401	Large White	female	BS
78	O100506	Large White	female	BS
79	O114807	Large White	female	BS
80	4175	Large White	male	BS
81	O101203	Large White	female	SS
82	O111403	Large White	female	BB
83	O110402	Large White	female	SS
84	O105102	Large White	female	BS

Παρακάτω παρατίθενται τα στατιστικά ανά γονότυπο (Πίνακας 7) και ανά αλληλόμορφο (Πίνακας 8) καθώς και οι αντίστοιχες συχνότητές τους.

A) Γονότυποι

Πίνακας 7: Συχνότητες γονοτύπων

$f(\text{BB}) = 11/81 = 0,136$
$f(\text{BS}) = 49/81 = 0,605$
$f(\text{SS}) = 21/81 = 0,259$

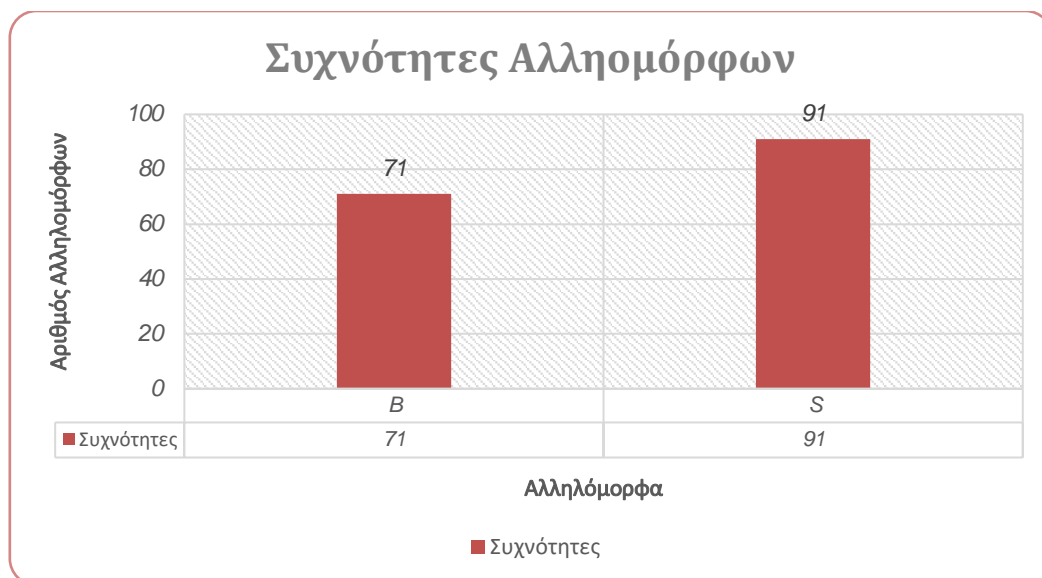


Εικόνα 11: Συχνότητες γονοτύπων

Β) Αλληλόμορφα

Πίνακας 8: Συχνότητες αλληλομόρφων

$f(B) = 71/162 = 0,44$
$f(S) = 91/162 = 0,56$



Εικόνα 12: Συχνότητες αλληλομόρφων

B. Για την ταυτοποίηση του SNP (g.19034 A>C)

Τα αποτελέσματα της μεθόδου Sequenom UNIT MassARRAY iPLEX Platform απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 9):

Πίνακας 9: Οι γονότυποι των χοίρων που προέκυψαν από τη μέθοδο Sequenom UNIT MassARRAY iPLEX Platform

<i>Tube</i>	<i>Sample code</i>	<i>Race</i>	<i>Sex</i>	<i>VRTN 19034 SNP</i>
1	694	Duroc	female	CC
2	680	Duroc	female	CC
3	6473	Large White	female	CA
4	6307	Large White	female	CA
5	6447	Large White	female	CC
6	6534	Large White	female	AA
7	8484	Pietrain	female	CA
8	7141	Welsh	female	AA
9	6511	Large White	female	CC
10	6545	Large White	female	CC
11	702	Duroc	female	AA
12	6480	Large White	female	CA
13	6378	Large White	female	CA
14	6306	Large White	female	CC
15	7105	Welsh	female	CA
16	690	Duroc	female	CC
17	2026	Landrace	female	CA
18	6381	Large White	female	CA
19	6496	Large White	female	CA
20	6373	Large White	female	CC
21	691	Duroc	female	CC
22	6280	Large White	female	CC
23	2044	Landrace	female	CA
24	6379	Large White	female	CC
25	663	Duroc	female	AA
26	6398	Large White	female	CC
27	6446	Large White	female	CC
28	668	Duroc	female	CA
29	5180	Large White	female	CC
30	6490	Large White	female	CA
32	2056	Landrace	female	AA
33	6380	Large White	female	CC
34	2053	Landrace	female	CA
35	670	Duroc	female	CA
36	6364	Large White	female	CC
37	6397	Large White	female	CA
38	6315	Large White	female	CC

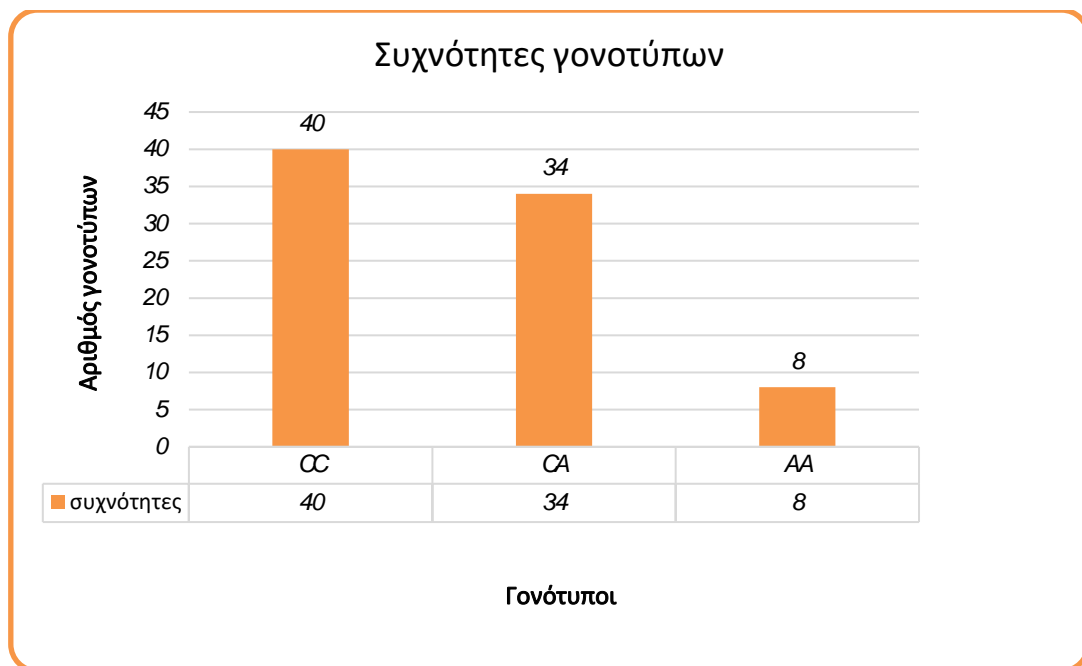
<u>Tube</u>	<u>Sample_code</u>	<u>Race</u>	<u>Sex</u>	<u>VRTN_19034_SNP</u>
39	6547	Large White	female	CC
40	6488	Large White	female	CA
41	2059(2052)	Landrace	female	CA
42	6445	Large White	female	CC
43	7159	Welsh	female	CA
44	6487	Large White	female	AA
45	7150	Welsh	female	CC
46	3221	Pietrain	female	CC
47	O111501	Large White	female	CA
48	O117305	Large White	female	CA
49	7098	Welsh	male	CA
50	O100901	Large White	female	CC
51	O116206	Large White	female	CC
52	O107106	Large White	female	CC
53	O110101	Large White	female	CA
54	O116305	Large White	female	CA
55	O101304	Large White	female	CA
56	O102202	Large White	female	AA
57	O100301	Large White	female	CC
58	O115602	Large White	female	CA
59	O115804	Large White	female	CC
60	8041	Pietrain	female	CA
61	O100603	Large White	female	CC
62	O107404	Large White	female	CC
63	4975	Large White	male	CC
64	O100403	Large White	female	CC
65	O112302	Large White	female	CA
66	O115503	Large White	female	CC
67	O105202	Large White	female	CC
68	6375	Large White	male	CC
69	O102404	Large White	female	CA
70	O113902	Large White	female	CA
71	O102506	Large White	female	CC
72	O552	Duroc	male	CA
73	2042	Landrace	male	CC
75	O101709	Large White	female	CA
76	O115704	Large White	female	CA
77	O116401	Large White	female	CA
78	O100506	Large White	female	CC
79	O114807	Large White	female	CC
80	4175	Large White	male	CC
81	O101203	Large White	female	CA
82	O111403	Large White	female	CC
83	O110402	Large White	female	AA
84	O105102	Large White	female	CC

Παρακάτω παρατίθενται τα στατιστικά ανά γονότυπο (Πίνακας 10) και ανά αλληλόμορφο (Πίνακας 11) καθώς και οι αντίστοιχες συχνότητές τους.

(A) Γονότυποι:

Πίνακας 10: Συχνότητες γονοτύπων

$f(CC) = 40/82 = 0,49$
$f(CA) = 34/82 = 0,42$
$f(AA) = 8/82 = 0,09$

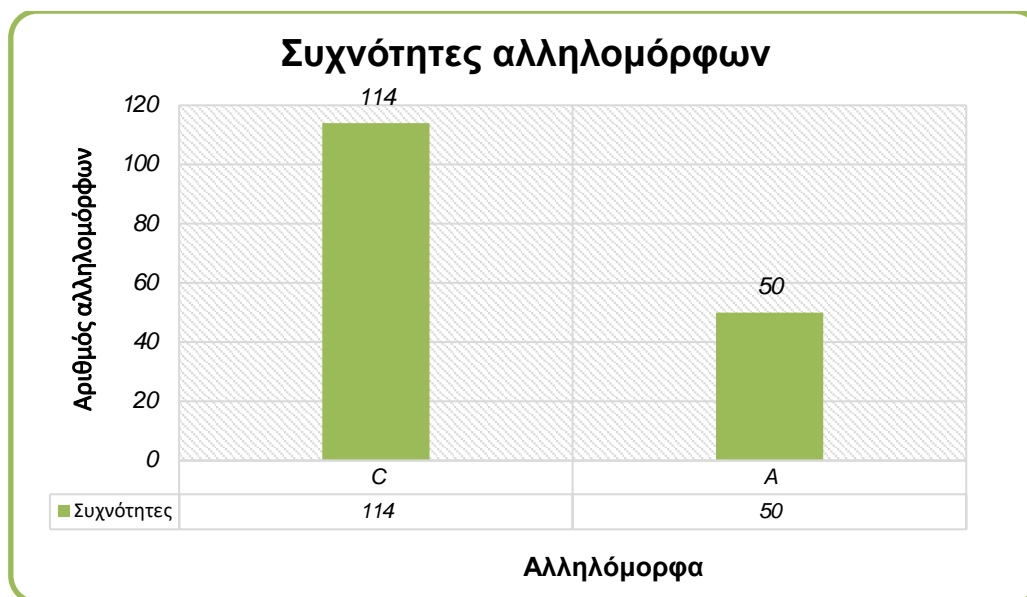


Εικόνα 13: Συχνότητες γονοτύπων

(B) Αλληλόμορφα:

Πίνακας 11: Συχνότητες αλληλομόρφων

$f(C) = 114/164 = 0,70$
$f(A) = 50/164 = 0,30$



Εικόνα 14: Συχνότητες αλληλομόρφων

Στον παρακάτω πίνακα, συνοψίζονται οι γονότυποι όλων των δειγμάτων για τις δύο πολυμορφικές θέσεις (Insertion & SNP).

<u>Tube</u>	<u>Sample code</u>	<u>Race</u>	<u>Sex</u>	<u>Insertion</u>	<u>SNP 19034</u>
1	694	Duroc	female		CC
2	680	Duroc	female	BB	CC
3	6473	Large White	female	SS	CA
4	6307	Large White	female	BS	CA
5	6447	Large White	female	BS	CC
6	6534	Large White	female	SS	AA
7	8484	Pietrain	female	BS	CA
8	7141	Welsh	female	SS	AA
9	6511	Large White	female	BB	CC
10	6545	Large White	female	BS	CC
11	702	Duroc	female	SS	AA
12	6480	Large White	female	SS	CA
13	6378	Large White	female	SS	CA
14	6306	Large White	female	BS	CC
15	7105	Welsh	female	BS	CA
16	690	Duroc	female	BB	CC
17	2026	Landrace	female	BS	CA
18	6381	Large White	female	SS	CA
19	6496	Large White	female	BS	CA
20	6373	Large White	female	BS	CC
21	691	Duroc	female	BB	CC
22	6280	Large White	female	BB	CC
23	2044	Landrace	female	BS	CA
24	6379	Large White	female	BS	CC
25	663	Duroc	female	SS	AA

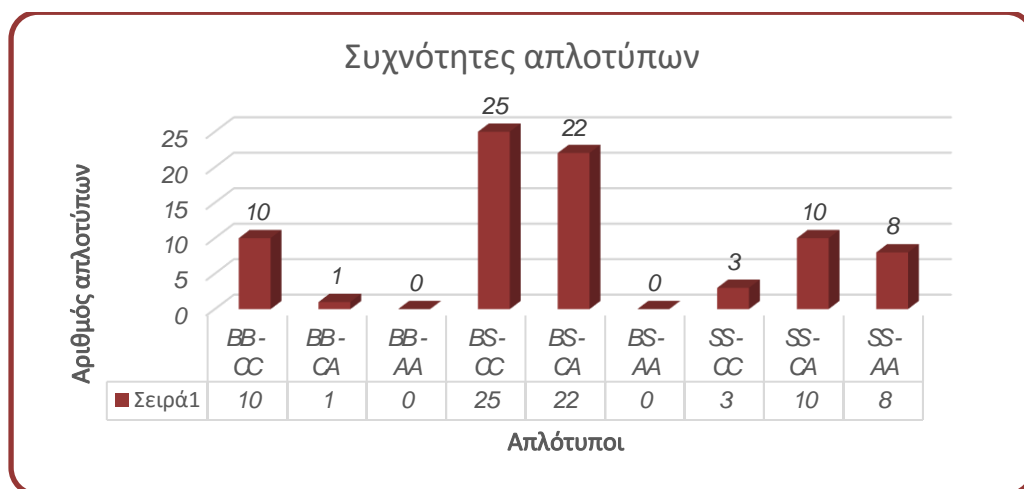
<u>Tube</u>	<u>Sample code</u>	<u>Race</u>	<u>Sex</u>	<u>Insertion</u>	<u>SNP_19034</u>
26	6398	Large White	female	BS	CC
27	6446	Large White	female	BS	CC
28	668	Duroc	female	BS	CA
29	5180	Large White	female	BS	CC
30	6490	Large White	female	BS	CA
31	6552	Large White	female	BS	
32	2056	Landrace	female	SS	AA
33	6380	Large White	female	BS	CC
34	2053	Landrace	female	SS	CA
35	670	Duroc	female	BS	CA
36	6364	Large White	female	BS	CC
37	6397	Large White	female	BS	CA
38	6315	Large White	female	BB	CC
39	6547	Large White	female	BB	CC
40	6488	Large White	female	BS	CA
41	2059(2052)	Landrace	female	BS	CA
42	6445	Large White	female	BS	CC
43	7159	Welsh	female	BS	CA
44	6487	Large White	female	SS	AA
45	7150	Welsh	female	BS	CC
46	3221	Pietrain	female	BS	CC
47	O111501	Large White	female	BS	CA
48	O117305	Large White	female	BS	CA
49	7098	Welsh	male	SS	CA
50	O100901	Large White	female	BB	CC
51	O116206	Large White	female	SS	CC
52	O107106	Large White	female	BS	CC
53	O110101	Large White	female	SS	CA
54	O116305	Large White	female	BS	CA
55	O101304	Large White	female	BS	CA
56	O102202	Large White	female	SS	AA
57	O100301	Large White	female	BS	CC
58	O115602	Large White	female	SS	CA
59	O115804	Large White	female	BS	CC
60	8041	Pietrain	female	SS	CA
61	O100603	Large White	female	BB	CC
62	O107404	Large White	female	BS	CC
63	4975	Large White	male	SS	CC
64	O100403	Large White	female	BS	CC
65	O112302	Large White	female	BS	CA
66	O115503	Large White	female	BS	CC
67	O105202	Large White	female	BS	CC
68	6375	Large White	male		CC

Tube	Sample code	Race	Sex	Insertion	SNP 19034
69	O102404	Large White	female	BS	CA
70	O113902	Large White	female	BS	CA
71	O102506	Large White	female	BS	CC
72	O552	Duroc	male	BB	CA
73	2042	Landrace	male	SS	CC
74	8468	Pietrain	female	BS	
75	O101709	Large White	female	BS	CA
76	O115704	Large White	female		CA
77	O116401	Large White	female	BS	CA
78	O100506	Large White	female	BS	CC
79	O114807	Large White	female	BS	CC
80	4175	Large White	male	BS	CC
81	O101203	Large White	female	SS	CA
82	O111403	Large White	female	BB	CC
83	O110402	Large White	female	SS	AA
84	O105102	Large White	female	BS	CC

Οι συχνότητες των απλοτύπων απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 12: Οι συχνότητες των απλοτύπων

BB - CC	$10/79 = 0,13$
BB - CA	$1/79 = 0,013$
BB - AA	0
BS - CC	$25/79 = 0,32$
BS - CA	$22/79 = 0,28$
BS - AA	0
SS - CC	$3/79 = 0,38$
SS - CA	$10/79 = 0,13$
SS - AA	$8/79 = 0,10$



Εικόνα 15: Συχνότητες των αλληλομόρφων

4. Συζήτηση

Ο χοίρος είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα οικόσιτα ζώα και αποτελεί τη βάση της κτηνοτροφίας. Εδώ και χρόνια πραγματοποιούνται μελέτες γύρω από τους χοίρους και ιδιαίτερα τους οικόσιτους. Στόχος τους είναι η βελτιστοποίηση των γενετικών τους χαρακτηριστικών, που σχετίζονται με τη διαμόρφωση του σκελετού τους αλλά και με την αναπαραγωγική τους ικανότητα. Ένα από τα χαρακτηριστικά, με τα οποία ασχολείται η επιστημονική κοινότητα, είναι ο αριθμός των σπονδύλων των χοίρων προκειμένου να παράγουν χοίρους με αυξημένο αριθμό πλευρών και άρα χοίρους μεγαλύτερου μεγέθους. Η προσπάθεια αυτή μεταφράζεται οικονομικά ως αυξημένη παραγωγή χοιρινού κρέατος.

Πιο συγκεκριμένα, οι Mikawa και οι συνεργάτες & Nakano και οι συνεργάτες εντόπισαν μία ποικιλομορφία ανάμεσα στις ράτσες των χοίρων όσον αφορά τον αριθμό των πλευρών και ιδιαίτερα των θωρακικών και των οσφυϊκών. Βρέθηκε ότι οι αγριόχοιροι έχουν σταθερά 19 θωρακικούς σπονδύλους, οι κινέζικων ρατσών χοίροι διαθέτουν 19 με 20 σπονδύλους, ενώ οι ευρωπαϊκών ρατσών χοίροι έχουν 20 με 23 θωρακικούς σπονδύλους. Σύμφωνα με τους Mikawa και οι συνεργάτες τους, το γεγονός αυτό εξηγείται ως εξής: οι ευρωπαϊκές ράτσες έχουν επιλεγεί προκειμένου να έχουν μεγάλο μέγεθος και άρα να παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα κρέατος. Αυτό, σε συνδυασμό με την επίδραση της επιλογής, εδραίωσε το μεγαλύτερο αριθμό σπονδύλων στις ράτσες αυτές.

Οι ερευνητές εστίασαν στο γονίδιο *Vertnin*, το οποίο σχετίζεται άμεσα με τον αριθμό των σπονδύλων και εντοπίζεται πολυμορφικές θέσεις, που συνδέονται με την εμφάνιση αυξημένου αριθμού σπονδύλων. Στη συγκεκριμένη μελέτη, μελετήσαμε το SNP 19034 A > C καθώς και με την ένθεση g.20311_20312ins291. Σύμφωνα με τους Duijvesteijn και τους συνεργάτες του & Fan και τους συνεργάτες του, κάθε αλληλόμορφο που φέρει έναν από τους δύο παραπάνω πολυμορφισμούς προσθέτει έναν επιπλέον σπόνδυλο στο σκελετό του ζώου και τον επεκτείνει κατά 80mm.

Το γονίδιο *vertnin*, όμως, βρέθηκε να σχετίζεται και με επιμέρους/δευτερεύοντα χαρακτηριστικά. Ένα από τα χαρακτηριστικά που επηρεάζονται από το γονίδιο είναι ο αριθμός των θηλών. Κατά τον Duijvesteijn και τους συνεργάτες του, που μελέτησαν εκτεταμένα τον τρόπο επίδρασης του γονιδίου *vertnin* στον αριθμό των θηλών, οι θηλές αναπτύσσονται σαν επιπρόσθετο τμήμα του σε ήδη υπάρχοντες μαστικούς αδένες. SNPs στο γονίδιο *VRTN* χρησιμοποιήθηκαν για την αύξηση του αριθμού των θηλών. Έτσι, με την αύξηση των γεννήσεων περισσότερα νεογνά είχαν την ικανότητα να τρέφονται από τη μητέρα τους.

Επίσης, το 2014, ο Nakano και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι το γονίδιο *vertnin* εμφανίζει υψηλές συσχετίσεις με το μήκος του σπονδύλου της πλάτης, καθώς και με το συνολικό μήκος του σκελετού. Παρόλα αυτά, οι

ερευνητές της ομάδας διατύπωσαν ότι το μήκος του σκελετού επηρεάζεται και από το μήκος κάθε σπονδύλου, εκτός από τον αριθμό των σπονδύλων συνολικά. Βρέθηκε, ακόμα, από τα πειράματά τους ότι το γονίδιο *vertnin* δεν επηρεάζει καθόλου τον αριθμό των οσφυϊκών αλλά μόνο των θωρακικών σπονδύλων, μια διατύπωση που επιβεβαιώνεται και από τα πειράματα του Mikawa και των συνεργατών του.

Ο Hirose και οι συνεργάτες, το 2013, διαπίστωσαν ότι, το γονίδιο *vertnin* από μόνο του δεν επηρεάζει το πάχος του λίπους της πλάτης. Όμως, σε συνδυασμό με τα γονίδια *LEPR/MC4R/PIK3C3*, επιδρά στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με αποτέλεσμα την παραγωγή βελτιωμένων φυλών χοίρων. Ακόμα, διαπίστωσαν ότι το γονίδιο *VRTN* μειώνει σημαντικά το περιεχόμενο του διαμυϊκού λίπους και με τη συνδυαστική δράση του γονιδίου *LEPR*, η επίδραση είναι αθροιστική. Το παραπάνω συμπέρασμα επιβεβαιώνεται και από τα πειράματα των Burgos και των συνεργατών, τα οποία καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι τα ομόζυγα άτομα χοίρων για την ένθεση *g.20311_20312ins291* εμφανίζουν χαμηλή περιεκτικότητα σε διαμυϊκό λίπος σε σχέση με τα άτομα αγρίου τύπου (*WT*).

Παλιότερες έρευνες, περίπου 50 ετών πριν, υποστήριζαν ότι οι χοίροι με μεγάλο αριθμό σπονδύλων εμφάνιζαν κινητικά και δομικά προβλήματα (Duckworth et al & Meyer et al) καθώς, επίσης, έδιναν γένεση σε νεκρά γουρούνια (Evans et al).

Σήμερα, υπάρχουν ερευνητές, που προσπαθούν να συνδέσουν αλλαγές στην ανάπτυξη των σπονδύλων με ανωμαλίες. Σύμφωνα με τους Holl και τους συνεργάτες του, παρατηρήθηκε στον πληθυσμό *USMARC* μια καμπύλη στην πλάτη των χοίρων που χαρακτηρίστηκε ως κύφωση και θεωρήθηκε ότι έχει γενετική βάση. Πράγματι, οι γενετικοί τόποι που σχετίζονται με τη συγκεκριμένη δομική ανωμαλία εντοπίστηκαν στα χρωμοσώματα 5 και 6, ενώ διαπιστώθηκε ότι η ανωμαλία δεν σχετίζεται με τον αυξημένο αριθμό σπονδύλων.

Τέλος, οι Rohrer και οι συνεργάτες τους υποστήριξαν ότι, παρά τη μεγάλη επίδραση του γονιδίου *VRTN*, υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός από επιπλέον γενετικούς τόπους που επηρεάζουν την ανάπτυξη της σπονδυλικής στήλης των χοίρων. Αυτοί, σε συνδυασμό με τη δράση της φυσικής επιλογής, έχουν την ικανότητα να αλλάξουν τον αριθμό καθώς και τον τύπο των σπονδύλων. Ένας από τους πιο διαδεδομένους και πιο μελετημένους είναι το γονίδιο *NR6A1*, το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1. Σύμφωνα με τους Mikawa και τους συνεργάτες του, το γονίδιο κωδικοποιεί για ένα πυρηνικό υποδοχέα και η πολυμορφική θέση χαρακτηρίζεται από μία υποκατάσταση βάσης που οδηγεί στην υποκατάσταση *Pro192Leu* στην παραγόμενη πρωτεΐνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των ραχιαίων και οσφυϊκών σπονδύλων στους χοίρους με την συγκεκριμένη μετάλλαξη.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, διαπιστώνουμε ότι οι δύο πολυμορφισμοί (η ένθεση και το *SNP*) δεν βρίσκονται σε πλήρη

ανισορροπία σύνδεσης, η οποία είχε παρατηρηθεί στα ευρήματα των Fan και των συνεργατών του.

Συμπερασματικά, η βελτιστοποίηση των φυλών των χοίρων και κατ' επέκταση η αύξηση της παραγωγής χοιρινού κρέατος κρίνεται σημαντική για την οικονομική ενίσχυση του τομέα της κτηνοτροφίας. Γι' αυτό το λόγο, το γονίδιο *vertnin* αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα γονίδια-στόχους, καθώς συμμετέχει στην αύξηση του αριθμού των πλευρών στους χοίρους, συμβάλλοντας στην παραπάνω προσπάθεια.

Ως μελλοντικοί στόχοι τίθενται τα εξής ζητήματα:

- ✓ Εφόσον το γονίδιο *vertnin* αποτελεί καθοριστικό γονίδιο, θα ήταν ενδιαφέρον να αξιολογηθεί περαιτέρω η συνεισφορά του γονιδίου σε σπονδύλους διαφόρων τμημάτων του σώματος των χοίρων και τελικά να καθοριστεί η συσχέτισή του με άλλα δομικά χαρακτηριστικά των χοίρων που παίζουν σημαντικό ρόλο στη βελτιστοποίηση της παραγωγής χοιρινού κρέατος.
- ✓ Θα ήταν, επίσης, απαραίτητο να αποσαφηνιστεί ο μοριακός μηχανισμός που οδηγεί στις μεταλλάξεις του γονιδίου *VRTN* καθώς και ο τρόπος που η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη δρα και αυξάνει τον αριθμό των θωρακικών σπονδύλων.
- ✓ Τέλος, θα ήταν ιδιαίτερα επωφελές η μελέτη της συνδυαστικής επίδρασης του γονιδίου *vertnin* με άλλα γονίδια σε πληθώρα χαρακτηριστικών, που σχετίζονται, τόσο με την δομή, όσο και με την αναπαραγωγική ικανότητα των χοίρων.

5. Βιβλιογραφία

1. Yin Fan., Yuyun Xing., Zhiyan Zhang, Huashui Ai, Zixuan Ouyang, Jing Ouyang, Ming Yang, Pinghua Li, Yijie Chen, Jun Gao, Lin Li, Lusheng Huang, Jun Ren. A Further Look at Porcine Chromosome 7 Reveals VRTN Variants Associated with Vertebral Number in Chinese and Western Pigs. *PLoS One*. 2013;8(4). doi:10.1371/journal.pone.0062534.
2. Hikaru Nakano, Shuji Sato, Yoshinobu Uemoto, Takashi Kikuchi, Tomoya Shibata, Hiroshi Kadowaki, Eiji Kobayashi and Keiichi Suzuki. Effect of VRTN gene polymorphisms on Duroc pig production and carcass traits, and their genetic relationships. *Anim Sci J*. 2015;86(2):125-131. doi:10.1111/asj.12260.
3. Satoshi Mikawa, Takeya Morozumi, Shin-Ichi Shimanuki, Takeshi Hayashi, Hirohide Uenishi, Michiko Domukai, Naohiko Okumura, and Takashi Awata, vertebrae and analysis of an orphan nuclear receptor , germ cell nuclear factor (NR6A1) Fine mapping of a swine quantitative trait locus for number of vertebrae and analysis of an orphan nuclear receptor , germ cell nuclear factor (NR6A1). *Genome Res*. 2007:586-593. doi:10.1101/gr.6085507.
4. Fontanesi L, Scotti E, Buttazzoni L, Dall'Olio S, Russo V. Investigation of a short interspersed nuclear element polymorphic site in the porcine vertnin gene: Allele frequencies and association study with meat quality, carcass and production traits in Italian Large White pigs. *Ital J Anim Sci*. 2014;13(1):61-65. doi:10.4081/ijas.2014.3090.
5. Jie Yang, Lusheng Huang, Ming Yang, Yin Fan, Lin Li, Shaoming Fang, Wenjiang Deng, Leilei Cui, Zhen Zhang, Huashui Ai, Zhenfang Wu, Jun Gao & Jun Ren et al. Possible introgression of the VRTN mutation increasing vertebral number, carcass length and teat number from Chinese pigs into European pigs. *Sci Rep*. 2016;6(1):19240. doi:10.1038/srep19240.
6. Farber CR, Raney NE, Kuhlert DL, Nadarajah K, Ernst CW. Mapping of Porcine Genetic Markers Generated by Representational Difference Analysis. *Anim Biotechnol*. 2003;14(1):87-102. doi:10.1081/ABIO-120022139.
7. Burgos C, Latorre P, Altarriba J, Carrodeguas JA, Varona L, López-Buesa P. Allelic frequencies of NR6A1 and VRTN, two genes that affect vertebrae number in diverse pig breeds: A study of the effects of the VRTN insertion on phenotypic traits of a Duroc×Landrace-Large White cross. *Meat Sci*. 2015;100:150-155. doi:10.1016/j.meatsci.2014.09.143.
8. Duijvesteijn N, Veltmaat JM, Knol EF, Harlizius B. High-resolution association mapping of number of teats in pigs reveals regions controlling vertebral development. *BMC Genomics*. 2014;15(1):542. doi:10.1186/1471-2164-15-542.
9. Gourdine J-L, Mandonnet N, Giorgi M, Renaudeau D. Genetic parameters for thermoregulation and production traits in lactating sows reared in tropical climate. *Animal*. 2016:1-10. doi:10.1017/S175173111600135X.
10. Rohrer GA, Nonneman DJ. Genetic analysis of teat number in pigs

- reveals some developmental pathways independent of vertebra number and several loci which only affect a specific side. *Genet Sel Evol.* 2017;49(1):4. doi:10.1186/s12711-016-0282-1.
11. L. Fontanesi, G. Schiavo, E. Scotti, G. Galimberti, D.G. Calo, A.B. Samore, M. Gallo, V. Russo & L. Buttazzoni. A retrospective analysis of allele frequency changes of major genes during 20 years of selection in the Italian Large White pig breed. *J Anim Breed Genet.* 2015;132(3):239-246. doi:10.1111/jbg.12127.
 12. G. J. Evans, E. Giuffra, A. Sanchez, S. Kerje, G. Davalos, O. Vidal, S. Illan, J. L. Noguera, L. Varona, I. Velander, O. I. Southwood, D.-J. de Koning, C. S. Haley, G. S. Plastow and L. Andersson. Identification of quantitative trait loci for production traits in commercial pig populations. *Genetics.* 2003;164(2):621-627.
 13. Satoshi Mikawa, Shuji Sato, Masahiro Nii, Takeya Morozumi, Gou Yoshioka, Noriaki Imaeda, Tsuneko Yamaguchi, Takeshi Hayashi, Takashi Awata. Identification of a second gene associated with variation in vertebral number in domestic pigs. *BMC Genet.* 2011;12(1):5. doi:10.1186/1471-2156-12-5.
 14. Hirose K, Mikawa S, Okumura N, et al. Association of swine vertnin (VRTN) gene with production traits in Duroc pigs improved using a closed nucleus breeding system. *Anim Sci J.* 2013;84(3):213-221. doi:10.1111/j.1740_0929.2012.01066.x.
 15. Kensuke Hirose, Tetsuya Ito, Kazuo Fukawa, Aisaku Arakawa, Satoshi Mikawa, Yoichi Hayashi and Kazuaki Tanaka. Evaluation of effects of multiple candidate genes (LEP, LEPR, MC4R, PIK3C3, and VRTN) on production traits in Duroc pigs. *Anim Sci J.* 2014;85(3):198-206. doi:10.1111/asj.12134.
 16. Tsuchihashi Z, Dracopoli NC. Progress in high throughput SNP genotyping methods. *Pharmacogenomics J.* 2002;2(2):103-110. doi:10.1038/sj/tpj/6500094.
 17. Samantha Wilkinson, Zen H. Lu, Hendrik-Jan Megens, Alan L. Archibald, Chris Haley, Ian J. Jackson, Martien A. M. Groenen, Richard P. M. A. Crooijmans, Rob Ogden, Pamela Wiener. Signatures of Diversifying Selection in European Pig Breeds. *PLoS Genet.* 2013;9(4). doi:10.1371/journal.pgen.1003453.
 18. Rohrer GA, Nonneman DJ, Wiedmann RT, Schneider JF. A study of vertebra number in pigs confirms the association of vertnin and reveals additional QTL. *BMC Genet.* 2015;16(1):129. doi:10.1186/s12863-015-0286-9.
 19. Gabriel S, Ziaugra L, Tabbaa D. SNP genotyping using the sequenom massARRAY iPLEX Platform. *Curr Protoc Hum Genet.* 2009;(SUPPL. 60):1-18. doi:10.1002/0471142905.hg0212s60.
 20. Lopes MS, Bastiaansen JWM, Harlizius B, Knol EF, Bovenhuis H. A genome-wide association study reveals dominance effects on number of teats in pigs. *PLoS One.* 2014;9(8):1-8. doi:10.1371/journal.pone.0105867.
 21. Stear MJ, Bishop SC, Mallard B a, Raadsma H. The sustainability, feasibility and desirability of breeding livestock for disease resistance. *Res Vet Sci.* 2001;71(1):1-7. doi:10.1053/rvsc.2001.0496.
 22. Duckworth, J., & Holmes, W. (1968). Selection for carcass length in

- Large White pigs. *Animal Science*, 10(4), 359-372.
doi:10.1017/S0003356100026398.
23. Meyer, H., & Lindfeld, A. (1969). Number and length of vertebrae in the improved german county-pig. [Untersuchungen über Wirbelzahl und Wirbellänge beim Deutschen veredelten Landschwein.] *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 76(17), 448-453. Retrieved from www.scopus.com.
 24. Wang, L., Zhang, Y., Zhang, T., Zhang, L., Yan, H., Liu, X., & Wang, L. (2017). Genotyping by sequencing reveals a new locus for pig teat number. *Animal Genetics*, 48(4), 470-472. doi:10.1111/age.12547.
 25. Arakawa, A., Okumura, N., Taniguchi, M., Hayashi, T., Hirose, K., Fukawa, K., Mikawa, S. (2015). Genome-wide association QTL mapping for teat number in a purebred population of duroc pigs. *Animal Genetics*, 46(5), 571-575. doi:10.1111/age.12331.
 26. Rees Evans, E. (1954). Investigations on the Vertebral Column of the Welsh Pig. *Proceedings of the British Society of Animal Production*, 1954, 65-73. doi:10.1017/S0369852100001421.
 27. Holl, J. W., Rohrer, G. A., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., & Koohmaraie, M. (2008). Estimates of genetic parameters for kyphosis in two crossbred swine populations. *Journal of Animal Science*, 86(8), 1765-1769. doi:10.2527/jas.2007-0628.
 28. Rohrer, G. A., & Nonneman, D. J. (2017). Genetic analysis of teat number in pigs reveals some developmental pathways independent of vertebra number and several loci which only affect a specific side. *Genetics Selection Evolution*, 49(1) doi:10.1186/s12711-016-0282-1.
 29. Briggs, Hilton M. 1983. *International Pig Breed Encyclopedia*. Elanco Animal Health.
 30. Briggs, Hilton M. 1969. *Modern Breeds of Livestock*. Third Edition, MacMillan Company.
 29. Σύγγραμμα: "Genomes" – T.A. Brown: Εικόνα7 – 10.
 30. Σύγγραμμα: "Bioinformatics" – Andreas D. Baxevanis, B. F. Francis Ouellette.
 31. EMBL-EBI (Εικόνα15(A),(B)): <http://www.ebi.ac.uk>.
 32. www.itis.gov: International Taxonomic Information System (ITIS): (Πίνακας 1).
 33. NCBI – VRTN gene (Εικόνα5): www.ncbi.nlm.nih.gov/gene.