



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική μελέτη
*«Μεταλλάξεις του υποδοχέα 1 της μελανοκορτίνης (MC1R)
σε αυτόχθονες φυλές προβάτων»*

Συγγελάκη Μαρία

Λάρισα, 2016-2017

Λάρισα, 2016-2017

«Μεταλλάξεις του υποδοχέα 1 της μελανοκορτίνης (MC1R)
σε αυτόχθονες φυλές προβάτων»

**“Mutations of the melanocortin-1 receptor (MC1R)
in indigenous sheep breeds”**

Διπλωματική μελέτη
Συγγελάκη Μαρία

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΣΤΑΜΑΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)	Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (Ε.Δι.Π) του Εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ	Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διατήρηση της γενετικής ποικιλότητας στο ζωικό κεφάλαιο είναι κρίσιμη για την αντιμετώπιση μελλοντικών προκλήσεων όπως η κλιματική αλλαγή, διάφορες ασθένειες και η ασφάλεια των τροφών για έναν αυξανόμενο ανθρώπινο πληθυσμό. Τα πρόβατα είναι ένα φαινοτυπικά ποικιλόμορφο είδος που εκτρέφονται σε όλο τον κόσμο για την παραγωγή κρέατος, γάλακτος και χρήσης του τριχώματος τους. Αναφέρονται 1.542 φυλές προβάτων: πάνω από τα μισά έχουν κατάσταση άγνωστου κινδύνου (Επιτροπή FAO για τους Γενετικούς Πόρους για τη Διατροφή και τη Γεωργία 2015). Είναι σημαντικό η γενετική ποικιλότητα στα πρόβατα να εκτιμηθεί για τον εντοπισμό μοναδικών φυλών που ενδέχεται να διατρέχουν κίνδυνο εξαφάνισης. Πολλές φυλές προβάτων είναι τοπικές φυλές, οι οποίες είναι μοναδικά και ειδικά προσαρμοσμένες στα συγκεκριμένα περιβάλλοντα (Groeneveld et al. 2010) και επομένως τα πρόβατα είναι ένα καλό πρότυπο ζώου για την εξέταση του φαινομένου της προσαρμογής. Το γονίδιο MC1R και η συσχέτιση των μεταλλάξεων του με το χρώμα του τριχώματος στα πρόβατα, δεν έχει αναλυθεί επαρκώς στις ελληνικές αυτόχθονες φυλές. Συνεπώς, η εκτίμηση του γενετικού πολυμορφισμού του γονιδίου MC1R στον ελληνικό πληθυσμό προβάτων κρίνεται αναγκαία ώστε να διερευνηθεί και να καταγραφεί η έκταση της γενετικής ποικιλότητας των αυτοχθόνων φυλών προβάτων. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος και τριχών από 92 πρόβατα, από τις ακόλουθες αυτόχθονες φυλές: Άρτας (29), Κοκοβίτικη (2), Boutsiko (22), Χίου (4), Σαρακατσάκινη (4), Κύμης (5), Άργους (5), Καραγκούνικο (5), Ζακύνθου (4), Φλώρινας (5), Θράκης (3), Κατσικά (2) και Σκοπέλου (2). Με τη χρήση τεχνικής PCR, ενισχύθηκε η περιοχή του γονιδίου MC1R και στη συνέχεια μελετήθηκε η αλληλουχία του για τον εντοπισμό πολυμορφικών θέσεων και τη σύνδεση αυτών με αλλαγές στο χρωματισμό του τριχώματος των προβάτων. Ο εντοπισμός των νουκλεοτιδικών αλλαγών έγινε μέσω προγράμματος βιοπληροφορικής (Bioedit) και μέσω των αποτελεσμάτων, προσδιορίστηκε η συχνότητα των εντοπισμένων αλληλόμορφων σε κάθε φυλή. Τα ζώα φάρμας φαίνεται να υπόκεινται σε επιλογή σε παρόμοιες περιοχές του γονιδιώματος, όπως τα γονίδια που επηρεάζουν τη μορφολογία και το χρώμα του τριχώματος (Fariello et al. 2014; Boitard et al. 2016). Επομένως, η μελέτη των προτύπων επιλογής στα πρόβατα μπορεί να αποδειχθεί επωφελής και για άλλα είδη.

ABSTRACT

Maintaining genetic diversity in livestock is critical to addressing future challenges such as climate change, various diseases and food safety for a growing human population. Sheep are a phenotypically diverse species reared all over the world to produce meat, milk and use their coat. There are 1,542 sheep breeds: more than half of them are under a state of unknown risk (FAO Committee on Genetic Resources for Food and Agriculture 2015). It is important that genetic diversity in sheep is assessed to identify unique breeds likely to be at risk of extinction. Many sheep breeds are local breeds, which are unique and specially adapted to specific environments (Groeneveld et al., 2010) and sheep are therefore a good animal model to study adaptation. The MC1R gene and the correlation of its mutations with coat color in sheep has not been adequately resolved in Greek indigenous breeds. The assessment of the genetic polymorphism of the MC1R gene in the Greek sheep population is therefore considered necessary to investigate and record the extent of the genetic diversity of indigenous breeds of sheep. In the present study, blood and hair samples from 92 sheep were used from the following indigenous breeds: Frizarta (29), Kokovitiki (2), Boutsiko (22), Chios (4), Sarakatsaki (4), Kumis (5), Karaguniko (5), Argous (5), Zakynthos (4), Florina (5), Thrace (3), Katsika (2) and Skopelos (2). Using PCR, the MC1R gene region was amplified and then sequenced to study polymorphic sites and their association with changes in sheep hair coloration. The identification of nucleotide changes was possible using Bioedit (bioinformatics program), and through the results, the frequency of the different alleles in each indigenous race was determined. Farm animals appear to be subject to selection in similar regions of the genome, such as genes that affect the morphology and color of the coat (Fariello et al., 2014; Boitard et al., 2016). Therefore, the study of selection patterns in sheep may prove to be beneficial for other species as well.

Ευχαριστίες

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα μου κ. Κωνσταντίνο Σταμάτη κυρίως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την απεριόριστη στήριξή του.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στους Θεμιστοκλή Γιαννούλη, Τσιπουρλιάνο Ανδρέα και Σαρρή Κωνσταντίνα καθώς και στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή τους, για την επίλυση διαφόρων θεμάτων κατά τη διάρκεια υλοποίησης της πτυχιακής εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT.....	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
Ταξινόμηση προβάτου.....	7
Εξημέρωση προβάτων.....	8
Οικονομική σημασία για τον άνθρωπο.....	8
Ερευνητική σημασία.....	9
Γενετική ποικιλότητα.....	9
Ελληνικές φυλές προβάτων.....	10
Μελανογένεση στα θηλαστικά.....	18
Υποδοχέας 1 της μελανοκορτίνης (MC1R) και ο ρόλος του.....	20
Αλληλεπίδραση γονιδίων MC1R και ASIP.....	22
ΣΚΟΠΟΣ.....	26
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
Απομόνωση DNA.....	27
Ηλεκτροφόρηση προϊόντων DNA.....	28
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	29
Καθαρισμός DNA και αλληλούχιση.....	31
Ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχισης (πρόγραμμα BioEdit).....	34
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	36
Απομόνωση DNA από δείγματα τριχών και αίματος προβάτων.....	36
Ενίσχυση τμήματος DNA με την τεχνική PCR.....	37
Αλληλούχιση.....	37
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	42
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ταξινόμηση προβάτου

Το οικόσιτο πρόβατο (*Ovis aries* - Πρόβατον ο κριός), το πιο κοινό μέλος της οικογένειας των προβάτων (Πρόβατον - *Ovis*), είναι ένα μηρυκαστικό, τετράποδο ζώο, που πιθανότατα κατάγεται από τα άγρια πρόβατα μουφλον της Νότιας και Νοτιοδυτικής Ασίας.



Σχεδιάγραμμα 1. Ταξινόμηση προβάτου
(πηγή: *International Taxonomic Information System*, <https://www.itis.gov/>)

Τα πρόβατα εξημερώθηκαν για πρώτη φορά πριν από περίπου 10.000 χρόνια στην περιοχή της Ανατολίας, όπου αρχικά αποτέλεσαν θηράματα για τους ανθρώπους, με την πάροδο του χρόνου εξελίχθηκαν σε ελεγχόμενα κοπάδια και τελικά άρχισαν να εκτρέφονται από τον άνθρωπο (Larson and Burger 2013). Σήμερα τα οικόσιτα πρόβατα (*Ovis aries*) είναι ξεχωριστό είδος από τον πρόγονό τους, το ασιατικό Mouflon (*Ovis orientalis*), το οποίο εξακολουθεί να υπάρχει μέχρι σήμερα στη Νοτιοδυτική Ασία. Τα αιγοπρόβατα ήταν τα πρώτα οικόσιτα είδη ζώων και από τότε έχουν εξαπλωθεί σε όλη την υδρόγειο: στην Ευρώπη, υπήρχαν δύο κύριες οδοί εξημέρωσης που ακολούθησαν τη νεολιθική επέκταση της εξημέρωσης των φυτών (Zeder 2008). Τα ζώα που προσαρμόστηκαν στον έλεγχο τους από τους ανθρώπους εμφάνισαν αλλαγές στη συμπεριφορά και τη μορφολογία όπως φαίνεται στα πρόβατα. Περίπου 200 χρόνια πριν, άρχισαν να σχηματίζονται φυλές προβάτων που οδήγησαν σε διαιρεμένους πληθυσμούς και μειωμένη γενετική ποικιλότητα. Μερικές δεκαετίες πριν, η σύγχρονη τεχνητή επιλογή άρχισε να μειώνει περαιτέρω τη γενετική ποικιλομορφία (Taberlet et al. 2008). Σήμερα τα πρόβατα διασταυρώνονται και εκτρέφονται για: παραγωγή κρέατος ή γάλακτος ή/και για σκοπούς διατήρησης. Τα πρόβατα βρίσκονται σε εκτεταμένα και εντατικά συστήματα παραγωγής και σε ζεστά, αλλά και κρύα περιβάλλοντα. Τα πρόβατα αντιμετωπίζουν επίσης προκλήσεις στην ανοχή τους σε διάφορες ασθένειες σε διαφορετικά περιβάλλοντα (Διεθνής Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας F.A.O., 2015).

Οικονομική σημασία για τον άνθρωπο

Τα πρόβατα (*Ovis Aries*) ήταν από τα πρώτα ζώα που εξημερώθηκαν, καθώς ήταν μια σχετικά εύκολη διαδικασία, οι διατροφικές τους ανάγκες δεν εμφάνιζαν ιδιαιτερότητες και το σημαντικότερο, μπορούσαν να προσφέρουν στον άνθρωπο μια πληθώρα προϊόντων, όπως γάλα, μαλλί και κρέας. Ειδικά στην Ελλάδα, η εκτροφή προβάτων, μαζί με εκείνη της κατσικάς, αποτελούν το 43% της συνολικής ενασχόλησης με την κτηνοτροφία και την παράγωγη κρέατος, καθώς και το 13% του συνόλου της αγροτικής παράγωγης. Οι αυτόχθονες πληθυσμοί προβάτων εμφανίζουν υψηλή μορφολογική ποικιλότητα και παραγωγική ικανότητα, καθώς και αυξημένη ικανότητα προσαρμογής σε ποικίλα περιβάλλοντα (Loukovitis et al. 2016). Επί του παρόντος, με συνολικό πληθυσμό προβάτων περίπου 10 εκατομμυρίων, η παραγωγή γάλακτος στην Ελλάδα φτάνει τους περίπου 640.000 τόνους ετησίως και η παραγωγή κρέατος τους 83.000 τόνους. Οι δυνατότητες ανάπτυξης σε αυτόν τον τομέα της κτηνοτροφίας είναι πολύ σημαντικές και μπορεί να είναι το αποτέλεσμα μακροχρόνιων γενετικών προγραμμάτων, καθώς και της τήρησης καλύτερης στάσης σε θέματα διατροφής και κτηνοτροφικών εγκαταστάσεων (Georgoudis, Hatziminaoglou, and Pappas 1995).

Ερευνητική σημασία

Η διατήρηση της γενετικής ποικιλομορφίας στα οικόσιτα ζώα είναι σημαντική για τη βελτίωση της παραγωγής και την ταχεία αντιμετώπιση των μελλοντικών προκλήσεων, συμπεριλαμβανομένης της ασφάλειας στην παραγωγή τροφίμων, της αυξανόμενης ζήτησης ζωικών προϊόντων, των μεταβαλλόμενων περιβαλλοντικών συνθηκών και των νέων ασθενειών. Επιπλέον, οι τοπικές φυλές έχουν προσαρμοστεί σε συγκεκριμένες τοποθεσίες για χιλιάδες χρόνια και είναι στενά συνδεδεμένες με τον πολιτισμό και την ιστορία και η διατήρηση και μελέτη της γενετικής ποικιλότητας αυτών των φυλών θα βοηθήσει στην κατανόηση της ανθρώπινης ιστορίας (Groeneveld et al. 2010).

Γενετική ποικιλότητα

Η γενετική ποικιλότητα ορίζεται ως η ποικιλία των αλληλομορφικών γονιδίων και των γονότυπων που υπάρχουν σε έναν πληθυσμό. Κάθε φυλή έχει ένα μοναδικό σύνολο συνδυασμού γονιδίων, το οποίο οφείλεται: στη μετάλλαξη και τη μετατόπιση (drift) λόγω γεωγραφικής απομόνωσης και φαινόμενου στενωπού (bottleneck), τεχνητής επιλογής και προσαρμογής στο κλίμα, διαθέσιμης τροφής και σε ασθένειες και παράσιτα (Barker 2001). Οι πιο ομοιογενείς φυλές με βελτιωμένη παραγωγή και σταθερή έκφραση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών (όπως το χρώμα του τριχώματος) είναι αποτέλεσμα: της γενεαλογικής καταγραφής, του σχηματισμού οργανισμών εκτροφής ζώων, της τεχνολογικής εξέλιξης που διευκολύνει τη μεταφορά ζώων και τη διανομή γενετικού υλικού και την πιο ελεγχόμενη παραγωγή (Διεθνής Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας F.A.O. 2015, Groeneveld et al. 2010). Οι εξαιρετικά παραγωγικές φυλές σταδιακά αντικαθιστούν τις τοπικές φυλές και χάνονται οι μοναδικοί συνδυασμοί γονιδίων από ορισμένες τοπικές φυλές. Η διατήρηση της γενετικής ποικιλότητας είναι σημαντική για την ταχεία προσαρμογή σε προκλήσεις. Οι φυσικές και τεχνητές πιέσεις επιλογής στα πρόβατα που οδηγούν στην προσαρμογή τους σε διαφορετικές απαιτήσεις και περιβάλλοντα καθιστούν τα εξημερωμένα πρόβατα ένα ενδιαφέρον μοντέλο για να μελετηθεί η εξέλιξη των πληθυσμών (Andersson 2012).

Στην πλειονότητά τους, ο πληθυσμός προβάτων στην Ελλάδα ανήκει στη φυλή Zackel, η οποία βρίσκεται σε όλη τη χώρα και χαρακτηρίζεται από τη μακριά ουρά και το τραχύ τρίχωμα. Όλες οι επονομαζόμενες 'ορεινές φυλές' και η σχετικά πολυάριθμη Καραγκούνικη πεδινή (απλή) φυλή μπορούν να ταξινομηθούν σε αυτήν την ομάδα. Σε μια δεύτερη κατηγορία ανήκουν φυλές του προβάτου Ruda, το οποίο έχει λεπτότερο και πιο ομοιόμορφο τρίχωμα και βρίσκονται κυρίως στη Μακεδονία, τη Θράκη και σε κάποια νησιά του Αιγαίου. Σε μια τρίτη κατηγορία ανήκουν τα πρόβατα μιας φυλής που χαρακτηρίζεται από μεσαίου πάχους ουρά, που βρίσκεται στα νησιά του Ανατολικού Αιγαίου. Αν και όλες οι παραπάνω φυλές μπορούν να ταξινομηθούν ευρέως ως πρόβατα διπλής χρησιμότητας (για γάλα και κρέας), στη δεύτερη και στην τρίτη κατηγορία είναι οι φυλές οι οποίες συνδυάζουν υψηλή γονιμότητα και απόδοση γάλακτος. Μεταξύ των σημαντικότερων γαλακτοπαραγωγικών και γόνιμων φυλών είναι εκείνες της Χίου και της Σκοπέλου. Αξίζει επίσης να αναφερθεί η φυλή της Ζακύνθου (Ζάκυνθος), στη δυτική ακτή της Ελλάδας, η οποία, σύμφωνα με ορισμένες πηγές, εισήχθη από την Ιταλία (Georgoudis, Hatziminaoglou, and Pappas 1995).

Η σημερινή εξέλιξη και κατανομή των διαφόρων φυλών προβάτων είναι το αποτέλεσμα εξελίξεων και αλλαγών που σημειώθηκαν τα τελευταία τριάντα χρόνια. Η ανεξέλεγκτη διασταύρωση μεταξύ των διαφόρων φυλών και η απροσδόκητη έκταση της τεχνητής γονιμοποίησης έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην εξαφάνιση ορισμένων μικρότερων φυλών και στη μείωση του αριθμού των ορεινών πληθυσμών καθαρόαιμων φυλών και αυτό οδήγησε στη δημιουργία ενός προβάτου που προέρχεται από διασταυρώσεις και που σήμερα αντιπροσωπεύει την πλειοψηφία των Ελληνικών πληθυσμών προβάτων (Georgoudis, Hatziminaoglou, and Pappas 1995).

Σαρακατσάνικη φυλή

Το Sarakatsan (επίσης Karakachan, Karatsaniko), η φυλή των νομαδικών Σαρακατσάνων βοσκών, είναι μια άλλη διαβάθμιση της φυλής του ορεινού Zackel και βρίσκεται κυρίως στην ελληνική Μακεδονία και τη Θράκη και στα βουνά της Βουλγαρίας. Ανήκει στα αναμικόμαλλα και λεπτόουρα πρόβατα και είναι μικρόσωμο. Το χρώμα είναι κυρίως μαύρο ή σκούρο καφέ, με λιγότερα από το 10% λευκά πρόβατα. Έχουν πλούσιο τρίχωμα και εκτρέφονται κυρίως για την παραγωγή γάλακτος, για τη μετατροπή του σε τυρί. Η Sarakatsan είναι μια φυλή που αντέχει στις κακουχίες, αλλά δεν είναι τόσο καλά προσαρμοσμένη όσο η Βλάχικη στις δυσμενείς συνθήκες του χειμώνα στις ψηλές πεδιάδες (σε υψόμετρο 1 000 μέτρων ή και περισσότερο), γιαυτό και απειλείται με εξαφάνιση και ακολουθούνται αγρο-περιβαλλοντικά προγράμματα για τη διάσωση της. Τα καφέ ή τα μαύρα πρόβατα φαίνεται να είναι πιο ανθεκτικά και δυνατά από τα λευκά (Kominakis and Rogdakis n.d.).



Εικόνες 1-2. Πρόβατα φυλής Sarakatsan (πηγή: <http://www.gaiapedia.gr>)

Φυλή boutsiko

Το Boutsiko ή αλλιώς ορεινό της Ηπείρου, διασταυρώθηκε με το Σαρακατσάνικο και το Γραμμουσιανό στα τέλη του 18^{ου} αιώνα και θεωρείται βελτίωση του γνήσιου Βλάχικου προβάτου. Μπορεί να βρεθεί στις ορεινές περιοχές της Ηπείρου και στη Δυτική Μακεδονία, ενώ λόγω του μικρού αριθμού του, θεωρείται είδος υπό εξαφάνιση, γι' αυτό και γίνονται προσπάθειες να αποθηκευτεί το σπέρμα του, ώστε να μπορέσει να διατηρηθεί η φυλή. Είναι ο κύριος εκπρόσωπος της εγχώριας λεπτόουρης και αναμικόμαλλης φυλής. Το χρώμα του ποικίλει, με ποιο συχνό το λευκό τρίχωμα με καφέ ή μαύρε κηλίδες στο πρόσωπο και τα πόδια. Εκτρέφεται για την παραγωγή γάλακτος, για το κρέας και το τρίχωμα του (Kugler n.d.).



Εικόνες 3-4. Πρόβατα φυλής Boutsiko (πηγή: <http://www.gaiapedia.gr>)

Φυλή Κύμης

Προέρχεται από τη φυλή της Σκοπέλου και εντοπίζεται στην Εύβοια. Η φυλή αυτή λόγω του αριθμού των εκτρεφόμενων ατόμων έχει καταταχθεί στην κατηγορία "ευαίσθητη" στις προστατευόμενες από εξαφάνιση αυτόχθονες φυλές. Το μαλλί του είναι λεπτό και πυκνό. Η πλειονότητα των προβάτων έχουν λευκό χρωματισμό σε όλο το σώμα εκτός από τα αυτιά, το στόμα και γύρω από τα μάτια, όπου είναι μαύρο ή φαιόμαυρο (Kugler n.d.).



Εικόνες 5-6. Πρόβατα φυλής Κύμης (πηγή: <http://www.gaiapedia.gr>)

Φυλή Άργους

Τα πρόβατα αυτά έχουν καταγωγή από τη Μικρά Ασία, ενώ δημιουργήθηκαν στην περιοχή της Αργολίδος ύστερα από διασταυρώσεις που πραγματοποιήθηκαν μεταξύ ενός ντόπιου προβάτου, ενός πλατύουρου της Ανατολής και πολύ πιθανό του Χιακού προβάτου και συνεχούς φυσικής και τεχνητής επιλογής στις συνθήκες της περιοχής. Σήμερα, μπορούν να βρεθούν στα πεδινά του Άργους, τη Μεσσηνία και την Πελοπόννησο. Η φυλή αυτή απειλείται με εξαφάνιση. Έχει χαρακτηριστικό μαύρο πρόσωπο και άσπρη την κορυφή της κεφαλής, με λευκό κορμό, χοντρή ουρά και πυκνό τρίχωμα. Μάλιστα ορισμένα ζώα φέρουν άσπρες κηλίδες στα αυτιά και στην κάτω

γνάθο, ενώ ελάχιστα πρόβατα φέρουν άσπρη ρίγα κατά μήκος της μύτης. Τα πόδια είναι τελείως λευκά. Εκτρέφονται κυρίως για το γάλα και το κρέας τους (Kugler n.d.).



Εικόνες 7-8. Πρόβατα φυλής Άργους (πηγή: <http://www.gaiapedia.gr>)

Φυλή Φλώρινας

Ονομάζεται και φυλή Πελαγονίας και προέρχεται από αυτόχθονες φυλές, πιθανότατα από τη διασταύρωση του ντόπιου βουνίσσιου τύπου με του πεδινού τύπου Zackel. Η φυλή αυτή έχει πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τις φυλές Κύμης και Σκοπέλου και υπάρχει η άποψη ότι όλα σχεδόν τα ζώα της φυλής Φλώρινας-Πελαγονίας προέρχονται από τη φυλή Χαλκιδικής η οποία έχει εξαφανιστεί. Εντοπίζεται στη δυτική Μακεδονία και αριθμεί πολύ λίγα πρόβατα, κινδυνεύοντας έτσι άμεσα με εξαφάνιση. Γι' αυτό το λόγω εκτρέφεται κοπάδι αυτής της φυλής στο Ινστιτούτο Ζωικής Παραγωγής, στα Γιαννιτσά και γίνεται προσπάθεια να συντηρηθεί μέσω αγρο-περιβαλλοντικών προγραμμάτων. Τα πρόβατα αυτά έχουν λεπτό τρίχωμα.

Το σώμα είναι λευκό ενώ τα περισσότερα πρόβατα φέρουν μελανό δακτύλιο γύρω από τους οφθαλμούς. Πολλά από αυτά φέρουν μαύρες κηλίδες στα αυτιά και μερικά και στην άκρη του στόματος και στα άκρα. Μικρό ποσοστό δε φέρει καθόλου μαύρες κηλίδες και ένα άλλο επίσης μικρό ποσοστό φέρει μαύρες κηλίδες στο σώμα (Declining Breeds of Mediterranean Sheep n.d.).



Εικόνες 9-10. Πρόβατα φυλής Φλώρινας (πηγή: <http://www.gaiapedia.gr>)

Φυλή Θράκης

Αυτόχθονη φυλή με επιρροή από τις φυλές Tsigai της Νοτιοανατολικής Ευρώπης. Σήμερα εντοπίζεται μόνο στη Θράκη και ο αριθμός των προβάτων είναι κρίσιμος, με αποτέλεσμα να κινδυνεύει η φυλή να χαρακτηριστεί 'υπό εξαφάνιση'. Για αυτό το λόγο, γίνονται προσπάθειες να διατηρηθεί ο αριθμός τους, μέσω διαφόρων αγρο-περιβαλλοντικών προγραμμάτων. Είναι ομοιόμαλλα και ο χρωματισμός τους είναι συνήθως λευκός. Πολλά λευκά άτομα έχουν καστανές ή μαύρες κηλίδες γύρω από τους οφθαλμούς, στα αυτιά, στα άκρα και συχνά στον κορμό. Σε πολύ μικρό ποσοστό απαντώνται και άτομα εντελώς μαύρα. Τα πρόβατα αυτά εκτρέφονται κυρίως για την παραγωγή γάλακτος (Kugler n.d.).



Εικόνες 11-12. Πρόβατα φυλής Θράκης (πηγή: <http://www.gaiapedia.gr>)

Φυλή Σκοπέλου

Έχει προέλευση από τα πρόβατα της Χαλκιδικής και εντοπίζεται στη Σκόπελο και τη Μαγνησία. Το πρόβατο της φυλής Σκοπέλου είναι συνήθως οικόσιτο. Είναι φυλή με λεπτό τρίχωμα. Είναι ομοιόμαλλο και ο χρωματισμός του είναι λευκός με μαύρες κηλίδες στο πρόσωπο. Απειλείται με εξαφάνιση, για αυτό το λόγο γίνεται προσπάθεια διατήρησης του μέσω αγρο-περιβαλλοντικών προγραμμάτων διατήρησης (Kugler n.d.).



Εικόνες 13-14. Πρόβατα φυλής Σκοπέλου (πηγή: <http://www.gaiapedia.gr>)

Καραγκούνικη φυλή

Προέρχεται από την κεντρική Ελλάδα (Θεσσαλία), από την φυλή Zackel και είναι μια κλασική εγχώρια φυλή της πεδιάδας με μικτού τύπου τρίχωμα. Τα κριάρια (αρσενικά πρόβατα) της φυλής αυτής χρησιμοποιούνται σε πολλές περιπτώσεις για να αναβαθμίσουν τις φυλές του βουνού ώστε να έχουν υψηλότερη παραγωγικότητα.

Ο χρωματισμός του τριχώματος ποικίλλει αφού μπορούν να είναι λευκά ή μαύρα ή λευκά με μελανές κηλίδες στο σώμα, το πρόσωπο, τα αυτιά και τα άκρα. Το χαρακτηριστικό χρώμα τριχώματος είναι υπόλευκο με μαύρες κηλίδες στο κεφάλι και τα πόδια. Στη φυλή αυτή παρατηρείται ιδιαίτερα αυξημένη παραγωγή γάλακτος και πρόκειται για σφάγια καλής ποιότητας. Είναι ανθεκτικό σε ακραίες θερμοκρασίες και ασθένειες (Georgoudis, Hatziminaoglou, and Pappas 1995).



Εικόνες 15-16. Πρόβατα Καραγκούνικης φυλής (πηγή: <http://www.gaiapedia.gr>)

Φυλή Άρτας

Το πρόβατο φυλής Φριζάρτα προήλθε από τη διασταύρωση του εγχώριου πεδινού προβάτου Άρτας με κριούς της φυλής Ανατολικής Φρισλανδίας, κυρίως όμως μετά το 1968 με τη χρήση της τεχνητής σπερματέγχυσης και τη συνεχή εφαρμογή της επιλογής των ομοιόμορφων και καλύτερων σε αποδόσεις προβατίνων και κριών, προσαρμοσμένων καλά στις τοπικές εδαφοκλιματικές συνθήκες. Εντοπίζεται στην περιοχή της Ηπείρου, τη δυτική Πελοπόννησο και στον νομό Αιτωλοακαρνανίας.

Ο χρωματισμός του προβάτου αυτού είναι κατά κανόνα λευκός. Ελάχιστα άτομα, φέρουν ερυθροκαστανούς δακτύλιους γύρω από τα μάτια ή κηλίδες στο επιρρίνιο και στα άκρα των αυτιών. Αυτή η φυλή έχει το καλύτερο ποσοστό γαλακτοπαραγωγής από τις άλλες ελληνικές φυλές και ικανοποιητική παραγωγή κρέατος, ωστόσο χρειάζεται περισσότερη φροντίδα και είναι πολύ πιο ευαίσθητη στις πνευμονικές ασθένειες (Hatziminaoglou, Zervas, and Boyazoglu n.d.).



Εικόνες 17-18. Πρόβατα φυλής Φριζάρτα (πηγή: <http://www.gaiapedia.gr>)

Φυλή Χίου

Τα πρόβατα αυτά κατάγονται από το νότιο πεδινό τμήμα της νήσου Χίου. Προήλθαν πιθανόν από διασταυρώσεις ομοιόμαλλων λεπτούρων προβάτων της Χίου με αναμικόμαλλα παχύουρα πρόβατα της Μικράς Ασίας. Πιθανά να έχει τις ρίζες της στις φυλές Κινίγκικ και Daglic. Εντοπίζεται στην δυτική και ανατολική Μακεδονία, καθώς και σε άλλα τμήματα της νησιωτικής και ηπειρωτικής Ελλάδας. Σήμερα θεωρείται μία από τις πιο περιζήτητες φυλές για την αναβάθμιση των ποιμνίων. Είναι η πιο γνωστή ελληνική φυλή προβάτων στο εξωτερικό και ιδιαίτερα δημοφιλής σε όλη την επικράτεια λόγω των υψηλών του αποδόσεων σε γάλα, της υψηλής πολυδυμίας της και προσαρμοστικότητάς της στις διάφορες κλιματολογικές συνθήκες.

Ο χρωματισμός της φυλής είναι λευκός με μαύρες κηλίδες στο πρόσωπο, τα αυτιά, τα άκρα και την κοιλιακή χώρα. Δεν υπάρχει πρόβατο της φυλής χωρίς μαύρες κηλίδες στο πρόσωπο και τα άκρα. Η ποιότητα του μαλλιού δεν είναι ιδιαίτερα καλή και η παραγόμενη ποσότητα μαλλιού είναι χαμηλή. Συνήθως η κεφαλή, τα άκρα, το κάτω τμήμα του τραχήλου και του κορμού δεν καλύπτονται από μαλλί (Hatziminaoglou, 1999).



Εικόνες 19-20. Πρόβατα φυλής Χίου (πηγή: <http://www.gaiapedia.gr>)

Φυλή Κατσικά (Ηπείρου)

Η φυλή προβάτου Κατσικά δημιουργήθηκε προπολεμικά στην περιοχή του Κατσικά (Ιωαννίνων) από διασταυρώσεις του ορεινού προβάτου Ηπείρου με το караμάνικο πεδινό πρόβατο που είχε προέλευση την Κεντρική Τουρκία. Σήμερα εντοπίζεται στην Ήπειρο και θεωρείται απειλούμενο είδος. Για αυτό το λόγο, γίνονται προσπάθειες να

διατηρηθεί ο αριθμός του, μέσω διαφόρων αγρο-περιβαλλοντικών προγραμμάτων και αποθήκευσης του σπέρματος. Η φυλή Κατσικά παρουσιάζει ομοιομορφία στο χρωματισμό. Τα ζώα είναι λευκά, με μελανές κηλίδες στα αυτιά, στο στόμα, γύρω από τους οφθαλμούς και τις παρειές του προσώπου. Διαφοροποιήσεις παρατηρούνται στο μέγεθος των κηλίδων και στην ύπαρξη ή όχι μελανών κηλίδων γύρω από το στόμα. Οι παραγωγικές αποδόσεις των προβάτων της φυλής είναι σχετικά υψηλές (Declining Breeds of Mediterranean Sheep n.d.).



Εικόνες 21-22. Πρόβατα φυλής Κατσικά (πηγή: <http://www.gaiapedia.gr>)

Φυλή Ζακύνθου

Το πρόβατο της Ζακύνθου διαφέρει σημαντικά των άλλων ελληνικών φυλών προβάτων στη σωματική διάπλαση, στο μαλλί του και στις αποδόσεις. Μοιάζει πολύ με την ιταλική φυλή Bergamasca και είναι πολύ πιθανόν να εισήχθησαν πρόβατα στη Ζάκυνθο από τους Ενετούς. Ο χρωματισμός είναι εντελώς λευκός σε όλα τα μέρη του σώματος. Πολύ λίγα ζώα φέρουν σκοτεινόχρωμα στίγματα στο πρόσωπο και τα αυτιά. Το μαλλί του είναι ανάμικτο και έχει τις περισσότερες τρίχες αγανώδεις, χονδρές και μακριές. Η κοιλιά, το κεφάλι, το κάτω μέρος του λαιμού και τα πόδι είναι γυμνά μαλλιού. Είναι από τα πλέον μεγαλόσωμα πρόβατα της χώρας. Παρά τις υψηλές του αποδόσεις σε γάλα και κρέας και την αντοχή του σε αντιξοότητες δεν κατάφερε να πολλαπλασιαστεί και κινδυνεύει τώρα να εξαφανισθεί. Αυτό οφείλεται ότι τα παράγωγα που προέρχονται από διασταύρωση με άλλες φυλές και κυρίως Φριζάρτα δίνουν μεγάλες αποδόσεις. Συνήθως τα προϊόντα της πρώτης γενεάς μορφολογικά μοιάζουν πολύ με καθαρόαιμα ζώα φυλής Ζακύνθου και αυτό συγχέει τον εκτροφέα στην επιλογή των ζώων αναπαραγωγής με συνέπεια να μην μπορεί αυτός να εφαρμόσει κάποιο πρόγραμμα διατήρησης καθαρόαιμου ποιμνίου της φυλής εφόσον το θέλει (Welcome to the Agrobiodiversity Network n.d.; Kominakis and Rogdakis n.d.).



Εικόνες 23-24. Πρόβατα φυλής Ζακύνθου (πηγή: <http://www.gaiapedia.gr>)

Η ποικιλομορφία στο χρώμα του τριχώματος αποτελεί ένα από τα πιο εμφανή φαινοτυπικά χαρακτηριστικά στα σπονδυλωτά. Αν και τα θηλαστικά γενικότερα παρουσιάζουν μικρότερη χρωματική ποικιλομορφία, η γενετική βάση του χρωματισμού του τριχώματος έχει μελετηθεί περισσότερο σε αυτά και είναι καλύτερα κατανοητή σε σχέση με άλλες ομάδες σπονδυλωτών (Andersson 2012).

Η επιλογή στο χρώμα του τριχώματος συμβαίνει νωρίς στην εξημέρωση των ζώων επειδή: το χρώμα του τριχώματος και η μεταβολή του προτύπου είναι εύκολα αναγνωρίσιμο, η φυσική επιλογή όσο αφορά τις μεταβολές στο χρώμα του τριχώματος και του προτύπου χρωματισμού δεν είναι έντονη και οι άνθρωποι επιλέγουν ζώα με μοναδικά χρώματα και πρότυπα τριχώματος (Andersson 2012; Larson and Burger 2013). Πάνω από 300 γενετικοί τόποι σε πάνω από 150 γονίδια που επηρεάζουν το χρώμα και το πρότυπο τριχώματος έχουν ταυτοποιηθεί στα θηλαστικά. Συγκεκριμένα, στα πρόβατα, το χρώμα και το μοτίβο τριχώματος είναι αποτέλεσμα της χρώσης των τριχών του μαλλιού με μελανίνη. Παρόλο που τα πρόβατα παρουσιάζουν μια μεγάλη ποικιλία χρωμάτων και προτύπων τριχώματος, είναι ένα καλό μοντέλο για τη μελέτη του χρώματος τριχώματος και του προτύπου χρωματισμού επειδή πολλές φυλές έχουν διατηρημένα αλληλόμορφα χρώματος τριχώματος.

Υπάρχει άφθονη μελανίνη σε πολλούς οργανισμούς όπως σε βακτήρια, μύκητες, φυτά και ζώα. Αυτή η χρωστική ουσία παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία από τις μεταλλαξιγόνες επιδράσεις του υπεριώδους φωτός, σε χηλικούς τοξικούς κατιόντες και στο μεταβολισμό κάποιων τοξικών φαρμάκων. Η μελανίνη επίσης, αυξάνει την ανοσία στον άνθρωπο περιορίζοντας την ανάπτυξη του ιού ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας *in vitro* και *in vivo*. Υπάρχει σημαντικό ενδιαφέρον για την εκμετάλλευση της χρήσης μελανίνης για φαρμακευτικά προϊόντα και καλλυντικά, αλλά και ως πρόσθετο τροφίμων. Αν και η μελανίνη συντίθεται από πολλούς οργανισμούς, η φυσική μελανίνη δεν μπορεί να συντεθεί τεχνητά σε μεγάλες ποσότητες, περιορίζοντας έτσι τη χρήση της στα διάφορα πεδία ενδιαφέροντος (Deng et al. 2006).

Στα θηλαστικά, το χρώμα του τριχώματος εξαρτάται από δύο παράγοντες: τη συνολική ποσότητα χρωστικών και την αναλογία ανάμεσα στη χρωστική ευμελανίνη (μαύρο/καφέ χρώμα) και την φαιομελανίνη (κίτρινο/κόκκινο χρώμα). Και οι δύο χρωστικές παράγονται στα μελανοκύτταρα, ειδικά κύτταρα που παράγουν χρωστικές σε ειδικά οργανίδια, τα μελανοσώματα. Τα μελανοκύτταρα εντοπίζονται κυρίως στην επιδερμίδα, στην ίριδα του οφθαλμού και στους θύλακες των τριχών και είναι υπεύθυνα για το χρώμα του δέρματος, των ματιών και των μαλλιών (Deng et al. 2006). Τα κύτταρα που ονομάζονται μελανοκύτταρα παράγουν δύο διαφορετικούς τύπους μελανίνης οι οποίοι μεταφέρονται σε κοκκία που ονομάζονται μελανοσώματα (Li, Tiirikka, and Kantanen 2014)(Deng et al. 2006). Ευμελανίνη ή φαιομελανίνη παράγονται μετά τη δέσμευση ενός αγωνιστή μελανοκορτίνης (αMSH) ή της ανταγωνιστικής

πρωτεΐνης σηματοδότησης agouti (ASIP) αντίστοιχα στον υποδοχέα 1 της μελανοκορτίνης (MC1R). Τα μελανοσώματα μεταφέρουν μελανίνη στα κερατινοκύτταρα, έναν κυρίαρχο κυτταρικό τύπο στο εξωτερικό στρώμα του δέρματος και τα κερατινοκύτταρα μπορούν στη συνέχεια να ενσωματώνουν μελανίνη στην ανάπτυξη των τριχών.

Παρά το γεγονός ότι στην παραγωγή μελανίνης συμμετέχει ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων, υπάρχουν κάποιες ουσίες που παίζουν ρόλο – κλειδί στην όλη διαδικασία:

- Το cAMP και τα ιόντα Ca^{2+} που διεγείρουν τη σύνθεση της L-τυροσίνης από L-φαινυλαλανίνη στα αρχικά στάδια της μελανογένεσης.
- Η τυροσινάση, η πιο σημαντική από τα ένζυμα που συμμετέχουν στη μελανογένεση (melanogenesis related enzymes, MRE) η οποία ρυθμίζει την ταχύτητα και την εξειδίκευση της μελανογένεσης. Μεταλλάξεις που έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια της δραστηριότητας του ενζύμου οδηγούν μεταξύ άλλων σε αλφισμό.
- Δύο πρωτεΐνες που εξαρτώνται από την τυροσινάση (tyrosinase related proteins), οι TRP1 και TRP2 που διεγείρουν περαιτέρω τη σύνθεση της ευμελανίνης, η οποία όμως επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες όπως το pH, τη συγκέντρωση μεταλλικών ιόντων και τη συγκέντρωση οξυγόνου (V\age et al. 1999).
- Οι ορμόνες MSH (Melanocyte stimulating hormones) οι οποίες ελέγχουν τα επίπεδα του cAMP στο εσωτερικό των μελανοκυττάρων. Οι α -MSH και β -MSH αποτελούν ενδογενείς αγωνιστές του υποδοχέα 1 της μελανοκορτίνης.
- Ο υποδοχέας 1 της μελανοκορτίνης (Melanocortin receptor 1, MC1R), ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας που συνδέεται με G πρωτεΐνες. Η σύνδεση των MSH στον MC1R ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση, ένα ένζυμο που μετατρέπει το ATP σε cAMP, διεγείροντας ταυτόχρονα την παραγωγή ευμελανίνης.

Ο MC1R αποτελεί έναν από τους βασικότερους ρυθμιστές της μελανογένεσης. Αν, για παράδειγμα αποτύχει να διεγείρει την παραγωγή cAMP, τότε το χρώμα του τριχώματος καθορίζεται κυρίως από τη φαιομελανίνη. Στα θηλαστικά, η έκφραση του γονιδίου, το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 16 για τον άνθρωπο και στο χρωμόσωμα 14 για το πρόβατο, ρυθμίζεται από τον παράγοντα μεταγραφής που σχετίζεται με τη μικροφθαλμία (MITF). Παρακάτω περιγράφεται σε συντομία το σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποίησης παραγωγής φαιομελανίνης και ευμελανίνης στα μελανοκύτταρα, στο οποίο εμπλέκεται ο υποδοχέας MC1R (εικόνα 25).

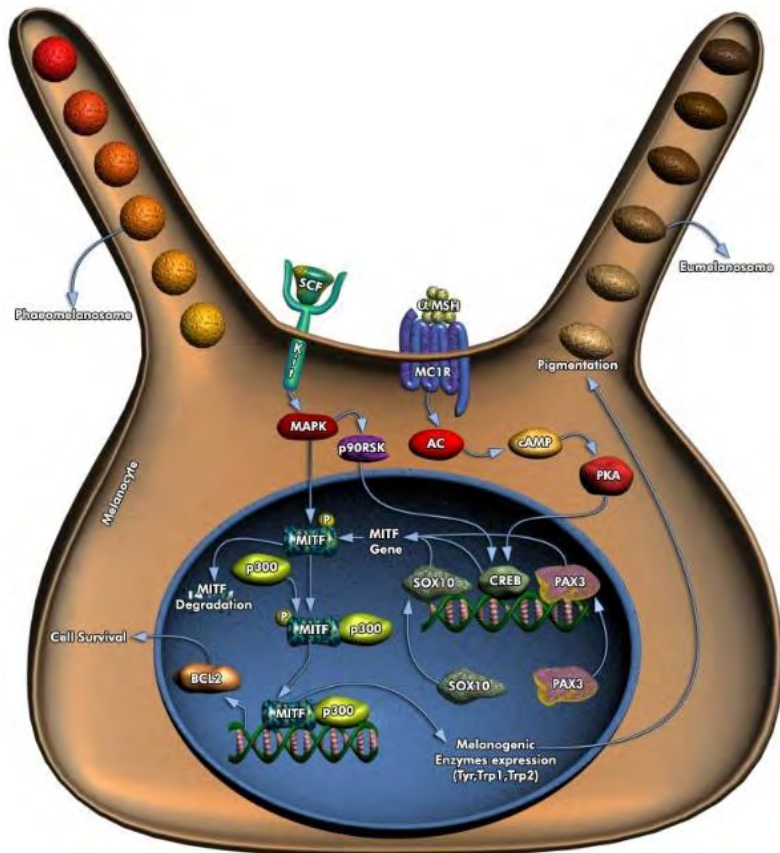
Μεταλλάξεις του γονιδίου MC1R είτε μπορούν να δημιουργήσουν έναν υποδοχέα που σηματοδοτεί συνεχώς, ακόμη και όταν δεν διεγείρεται, ή μπορούν να μειώσουν τη δραστηριότητα του υποδοχέα. Έτσι μεταλλάξεις που οδηγούν σε υπερλειτουργικό MC1R οδηγούν στη δημιουργία σκουρόχρωμου τριχώματος σε ποντίκια, χοίρους και πρόβατα και σκουρόχρωμο πτερώματος στα κοτόπουλα (Vla age et al. 1999). Τα αλληλόμορφα για μόνιμα ενεργό MC1R έχουν επικρατή κληρονόμηση και το κυρίαρχο μαύρο αλληλόμορφο που οφείλεται σε οποιαδήποτε από τις δύο μεταλλάξεις c.218T> A και c.361G> A (Vla age et al. 2003; Vla age et al. 1999). Αντίστοιχα μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια της λειτουργίας του MC1R (υποτελή αλληλόμορφα) συνήθως έχουν σαν αποτέλεσμα ανοιχτούς κίτρινους ή και κόκκινους χρωματισμούς, συμπεριλαμβανομένων και των κόκκινων μαλλιών και του ανοιχτόχρωμου δέρματος στον άνθρωπο.

Όχι μόνο η μελέτη του χρώματος του τριχώματος συμβάλλει στην κατανόηση του τρόπου λειτουργίας των γονιδίων, αλλά οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με το χρώμα του τριχώματος και το πρότυπο του χρωματισμού στα σύγχρονα ζώα μπορούν να βοηθήσουν να κατανοήσουμε την ιστορία των πληθυσμών: Η μετάλλαξη MC1R στους χοίρους του Θιβέτ και του Landrace έδειξε διαφορετικά επίπεδα διακύμανσης που αντανακλούν τα διαφορετικά επιλογής στις δύο τοποθεσίες (Deng et al. 2009).

Τα τρία αλληλόμορφα του γονιδίου MC1R είναι το επικρατές μαύρο (E^D), το αγρίου τύπου (E^+) και το υπολειπόμενο κόκκινο αλληλόμορφο (e). Το επικρατές μαύρο (E^D) είναι επικρατές έναντι των άλλων δύο αλληλομόρφων και τα πρόβατα με αυτό το αλληλόμορφο είναι κατά κανόνα μαύρα (εντελώς ή με κηλίδες). Το αγρίου τύπου αλληλόμορφο (E^+) δίνει πρόβατα με κιτρινόλευκο χρωματισμό με σκούρες κυλίδες στο πρόσωπο. Δύο αντίγραφα του υπολειπόμενου κόκκινου αλληλομόρφου (e) προκαλούν τον ανοιχτόχρωμο και κόκκινο χρωματισμό τριχώματος. Τα υπόλοιπα γονίδια που σχετίζονται με το χρωματισμό του τριχώματος, δρούν επηρεάζοντας αυτούς τους βασικούς φαινότυπους, προσθέτοντας μοτίβα με άσπρες κηλίδες, αναδιοργανώνοντας την κατανομή των κόκκινων και μαύρων χρωστικών (όπως το γονίδιο Agouti) ή αλλοιώνοντας τους παραπάνω χρωματισμούς. Οι πιθανοί συνδυασμοί αλληλομόρφων που αφορούν το γενετικό τόπο extension, καθώς και ο φαινότυπος που προκύπτει όσο αφορά το χρωματισμό του τριχώματος, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Πιθανοί συνδυασμοί αλληλομόρφων και φαινότυπος που αντιστοιχεί

E^D/E^D :	Επικρατές μαύρο. Αυτό το ζώο δεν μπορεί να δώσει ανοιχτόχρωμους απογόνους
E^D/E^+ :	Επικρατές μαύρο, φορέας του κόκκινου/λευκοκίτρινου
E^D/e :	Επικρατές μαύρο, φορέας του κόκκινου/λευκοκίτρινου
E^+/E^+ :	Λευκοκίτρινος χρωματισμός με καφέ/μαύρες κηλίδες
E^+/e :	Λευκοκίτρινος/κόκκινος χρωματισμός
e/e :	Κόκκινος χρωματισμός

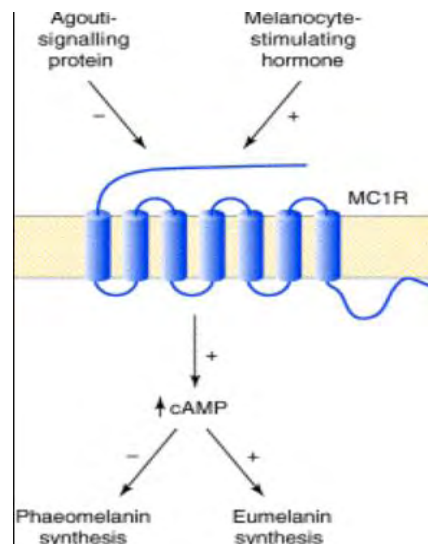


Εικόνα 25. Το μονοπάτι ενεργοποίησης παραγωγής φαιομελανίνης και ευμελανίνης στα μελανοκύτταρα μέσω της ορμόνης α-MSH. Η ορμόνη άλφα- MSH παράγεται μαζί με άλλα πεπτίδια μέσω πρωτεόλυσης μια μεγάλης πρόδρομης πρωτεΐνης της POMC (προοπιομελανοκορτίνη). Όταν η α-MSH προσδένεται στον υποδοχέα MC1R ενεργοποιείται η AC (αδενυλική κυκλάση) η οποία με τη σειρά της προκαλεί αύξηση του ενδοκυττάριου cAMP (κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη). Το cAMP με την σειρά του ενεργοποιεί την PKA (πρωτεϊνική κινάση A) η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την πρωτεΐνη CREB (πρωτεΐνη πρόσδεσης ανταποκρινόμενη στο cAMP, μεταγραφικός παράγοντας) η οποία προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου MITF (γονίδιο για την μικροθφαλία) διεγείροντας έτσι την μεταγραφή του. Επιπλέον το cAMP αυξάνει την συγγένεια πρόσδεσης μεταξύ της MITF και των υποκινητών γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα υπεύθυνα για την μελανογένεση.

(πηγή: <https://www.qiagen.com/kr/shop/genes-and-pathways/pathway-details/?pwid=287>)

Αλληλεπίδραση γονιδίων MC1R και ASIP

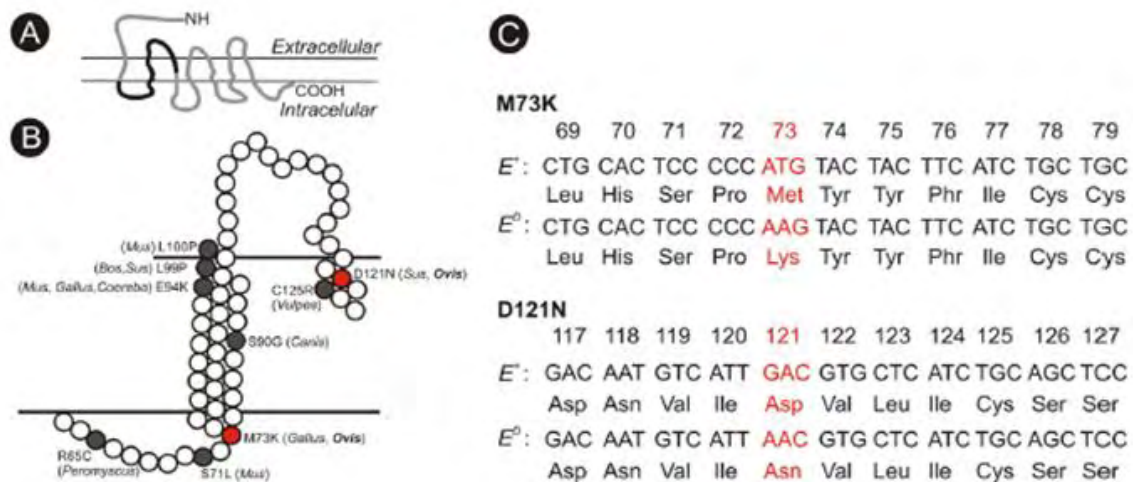
Η μεταβλητότητα στο χρώμα του τριχώματος οφείλεται στην παρουσία, την κατανομή και τη βιοχημική δραστηριότητα των μελανοκυττάρων στα οποία οι δύο τύποι μελανίνης (ευμελανίνη και φαιομελανίνη, που καθορίζουν το μαύρο / καφέ και κόκκινο / λευκοκίτρινο χρώμα, αντίστοιχα) συντίθενται. Ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων επηρεάζει το χρώμα του τριχώματος όπως αναφέρεται στον εργαστηριακό ποντικό που χρησιμεύει ως είδος-μοντέλο για τις μελέτες αυτές. Ωστόσο, δύο γενετικοί τύποι (Agouti και Extension) παίζουν σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό του χρώματος του τριχώματος με τον έλεγχο και τη ρύθμιση των σχετικών ποσοτήτων ευμελανίνης και φαιομελανίνης στο δέρμα και τα μαλλιά. Ο γενετικός τύπος Agouti κωδικοποιεί την πρωτεΐνη σηματοδότησης agouti (ASIP), ένα μικρό μόριο σηματοδότησης με παρακρινή δράση που αλληλεπιδρά με το προϊόν του γενετικού τύπου extension. Ο γενετικός τύπος extension κωδικοποιεί τον υποδοχέα μελανοκορτίνης 1 (MC1R) που είναι μια επταμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη που βρίσκεται στην επιφάνεια των μελανοκυττάρων και συνδέεται με G-πρωτεΐνη. Η δέσμευση του MC1R με την ορμόνη διέγερσης των μελανοκυττάρων α (α -MSH) επάγει σύνθεση ευμελανίνης, ενώ η εναλλακτική δέσμευση με το ASIP προκαλεί τη σύνθεση φαιομελανίνης. Οι γενετικοί τύποι Agouti και Extension παρουσιάζουν επιστατικές αλληλεπιδράσεις με λίγες εξαιρέσεις. Τα επικρατή αλληλόμορφα του Extension προκαλούν μαύρο χρωματισμό, ενώ τα υπολειπόμενα αλληλόμορφα παρατείνουν την παραγωγή φαιομελανίνης, καθορίζοντας τον κόκκινο/ κίτρινο/ ανοιχτόχρωμο χρωματισμό. Η παρουσία των αλληλόμορφων Extension άγριου τύπου χρειάζεται συνήθως για την έκφραση των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων Agouti που έχουν, γενικά, αντίθετα μοντέλα δράσης, δηλαδή τα επικρατή αλληλόμορφα Agouti καθορίζουν φαιομελανικούς φαινότυπους, ενώ τα υποτελή αλληλόμορφα προκαλούν μαύρου χρώματος τρίχωμα (Fontanesi et al. 2010).



Εικόνα 26. Αλληλεπίδραση μονοπατιού σήματος α -MSH και ASIP (πηγή: <https://academic.oup.com>)

Αναλύοντας το γονίδιο MC1R του προβάτου, οι Våge et al. (1999) ταυτοποίησαν δύο παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (p.M73K και p.D121N) προσδιορίζοντας το κυρίαρχο μαύρο αλληλόμορφο (E^D) στη νορβηγική φυλή Dala. Η παρουσία αυτών των δύο μεταλλάξεων παρατηρήθηκε και σε άλλες φυλές προβάτων: Corriedale, Damara, Black Merino, Black Castellana και Karakul. Φαρμακολογικός χαρακτηρισμός από αυτές τις δύο υποκαταστάσεις αμινοξέων αποκάλυψε ότι η υποκατάσταση p.M73K από μόνη της ήταν ικανή να ενεργοποιήσει συστατικά τον υποδοχέα, πιθανώς αυξάνοντας τη σταθερότητα της κατάστασης ενεργοποίησης υψηλής συγγένειας. Ωστόσο, σύμφωνα με το φαινότυπο που παρατηρείται σε άλλα είδη που έχουν τις ίδιες δύο μεταλλαγμένες θέσεις (κοτόπουλο p.M73K, χοίρος, p.D121N), φαίνεται λογικό να υποθέσουμε ότι οποιαδήποτε από τις δύο μεταλλάξεις θα ήταν από μόνη της ικανή να καθορίσει τη συστατική σύνθεση ευμελανίνης. Μια άλλη υπόθεση θα μπορούσε να είναι ότι καθεμία από αυτές τις μεταλλάξεις θα μπορούσε να προκαλέσει μια ασθενέστερη ενεργοποίηση του υποδοχέα που είναι παρόμοιος με αυτόν που βρέθηκε στην αλεπού της φυλής Alaska silver και μόνο η παρουσία και των δύο μεταλλαγμένων θέσεων ή ομοζυγωτία για μια από τις 2 υποκαταστάσεις θα ήταν απαραίτητη να προκύψουν πλήρως μαύρα ζώα. Η εναλλακτική μορφή του γονιδίου MC1R (αλληλόμορφο E^+) που αναγνωρίστηκε από τους Våge et al. (1999) πρέπει να αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο άγριου τύπου του γενετικού τύπου Extension (Fontanesi et al. 2010).

Στα περισσότερα σπονδυλωτά είδη όπου το MC1R έχει μελετηθεί σε μοριακό επίπεδο, μία μόνο μετάλλαξη εξηγεί την παραγωγή της επικρατούς ευμελανίνης ή της μαύρης χρωστικής ουσίας. Σε παρόμοια μελέτη του χρωματισμού στο τρίχωμα των προβάτων, δύο μεταλλάξεις, η Met73Lys (ATG [AAG: A218T]) και η μετάλλαξη Asp121Asn (GAC [AAC: G361A]) βρέθηκαν στα Νορβηγικά πρόβατα Dala. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και αργότερα σε άλλη φυλή προβάτων, την Damara. Έτσι, οι Vage et al. πρότειναν ότι η διατήρηση αυτών των δύο ξεχωριστών μεταλλάξεων σε μια μεγάλη ποικιλία φυλών προβάτων οφείλεται για την έκφραση του επικρατούς μαύρου χρώματος τριχώματος. Για άλλα μηρυκαστικά, οι Klungland et al. ανέφεραν ότι όλα τα ζώα e/e είχαν κόκκινου χρώματος τρίχωμα στα νορβηγικά βοοειδή. Οι Sasazaki et al. βρήκαν δύο πολυμορφικές θέσεις των T296C (Leu99Pro) και T310Del του MC1R στα βοοειδή της Ιαπωνίας και Κορέας. Τα Ιαπωνικά Μαύρα Βοοειδή δεν έχουν ομόζυγα e/e (e, υποτελής, υπεύθυνο για παραγωγή κόκκινου χρώματος όταν είναι σε ομοζυγωτία), επομένως είναι σύμφωνο με το μαύρο χρώμα τριχώματος τους ως E^D (επικρατές αλληλόμορφο, υπεύθυνο για την παραγωγή του επικρατούς μαύρου χρώματος) και E^+ (intermediate= συν-επικρατές, παραγωγή μαύρου υποτελούς χρώματος) αλληλόμορφα που οδηγεί σε παραγωγή μαύρης χρωστικής. Ταυτόχρονα, τα περισσότερα από τα κορεάτικα βοοειδή της φυλής Hanwoo, τα οποία έχουν χρώμα τριχώματος που κυμαίνεται από κιτρινωπό καφέ έως σκούρο καφέ, συμπεριλαμβανομένου και τρίχωμα κόκκινου χρώματος, ήταν ομόζυγα e/e (Deng et al. 2009).



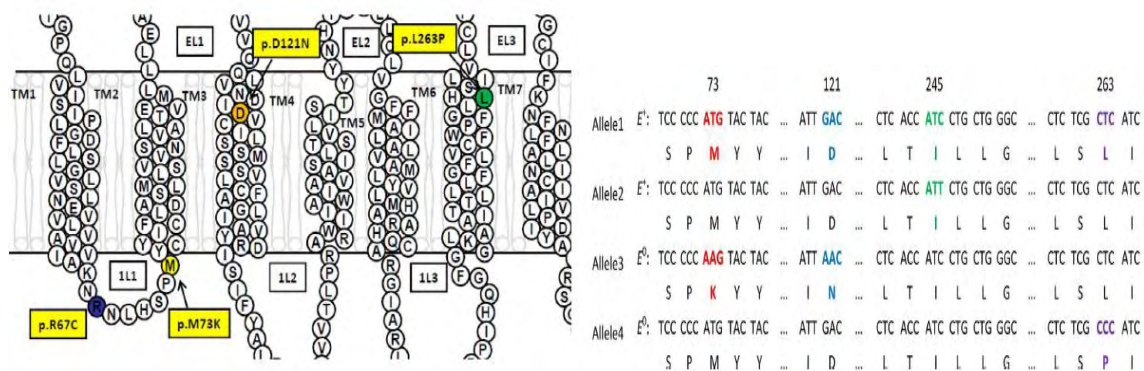
Εικόνα 27. Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου MC1R. Α) Δομή δύο διαστάσεων της πρωτεΐνης, με τη διαμεμβρανική περιοχή να αναπαριστάται με το έντονο μαύρο χρώμα στο σχήμα. Β) Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο MC1R, όπως περιγράφηκαν από τους Majerus και Mundy (2003). Γ) Ταυτοποίηση των 2 συγκεκριμένων μεταλλάξεων (αλληλόμορφο ε) στο γονίδιο MC1R στα πρόβατα της φυλής Creole, όπου φαίνονται οι αντικαταστάσεις Met73Lys (M73K) και Asp121Asn (D121N) (Hepp et al. 2012).

Πίνακας 2. SNPs που έχουν βρεθεί για το MC1R σε οικόσιτα πρόβατα (ovis aries) (Hepp et al. 2012)

SNP	Present	Amino acid change	Breed	Reference
-31G→A	Yes	None (5'-UTR)	Apennine, Bergamasca, Comisana, Cornigliese-like, DelleLanghe, Merinizzata Italiana, Sardinian, Valle Del Belice	Fontanesi et al. (2010)
12A→G	Yes	Synonymous	Nanping black-boned	Deng et al. (2009)
144G→C	Yes	Synonymous	Romney Marsh black-boned	Deng et al. (2009)
199C→T	Yes	Arg ⁶⁷ Cys	Valle del Belice	Fontanesi et al. (2010)
218T→A	Yes	Met ⁷³ Lys	Norwegian Dala Damara, Black Merino, Black Corriedale Manchega Black Castellana, Karakul Massese, Valle del Belice Creole	Våge et al. (1999) Våge et al. (2003) Calvo et al. (2006) Royo et al. (2008) Fontanesi et al. (2010) This study
	No		Aragonesa, Salz, Norwegian Pelt Nanping black-boned, Romney Marsh black-boned Xalda	Våge et al. (2003) Deng et al. (2009) Royo et al. (2008)
361G→A	Yes	Asp ¹²¹ Asn	Norwegian Dala Damara, Black Merino, Black Corriedale Manchega Black Castellana, Karakul Massese, Valle del Belice Creole	Våge et al. (1999) Våge et al. (2003) Calvo et al. (2006) Royo et al. (2008) Fontanesi et al. (2010) This study
	No		Aragonesa, Salz, Norwegian Pelt Nanping black-boned, Romney Marsh black-boned Xalda	Våge et al. (2003) Deng et al. (2009) Royo et al. (2008)
429C → T 600T → G 735T → C	Yes	Synonymous	Apennine, Bergamasca, Comisana, Cornigliese-like, Delle Langhe, Merinizzata Italiana, Sardinian, Valle del Belice Creole	Fontanesi et al. (2010) This study

Μεταλλάξεις του MC1R που βρέθηκαν σε ελληνικές φυλές προβάτων

Οι (Stamatis et al. 2017) μελέτησαν πληθυσμούς προβάτων από τις αυτόχθονες φυλές Φριζάρτα, Άργους, Κύμης, Χίου, Φλώρινας, Σαρακατσάνικο, Θράκης, Καραγκούνικο, Ζακύνθου, Κατσικά και Boutsiko. Έτσι εντοπίστηκαν τέσσερα διαφορετικά αλληλόμορφα (αλληλόμορφα 1-4). Χρησιμοποιώντας το αλληλόμορφο 1 ως αναφορά, βρέθηκαν τέσσερις νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs). Τρεις μεταλλάξεις έχουν αναφερθεί προηγουμένως (Våge et al., 1999; Fontanesi et al., 2010): μία συνώνυμη μετάλλαξη (c.735 C > T, p.245 Ile > Ile) (αλληλόμορφο 2) και δύο μη-συνώνυμες μεταλλάξεις που έχουν συσχετιστεί με το μαύρο χρώμα τριχώματος (c.218 T > A, p. 73 Met > Lys. c.361 G > A, p.121 Asp > Asn) (αλληλόμορφο 3). Μια μη-συνώνυμη μετάλλαξη που μέχρι πρότινος δεν είχε ανακαλυφθεί (c.789 T > C, p.263 Leu > Pro) (αλληλόμορφο 4) (GenBank αριθμός πρόσβασης: KY654345) ταυτοποιήθηκε στο CDS του γονιδίου MC1R. Αυτή η αλλαγή αμινοξέων φαίνεται να τροποποιεί τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Το αλληλόμορφο 1 ήταν μακράν το πιο συχνά εντοπιζόμενο (64%) και βρισκόταν και σε ομοζυγωτία και σε ετεροζυγωτία σε όλες τις αυτόχθονες φυλές που μελετήθηκαν. Ακολούθησε το αλληλόμορφο 2 με συχνότητα 24%, που υπάρχει σε όλες τις φυλές, κυρίως σε ετεροζυγωτία, εκτός από τον μαύρο πληθυσμό της φυλής Φριζάρτα και τα άτομα από την φυλή Άργους που ήταν όλα μαύρα. Το αλληλόμορφο 3 με συχνότητα 10% ήταν παρόν σε όλα τα άτομα με μαύρο χρώμα στις φυλές Φριζάρτα και Άργους, επιβεβαιώνοντας ότι πρόκειται για επικρατές αλληλόμορφο. Τέλος, το πρωτοεμφανιζόμενο αλληλόμορφο 4 βρέθηκε με συχνότητα 2% και ήταν παρόν μόνο στις φυλές της Φλώρινας και Θράκης. Παρακάτω φαίνονται σχηματικά τα αποτελέσματα της μελέτης των Stamatis et al.2017 (εικόνα 28).



Εικόνα 28. Πιθανό μοντέλο δυο διαστάσεων της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης MC1R (διαπερνά τη μεμβράνη 7 φορές) στη μεμβράνη των μελανοκυττάρων, όπου φαίνονται οι αμινοξικές αντικαταστάσεις που βρέθηκαν και στην παρούσα μελέτη. Τα γράμματα αντιπροσωπεύουν την αντικατάσταση αμινοξέων για κάθε πρωτεΐνη (Stamatis et al. 2017).

Τα βασικότερα γονίδια που έχει βρεθεί ότι καθορίζουν το χρωματισμό στο τρίχωμα των προβάτων είναι τα TYRP1, ASIP, MC1R και MITF (Li, Tiirikka, and Kantanen 2014). Το γονίδιο MC1R και η συσχέτιση των μεταλλάξεων του με το χρώμα του τριχώματος στα πρόβατα, δεν έχει αναλυθεί επαρκώς στις ελληνικές αυτόχθονες φυλές. Έχει βρεθεί ότι τρία είναι τα βασικά αλληλόμορφα που συμμετέχουν στον καθορισμό του χρώματος στο τρίχωμα των προβάτων. Αυτά είναι τα E^+ (αλληλόμορφο υπεύθυνο για το υποτελές μαύρο χρώμα τριχώματος), E^D (το επικρατές αλληλόμορφο, υπεύθυνο για το μαύρο χρώμα τριχώματος), και e (υπολοιπόμενο αλληλόμορφο, υπεύθυνο για το κόκκινο χρώμα). Η χρωμοσωμική περιοχή E-locus (extension locus) είναι υπεύθυνη για την παραγωγή του γονιδίου MC1-R (Stamatis et al. 2017).

Συνεπώς, η εκτίμηση του γενετικού πολυμορφισμού του γονιδίου MC1R στον ελληνικό πληθυσμό προβάτων κρίνεται αναγκαία ώστε να διερευνηθεί και να καταγραφεί η έκταση της γενετικής ποικιλότητας των αυτοχθόνων φυλών προβάτων.

Μια τέτοια καταγραφή, θα φανεί χρήσιμη στη σωστή εκτίμηση της κατανομής του εθνικού ζωικού κεφαλαίου και τη διαχείριση του μέσω προγραμμάτων διατήρησης της γενετικής ποικιλότητας. Η ενδοειδική, αλλά και η διαειδική μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας παρέχει πληροφορίες για τον έλεγχο σε επίπεδο φυλής (πχ το βαθμό ομομηξίας), καθώς και συμβάλλει στον εντοπισμό φυλών που αποκλίνουν και μπορεί να φέρουν νέους, διακριτούς γονοτύπους λόγω προσαρμογής σε κάποιο συγκεκριμένο περιβάλλον και συνεπώς, αξίζει να διασωθούν. Η διατήρηση της γενετικής ποικιλότητας στις αυτόχθονες φυλές προβάτων, κρίνεται αναγκαία καθώς, σε αντίθετη περίπτωση, αυτό το είδος θα κινδυνέψει να εκλείψει, αφού δεν θα είναι ικανό να ανταπεξέλθει σε περιβαλλοντικές αλλαγές και τον ανταγωνισμό μεταξύ των ειδών ή στην προσβολή από ένα παράσιτο. Για όλους αυτούς τους λόγους, στην παρούσα εργασία γίνεται μια προσπάθεια για τη λεπτομερή καταγραφή της γενετικής ποικιλότητας σε αυτόχθονες φυλές προβάτων, μέσω μελέτης μεταλλάξεων στο γονίδιο MC1R που έχει βασικό ρόλο στο χρωματισμό του τριχώματος στα πρόβατα.

Απομόνωση DNA

Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος και τριχών από 92 πρόβατα, από τις ακόλουθες αυτόχθονες φυλές: Άρτας (n=29), Κοκοβίτικη (n=2), Boutsiko (n=22), Χίου (=4), Σαρακατσάκινη (=4), Κύμης (=5), Άργους (=5), Καραγκούνικο (=5), Ζακύνθου (=4), Φλώρινας (=5), Θράκης (=3), Κατσικά (=2), Σκοπέλου (=2).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση είναι η εξής:

- Μεταφορά 0,5 ml δείγματος αίματος σε erpendorf των 2 ml
- Προσθήκη 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1X SSC σε τελικό όγκο V= 40 ml (stock 20X SSC περιλαμβάνει 3M χλωριούχου νατρίου και 300mM κιτρικού νατρίου) και ανάδευση σε vortex
- Φυγοκέντρηση για 3 min στις 13,000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη διαλυμάτων: 0,6 ml οξικό νάτριο 0,2 M, 25 μl SDS 5%, 15 μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K (10 mg/ml)
- Επώαση στους 55 °C υπό ανάδευση για περίπου 2 h
- Προσθήκη στο erpendorf 1ml φαινόλης και ανάδευση σε vortex
- Φυγοκέντρηση για 10 min στις 13,000 rpm στους 4 °C
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα erpendorf
- Προσθήκη 500 μl χλωροφορμίου και 500 μl φαινόλης και ανάδευση σε vortex
- Φυγοκέντρηση για 10 min στις 13,000 rpm στους 4 °C
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα erpendorf
- Προσθήκη 1ml ισοπροπανόλης και επώαση για 20 min στους -20 °C
- Φυγοκέντρηση για 30 min στις 13,000 rpm στους 4 °C
- Αφαίρεση του υπερκειμένου (το DNA έχει κατακρημνιστεί) και προσθήκη 1 ml αιθανόλης 70% (Χρησιμοποιούμε αιθανόλη για τον διαχωρισμό από τα εναπομείναντα κυτταρικά συστατικά. Στην αιθανόλη το DNA ξετυλίγεται και καθιζάνει αφήνοντας πίσω τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά. Σχηματισμός ινιδίων)
- Φυγοκέντρηση για 5 min στις 13,000 rpm στους 4 °C
- Απόρριψη του υπερκειμένου και επώαση για 10 min στους 55 °C ώστε να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη
- Διαλυτοποίηση του ιζήματος σε 50 μl ddH₂O και αποθήκευση του δείγματος DNA στους -20 °C.

Ηλεκτροφόρηση προϊόντων DNA

Πρόκειται για μια διαδικασία ποιοτικού προσδιορισμού και διαχωρισμού τμημάτων DNA που μας δίνει την δυνατότητα να πάρουμε πληροφορίες για το μέγεθος των γραμμικών μορίων, την ποιότητα αλλά και την ποσότητα του DNA. Στην παρούσα εργασία, η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε σε δύο φάσεις. Αρχικά μετά την απομόνωση του DNA από τα δείγματα τριχών και αίματος των ζωικών οργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν, για τον έλεγχο του πυρηνικού DNA και έπειτα, μετά την ολοκλήρωση της PCR, για τον έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης. Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος και τη στερεοδιάταξή τους (πχ. η υπερελικωμένη κυκλική μορφή, η ανοιχτή κυκλική μορφή και η γραμμική μορφή DNA του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτώματα αγαρόζης). Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται άμεσα με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, μίας ένωσης που δεσμεύεται στο DNA και φθορίζει υπό υπεριώδες φως. Όσο μεγαλύτερη είναι η τάση του πεδίου τόσο πιο γρήγορη είναι η μετακίνηση των μορίων. Η τάση όμως δε γίνεται να είναι πολύ υψηλή γιατί αναπτύσσονται μεγάλες θερμοκρασίες και προκαλείται το λιώσιμο της πηκτής. Φορτώνοντας το DNA σε μία πηκτή που περιέχει αιθίδιο και εκθέτοντάς το στο υπεριώδες γίνονται ορατές οι διακριτές μπάντες του DNA καθώς αυτό παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι καρκινογόνο και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά το χειρισμό του. Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη loading buffer ώστε να γίνεται εφικτή η παρακολούθηση της μετακίνησης των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση, και να κατακάθονται τα δείγματα στις θέσεις της πηκτής λόγω της μεγαλύτερης πυκνότητάς τους. Τα loading buffers περιέχουν ως επί το πλείστον γλυκερόλη, σουκρόζη και φυκόλη έτσι ώστε να καταβυθίζεται το DNA καθώς και χρωστικές για να είναι εύκολη η παρατήρηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης. Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι το κυανό του ξυλενίου και το μπλε της βρωμοφαινόλης. Τα κυριότερα buffers που χρησιμοποιούνται στις ηλεκτροφορήσεις αγαρόζης είναι το TAE (Tris acetate EDTA) και το TBE (Tris borate EDTA). Το TAE προσφέρει καλύτερη ανάλυση για μεγάλα τμήματα DNA. Αυτό σημαίνει χαμηλότερη τάση, περισσότερος χρόνος αλλά καλύτερο προϊόν.

Μετά το πέρας της διαδικασίας ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης πυκνότητας 1.5%, με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου έτσι ώστε να ελεγχθεί το αποτέλεσμα και να καθοριστεί η ποσότητα του DNA των δειγμάτων που θα υποβάλουμε σε PCR.

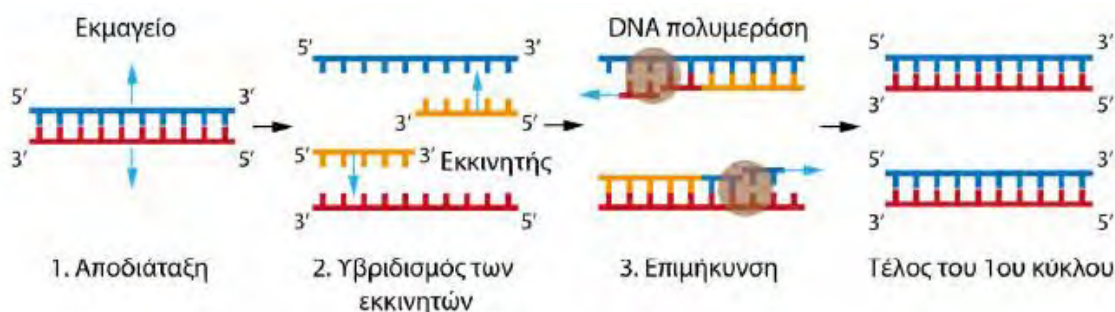
Αναλυτικότερα η πηκτή αγαρόζης κατασκευάστηκε ως εξής:

- TAE 1x: 40 ml
- Αγαρόζη: 0,6 g
- Βρωμιούχο αιθίδιο: 4 μl

Αρχικά, παρασκευάσαμε διάλυμα TAE 1x αραιώνοντας το πυκνό διάλυμα 50x (Tris Base 2M, Acetic Acid 7,7%, EDTA 0,05M, ddH₂O). Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε προσθήκη Loading buffer 6X (Bromophenol blue 0,1%w/v, TBE 1X, glycerol 8.7%, ddH₂O) όγκου 3 μl σε κάθε δείγμα (5 μl από το προϊόν PCR) ώστε να γίνεται εφικτή η παρακολούθηση της μετακίνησης των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών όπως το βακτήριο *E. coli* ή οι ζύμες. Στην εικόνα 29 φαίνονται αναλυτικά τα στάδια αυτής της μεθόδου. Η PCR είναι μία *in vitro* μέθοδος και μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς περιορισμούς στη μορφή του χρησιμοποιούμενου DNA. Μπορεί ακόμα να διαφοροποιηθεί εκτενώς για την πραγματοποίηση ποικίλων μεθόδων γενετικής επέμβασης. Με τη χρήση της συγκεκριμένα θραύσματα DNA μπορούν να κλωνοποιηθούν σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα απουσία ζωντανών κυττάρων. Με την PCR μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δεσεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Η αλληλουχία του γονιδίου είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό των συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων, το καθένα 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, με άλλα λόγια καθορίζουν τα άκρα του θραύσματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί.



Εικόνα 29. Απεικόνιση των σταδίων της PCR (Παπανικολάου Γ., Παλαιολόγου Δ., Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενετικής του Ανθρώπου, 2015)

Η αντίδραση PCR σχεδιάστηκε ώστε να ενισχυθεί περιοχή 1076 bp του γονιδίου MC1R (συμπεριλαμβανομένης ολόκληρης της κωδικής περιοχής του MCI-R που είναι 954 bp, 80 bp της 5'-UTR περιοχής και 42 bp της 3'-UTR περιοχής) με χρήση των εκκινητών E1 και E2, όπως περιγράφηκαν από τους (Vla age et al. 1999).

Οι ακολουθίες του ζεύγους ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών, φαίνονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Αλληλουχίες εκκινητών (forward-reverse) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Αλληλουχία FW (εκκινητής E1)	Αλληλουχία RV (εκκινητής E2)
5'-GCC TGG GCC GAC ATT TGT-3'	5'-CTC ACC TTC AGG GAT GGT CTA-3'

Ο forward εκκινητής υβριδίστηκε από τη θέση 117 έως τη θέση 97 και ο reverse εκκινητής από τη θέση 1024 έως τη θέση 1043 του γονιδίου MC1R.

Οι συνθήκες για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος:

Αρχική αποδιάταξη : 94 °C για 4 min
 Αποδιάταξη: 95 °C για 40 sec
 Υβριδοποίηση: 62 °C για 60 sec
 Επιμήκυνση: 72 °C για 60 sec
 Τελική επιμήκυνση: 72 °C για 10 min

} 35 κύκλοι

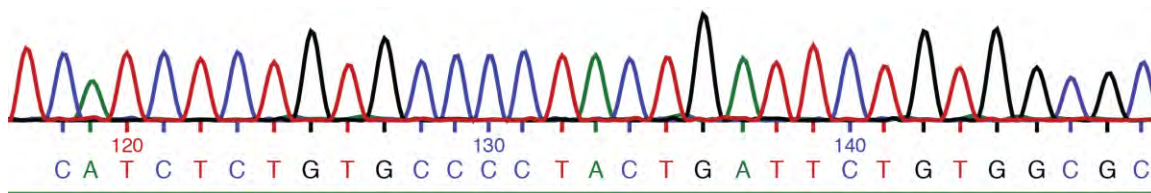
Πίνακας 5. Συστατικά της PCR που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Συστατικά της PCR για τελικό όγκο Vt = 50 μl	
Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
εκμαγείο DNA (200 ng)	1 μl
Buffer (10X)	5 μl
MgCl ₂ (50-100 mM)	2 μl
dNTPs (200 μM)	1 μl
Forward Primer (50 pmoles/μl)	1 μl
Reverse Primer (50 pmoles/μl)	1 μl
KAPA BIOSYSTEMS Taq polymerase (5 units/μl)	0,02 μl
H2O	38,8 μl

Καθαρισμός DNA και αλληλούχιση

Τα προϊόντα PCR που βρέθηκαν θετικά για το γονίδιο MC1R έπειτα από ηλεκτροφόρηση, καθαρίστηκαν με τη χρήση κατάλληλου kit (PureLink PCR Purification Kit, Invitrogen) ώστε να απομακρυνθούν εκκινητές, διαλύματα, Taq πολυμεράση κτλ, και στη συνέχεια στάλθηκαν για αλληλούχιση σε εξωτερικό εργαστήριο (Cemsa SA).

Η τεχνική της αλληλούχισης σήμερα βασίζεται σε μια παραλλαγή της μεθόδου Sanger. Η αλληλούχιση γίνεται σε μια αντίδραση, όπου κάθε ένα από τα τέσσερα ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP, ή ddTTP) σημαίνεται με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική, οπότε και εκπέμπουν σε διαφορετικό μήκος κύματος. Έτσι με τη χρήση ενός ανιχνευτή laser, καταγράφεται ο φθορισμός και τελικά λαμβάνεται η αλληλουχία, με τη μορφή χρωματογραφήματος (εικόνα 30).



Εικόνα 30. Χρωματογράφημα αλληλούχισης κατά Sanger με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδή αυτόματου αναλυτή. Κάθε βάση αναπαριστάται με μια καμπύλη που προκύπτει ως συνάρτηση της έντασης του σήματος φθορισμού και του χρόνου ηλεκτροφόρησης. Καθένα από τα τέσσερα χρώματα (κόκκινο, πράσινο, μπλε και μαύρο) αντιστοιχεί σε διαφορετική βάση του DNA (αδενίνη, γουανίνη, θυμίνη και κυτοσίνη).

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδή αυτόματου αναλυτή δίνονται σε δύο ψηφιακά αρχεία:

- Ως ένα αρχείο FASTA, όπου περιέχεται η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του μορίου που έχει αλληλουχηθεί.
- Ως χρωματογράφημα, όπου στο κάτω τμήμα δίνονται οι καμπύλες που προκύπτουν από την ένταση του σήματος φθορισμού προς τον χρόνο ηλεκτροφόρησης με διαφορετικό χρώμα για κάθε φθοροσημασμένο ddNTP και στο πάνω τμήμα δίνεται το αντίστοιχο νουκλεοτίδιο. Τα αρχεία αυτά έχουν συνήθως κατάληξη ab1.

Αποτελεί καλή εργαστηριακή πρακτική, προτού χρησιμοποιηθεί η αλληλουχία FASTA για περαιτέρω ανάλυση, να γίνεται μια σύντομη επισκόπηση του χρωματογραφήματος για την αξιολόγηση της συνολικής ποιότητας της αλληλούχισης.

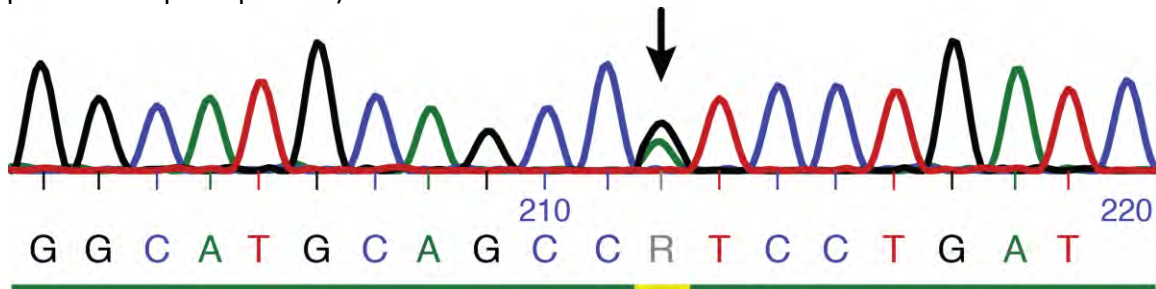
Ένα χρωματογράφημα υψηλής ποιότητας αποτελείται από:

- καμπύλες που είναι εύκολα διακριτές η μία από την άλλη,
- καμπύλες που έχουν το ίδιο πλάτος και την ίδια απόσταση μεταξύ τους,
- πολύ χαμηλό επίπεδο θορύβου.

Ένα σύνηθες πρόβλημα των αλληλουχιών που παράγονται είναι η χαμηλή ποιότητα σήματος στα πρώτα 40-50 νουκλεοτίδια και η επιδείνωση της ποιότητάς του μετά τα 600-700 νουκλεοτίδια. Συνεπώς, οι εκκινητές πρέπει να απέχουν τουλάχιστον 40 βάσεις από την περιοχή που μας ενδιαφέρει να αλληλουχήσουμε και τα προϊόντα PCR, ιδανικά, να έχουν μέγεθος μικρότερο από 500 βάσεις.

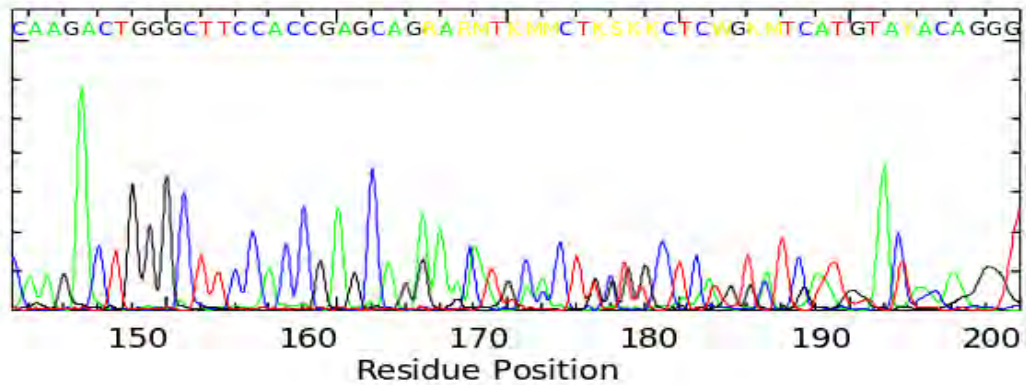
Εκτός από την ποιότητα ανάγνωσης, το χρωματογράφημα μπορεί να μας δώσει πληροφορίες και για την ύπαρξη μεταλλάξεων στο τμήμα του DNA που έχει αλληλουχηθεί:

- Αντικατάσταση βάσης. Στην εικόνα 31, με βελάκι, φαίνονται δύο κορυφές διαφορετικού χρώματος που βρίσκονται η μία κάτω από την άλλη. Πρόκειται για μια χαρακτηριστική εικόνα σημειακής παραλλαγής σε ετεροζυγωτία, όπου στην ίδια θέση του DNA υπάρχουν δύο νουκλεοτίδια. Εδώ υπάρχει ταυτόχρονη παρουσία των νουκλεοτιδίων A και T, γεγονός που φαίνεται και από το χρώμα των καμπυλών (κόκκινο για το A και μπλε για το T).



Εικόνα 31. Χρωματογράφημα στο οποίο φαίνεται η χαρακτηριστική εικόνα σημειακής μετάλλαξης σε ετεροζυγωτία. Στη θέση 212 (βέλος) διακρίνουμε δύο κορυφές διαφορετικού χρώματος, τη μία κάτω από την άλλη, που αντιστοιχούν στα νουκλεοτίδια A και T.

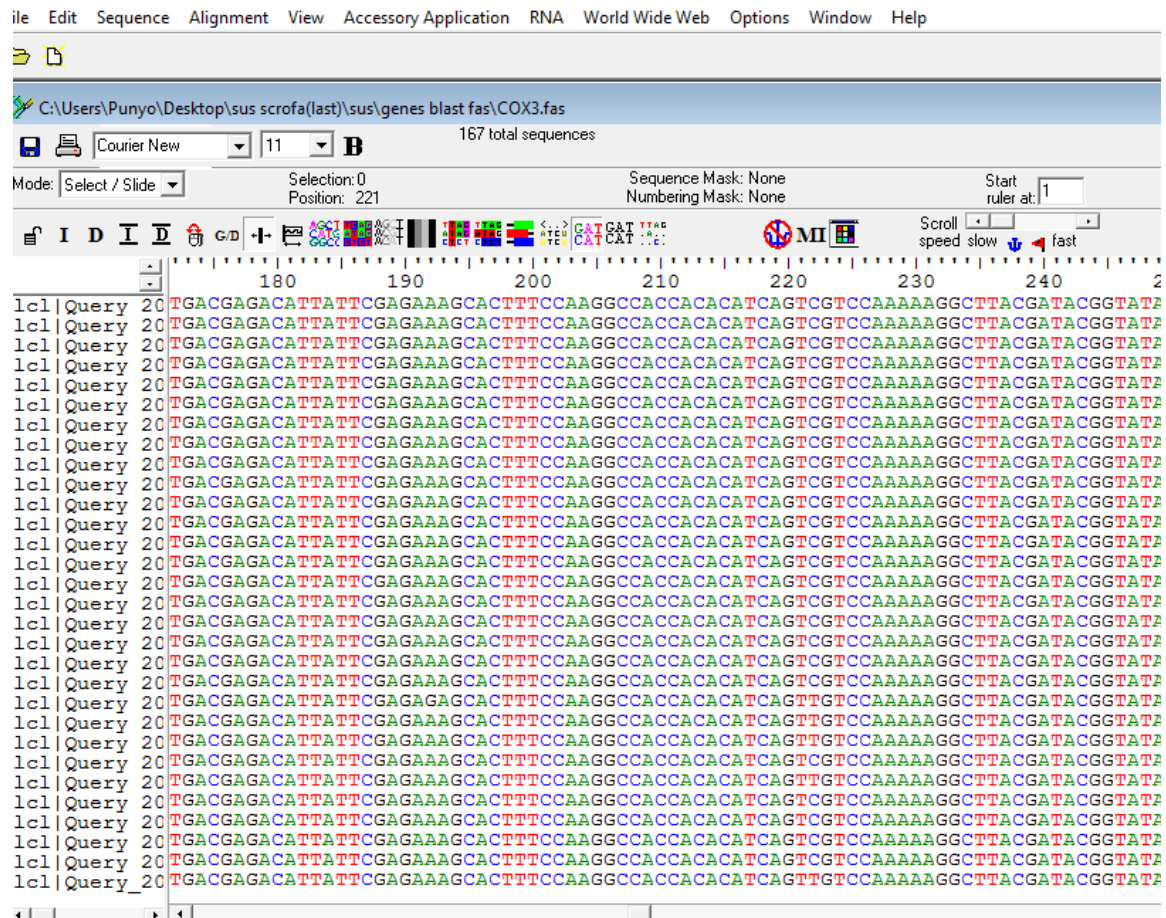
- Προσθήκη ή έλλειψη βάσης. Η αλληλούχηση προϊόντων κατά Sanger προϋποθέτει ότι το δείγμα αποτελείται από ένα και μοναδικό προϊόν. Μεταλλάξεις που οδηγούν στην απαλοιφή ή στην εισαγωγή βάσεων στην αλληλουχία οδηγούν πρακτικά στη δημιουργία δύο αλληλεπικαλυπτόμενων προϊόντων που ξεκινούν από το σημείο της απαλοιφής ή εισαγωγής. Το χρωματογράφημα έχει τη χαρακτηριστική μορφή που φαίνεται στην εικόνα 32. Παρατηρούμε ότι ενώ οι καμπύλες στο αρχικό τμήμα είναι καλές, από τη θέση 164 και μετά το χρωματογράφημα αποτελείται από διπλές κορυφές που δεν δίνουν αξιολογήσιμο σήμα. Για την αλληλούχηση τέτοιου είδους προϊόντων χρειάζεται κλωνοποίηση του προϊόντος PCR σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς και αλληλούχηση του DNA που απομονώνεται από κατάλληλο αριθμό αποικιών.



Εικόνα 32. Χρωματογράφημα στο οποίο φαίνεται η χαρακτηριστική εικόνα που προκύπτει από την εισαγωγή ή απαλοιφή μίας ή περισσότερων βάσεων του DNA. Από τη θέση της μετάλλαξης και μετά παρατηρούνται επικαλυπτόμενες καμπύλες που δεν μπορούν να αξιολογηθούν.

Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων της αλληλούχησης πραγματοποιείται με τη χρήση του προγράμματος BioEdit. Η αλληλούχηση γίνεται και για τις δυο αλυσίδες (με διαφορετικό εκκινητή για την κάθε μια) και στη συνέχεια οι δυο αλληλουχίες που προκύπτουν ομοπαρατίθενται με τη χρήση κατάλληλου προγράμματος βιοπληροφορικής (Thompson et al, 1997) (ClustalW) για την εύρεση τυχών λαθών που προκύπτουν κατά τη διαδικασία αυτή.

(Επίσημη ιστοσελίδα <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)

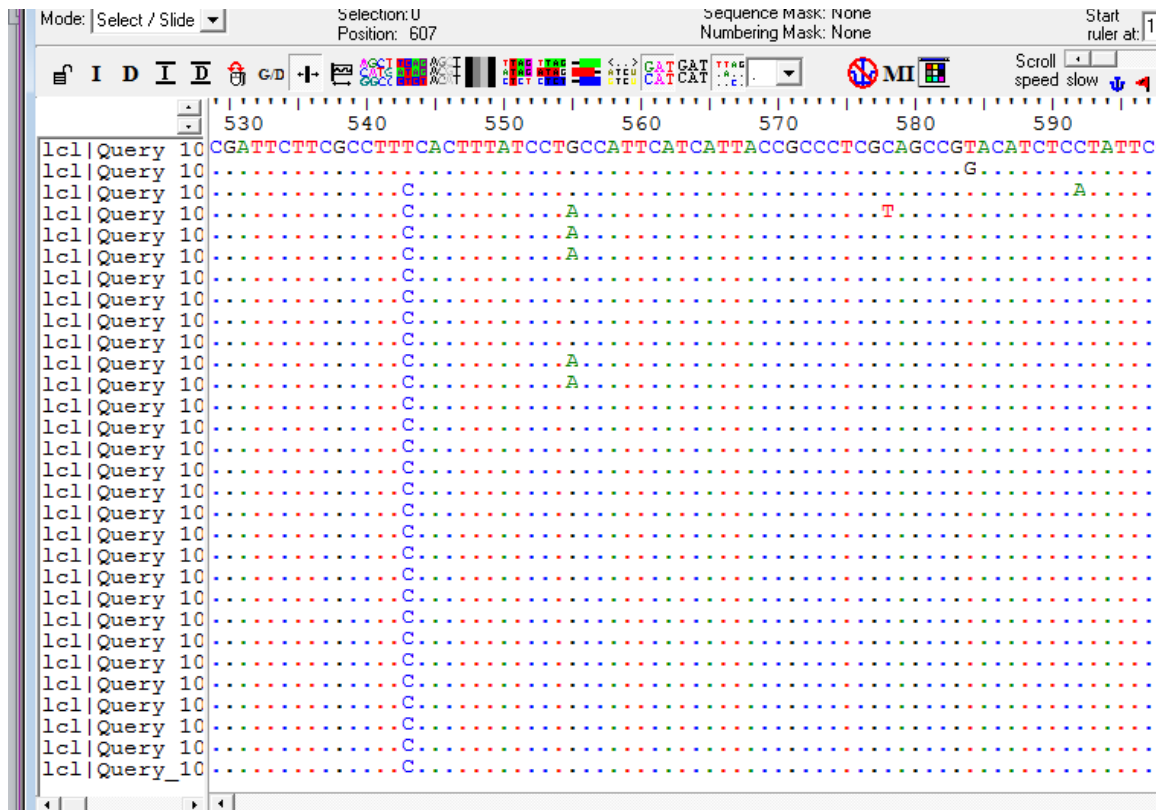


Εικόνα 33. Παράδειγμα στοίχισης αλληλουχιών του γονιδίου MC1R στο πρόγραμμα BioEdit

Το *BioEdit* είναι ένα χρήσιμο επιστημονικό εργαλείο το οποίο βοηθάει στον αυτοματοποιημένο, εύκολο χειρισμό των αλληλουχιών που μας ενδιαφέρουν.

Μερικές από τις λειτουργίες που δύναται να πραγματοποιήσει είναι οι εξής:

- **Στοίχιση των αλληλουχιών** (πρωτεϊνικών ή νουκλεοτιδικών) οι οποίες φορτώνονται στο πρόγραμμα (εικόνα 33)
- **Εμφάνιση πολυμορφικών θέσεων** και εύκολη αναγνώριση διαφορετικών αλληλομόρφων λόγω των διαφορετικών χρωμάτων που αποδίδονται σε κάθε μονάδα της αλληλουχίας (αμινοξύ ή βάση) (εικόνα 34)
- **Αναζήτηση ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου (ORF)** σε κωδικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, με την χρήση διαφόρων παραμέτρων που επιλέγονται από τον ερευνητή.



Εικόνα 34. Εμφάνιση πολυμορφικών θέσεων σε νουκλεοτιδική αλληλουχία

Λογισμικό ClustalW

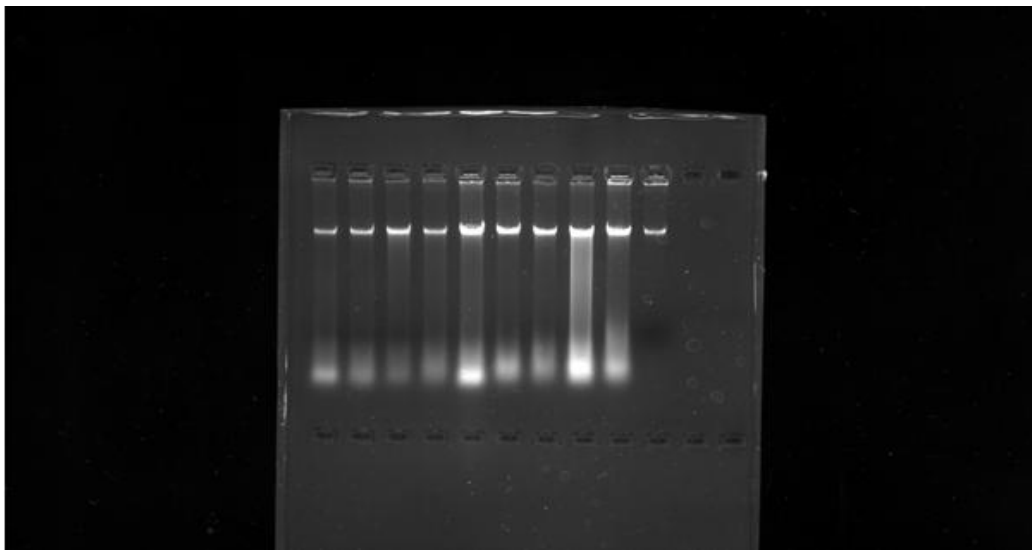
Το ClustalW διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο (<http://www.clustal.org/clustal2/>) και υποστηρίζεται από το Πανεπιστημιακό Κολλέγιο του Δουβλίνου. Πρόκειται για την έκδοση σε γραφικό περιβάλλον του λογισμικού Clustal. Χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη στοίχιση πολλαπλών αλληλουχιών και τη σύγκρισή τους. Με τη βοήθεια του ClustalW μπορούμε να αξιολογήσουμε γρήγορα τα ευρήματα που προκύπτουν από την αλληλούχηση κατά Sanger, εντοπίζοντας τυχόν διαφορές των αλληλουχιών μας με την αλληλουχία αναφοράς.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Απομόνωση DNA από δείγματα τριχών και αίματος προβάτων

Η απομόνωση έγινε χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο απομόνωσης που περιγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 92 δείγματα τριχών και αίματος προβάτων από τις φυλές που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η επιτυχία της διαδικασίας ελέγχθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης πυκνότητας 1,5% (w/v). Η επιλογή της συγκεκριμένης πυκνότητας για το πήκτωμα, οφείλεται στο γεγονός πως δείγματα DNA από απομόνωση περιέχουν μεγάλο μοριακού βάρους μόρια DNA.

Η απεικόνιση των δειγμάτων μέσω της ηλεκτροφόρησης τους, μας επέτρεψε να προσδιορίσουμε τόσο την ποσότητα όσο και την ποιότητα του DNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα, δίνοντας μας την δυνατότητα να αξιολογήσουμε ποια από τα αρχικά δείγματα μπορούσαν να υποβληθούν σε περαιτέρω χειρισμούς. Οι φωτεινές μπάντες που διακρίνονται παρακάτω (εικόνα 35) αντιστοιχούν στο DNA που απομονώθηκε.

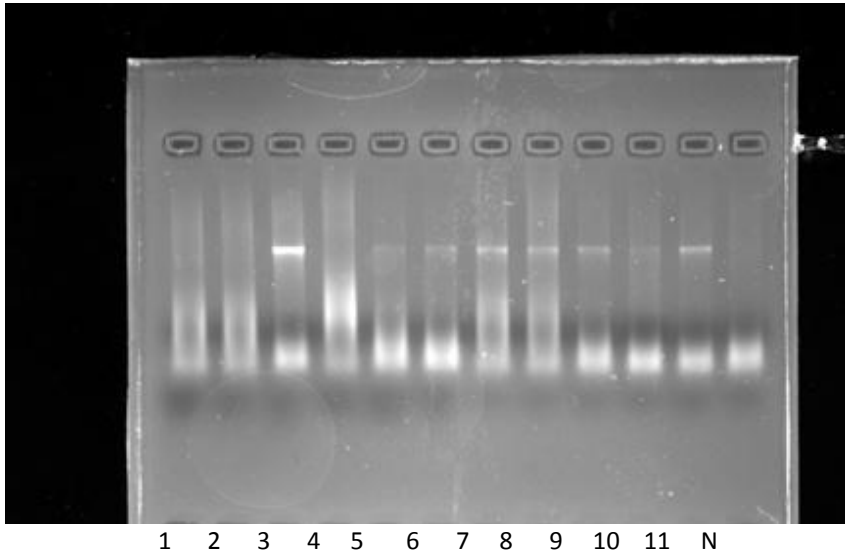


Εικόνα 35. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης. Στην 1^η σειρά φορτώθηκαν 10 δείγματα *ovis aries* από γονιδιωματικό DNA που απομονώθηκε από τρίχες προβάτων.

Η ένταση της φωτεινότητας και το πάχος κάθε ζώνης αποτελούν ένδειξη της ποσότητας του DNA που απομονώθηκε. Η ποσότητα που βρέθηκε είναι ικανοποιητική για όλα τα δείγματα, οπότε προχωρήσαμε στη μέθοδο της PCR.

Ενίσχυση τμήματος DNA με την τεχνική PCR

Χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές (πίνακας 4) ενισχύθηκε το γονίδιο MC1R που επιθυμούσαμε. Η επιτυχία της μεθόδου επαληθεύτηκε με ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε gel αγαρόζης 2% (Εικόνα 36). Για να υπολογιστεί το μήκος του τμήματος που ενισχύθηκε ηλεκτροφορούμε ταυτόχρονα και έναν ladder ή αλλιώς μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους (L).



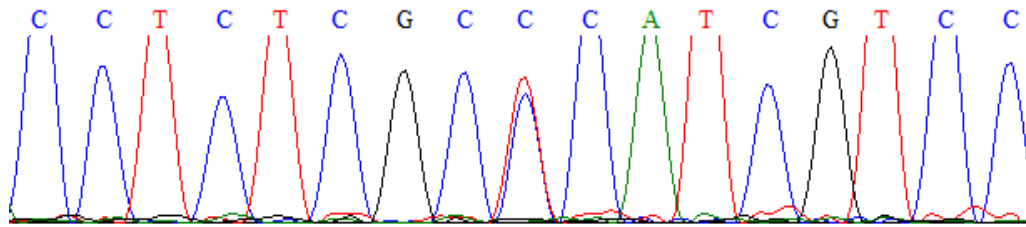
Εικόνα 36. προϊόντα PCR που προήλθαν από ιστό 11 προβάτων Άρτας, σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%, με χρώση βρωμιούχου αιτιδίου. Το 3^ο, 5^ο, 6^ο, 7^ο, 8^ο, 9^ο, 10^ο, 11^ο όπως φαίνεται, βρέθηκαν θετικά για το γονίδιο MC1R, ενώ στο 12^ο πηγαδάκι φορτώθηκε ο μάρτυρας (N).

Αλληλούχιση

Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε και με τους δύο εκκινητές που είχαν σχεδιαστεί για την ενίσχυση του PCR προϊόντος, για την μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Επομένως προέκυψαν δύο αλληλουχίες βάσεων για κάθε ένα δείγμα: μία που αντιστοιχεί στον εκκινητή της μεταγραφόμενης αλυσίδας και μία που αντιστοιχεί στον εκκινητή της συμπληρωματικής αλυσίδας. Το μέγεθος του τμήματος που προέκυψε για όλα τα δείγματα, μετά την αλληλούχιση, ήταν περίπου 1000 bp. Τα αρχεία των ακολουθιών αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit[®], όπου ελέγχθηκαν τα χρωματογραφήματα που αντιστοιχούσαν σε κάθε δείγμα και στη συνέχεια οι αλληλουχίες στοιχήθηκαν με τον αλγόριθμο ClustalX, για να βρεθούν οι περιοχές ομοлогίας.

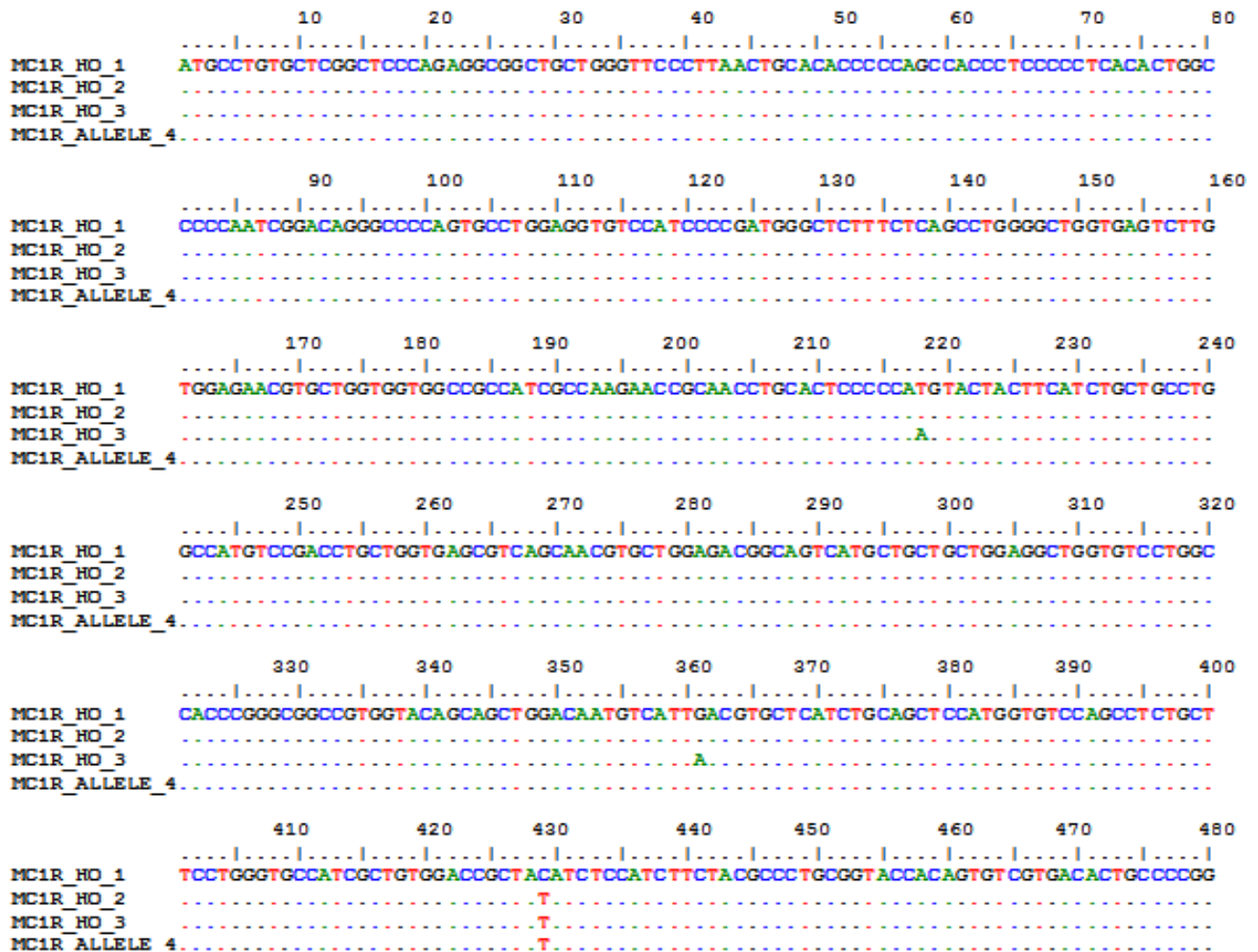
Προέκυψαν συνολικά τέσσερις διαφορετικές αλληλουχίες (αλληλουχίες 1-4, εικόνα 38). Οι συγκεκριμένες αλληλουχίες συγκρίθηκαν με τις καταχωρημένες αλληλουχίες της βάσης δεδομένων NCBI, χρησιμοποιώντας το λογισμικό ClustalX.

Από την ανάλυση των χρωματογραφημάτων του κάθε δείγματος, εντοπίστηκαν θέσεις διαφοροποίησης των αλληλουχιών, όπως φαίνεται στο παρακάτω ενδεικτικό χρωματογράφημα (εικόνα 37) για τα αλληλόμορφα 1 και 4.



Εικόνα 37. Χρωματογράφημα των αλληλουχιών 1 και 4.

Από την ανάλυση προέκυψαν τέσσερα διαφορετικά αλληλόμορφα του γονιδίου MC1R, τα 1, 2, 3, 4, τα οποία παρουσιάζονται στην εικόνα 38.



```

          490      500      510      520      530      540      550      560
MC1R_HO_1  GCGTGGAGGATCATTGCAGCCATCTGGGTGGCCAGCATCCTCACCCAGCGTGCTCTCCATCACCTACTACAACCACAGGT
MC1R_HO_2  .....
MC1R_HO_3  .....
MC1R_ALLELE_4 .....

          570      580      590      600      610      620      630      640
MC1R_HO_1  CGTCCTGCTGTGCCGTGGTTGGCTTCTTCATAGCCATGCTTGCCCTGATGGCCGTCTCTATGTCCACATGCTGCCCGGG
MC1R_HO_2  .....G.....
MC1R_HO_3  .....G.....
MC1R_ALLELE_4 .....G.....

          650      660      670      680      690      700      710      720
MC1R_HO_1  CCTGCCAGCATGCCCGGGGCA TCGCCCGGCTCAGAAAGAGGCAGGCCCCATTTCATCAGGGCTTTGGCCTCAAGGGCGCT
MC1R_HO_2  .....
MC1R_HO_3  .....
MC1R_ALLELE_4 .....

          730      740      750      760      770      780      790      800
MC1R_HO_1  GCCACCTCACCATCCTGCTGGGGTCTTCTTCTCTGCTGGGGCCCCCTTCTCCTGCACCTCTCGCTCATCGTCCTCTG
MC1R_HO_2  .....T.....
MC1R_HO_3  .....T.....
MC1R_ALLELE_4 .....T.....C.....

          810      820      830      840      850      860      870      880
MC1R_HO_1  CCCCCAGCACCCACCTGTGGCTGCATCTTCAAGAAGCTTCAACCTCTTCTGGCCCTCATCATTGCAAGGCCATTGTGG
MC1R_HO_2  .....
MC1R_HO_3  .....
MC1R_ALLELE_4 .....

          890      900      910      920      930      940      950
MC1R_HO_1  ACCCCCTCATTTATGCCTTCCGCAGCCAGGAGCTCCGAAGACACTCCAAGAGGTGCTGCAGTGCTCCTGGTGA
MC1R_HO_2  .....
MC1R_HO_3  .....
MC1R_ALLELE_4 .....

```

Εικόνα 38. Αλληλουχίες των τεσσάρων αλληλομόρφων. Παρατίθεται ολόκληρη η αλληλουχία του αλληλομόρφου 1 και οι νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις που εντοπίζονται στα υπόλοιπα αλληλόμορφα σε σχέση με αυτό.

Τρεις μεταλλάξεις έχουν αναφερθεί προηγουμένως (Våge et al., 1999; Fontanesi et al., 2010): μία συνώνυμη μετάλλαξη (c.735 C > T, p.245 Ile > Ile) (αλληλόμορφο 2) και δύο μη-συνώνυμες μεταλλάξεις που έχουν συσχετιστεί με το μαύρο χρώμα τριχώματος (c.218 T > A, p. 73 Met > Lys. c.361 G > A, p.121 Asp > Asn) (αλληλόμορφο 3). Μια μη-συνώνυμη μετάλλαξη που ανακαλύφθηκε μόλις πρόσφατα στις ίδιες φυλές από τους (Stamatis et al. 2017), η (c.789 T > C, p.263 Leu > Pro) (αλληλόμορφο 4) ταυτοποιήθηκε στο CDS του γονιδίου MC1R.

Συγκρίνοντας τα 1-4 αλληλόμορφα που εντοπίστηκαν στην παρούσα μελέτη με πρότυπες αλληλουχίες των αλληλομόρφων wild type E⁺, E^D και e από την βάση δεδομένων NCBI, με το πρόγραμμα ClustalW, ταυτοποιήθηκαν η αλληλουχία 1 και αλληλουχία 2 σαν το υπολειπόμενο 'wild type E⁺' (υπεύθυνο για το λευκό χρώμα με καφε/μαύρες κηλίδες στα άκρα) και η αλληλουχία 3 ως το επικρατές αλληλόμορφο 'E^D' (υπεύθυνο για το επικρατές μαύρο χρώμα). Το υποτελές αλληλόμορφο e (υπεύθυνο για το κόκκινο χρώμα τριχώματος) που αναφέρεται συχνά σε άλλες μελέτες στη βιβλιογραφία, δεν βρέθηκε στην παρούσα μελέτη, όπως και το αλληλόμορφο 4 δεν μπόρεσε να ταυτοποιηθεί με κάποιο από τα γνωστά αλληλόμορφα του γενετικού τόπου extension, πέραν του νεοεμφανιζόμενου 'αλληλομόρφου 4' (GenBank αριθμός πρόσβασης: KY654345) που βρέθηκε και στη μελέτη των (Stamatis et al. 2017).

Πίνακας 6. Αριθμός δειγμάτων από τις διάφορες φυλές της μελέτης και η συχνότητα των αλληλομόρφων (1-4) για κάθε φυλή.

		Συχνότητα αλληλομόρφων (%)			
Φυλή	Αριθμός δειγμάτων	1	2	3	4
Φριζάρτα	27	59,26	18,52	22,22	-
Butsiko	22	70,45	29,55	-	-
Άργους	5	40	-	60	-
Κύμης	5	90	10	-	-
Ζακύνθου	4	12,5	87,5	-	-
Χίου	4	87,5	12,5	-	-
Φλώρινας	5	50	40	-	10
Σαρακατσάνικη	3	66,67	33,33	-	-
Θράκης	3	76,92	19,23	-	3,85
Καραγκούνικο	2	100	-	-	-
Κατσικά	2	25	75	-	-
Σκοπέλου	1	-	100	-	-
Σύνολο	83				

Αξίζει να σημειωθεί ότι 40 από τα 83 υπό μελέτη άτομα, ήταν ετερόζυγα για το γονίδιο *MC1R*, με ποιο συχνό συνδιασμό αλληλομόρφων, αυτό των αλληλομόρφων 1 και 2, που εμφανίστηκε σχεδόν σε όλες τις φυλές που μελετήθηκαν. Ο αριθμός των ατόμων για κάθε φυλή, που εμφάνιζαν ετεροζυγωτία, καθώς και οι συνδιασμοί αλληλομόρφων που παρατηρήθηκαν στα άτομα της κάθε φυλής, φαίνονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7. Αριθμός ετερόζυγων ατόμων από κάθε φυλή που μελετήθηκε και τα αλληλόμορφα που φέρουν

Συνδιασμοί αλληλομόρφων	1+2	1+3	1+4	2+3
Αριθμός ατόμων από κάθε φυλή				
Φριζάρτα	5	7	-	5
Butsiko	11	-	-	-
Άργους	-	2	-	-
Κύμης	1	-	-	-
Ζακύνθου	1	-	-	-
Χίου	1	-	-	-
Φλώρινας	2	-	1	-
Σαρακατσάνικη	2	-	-	-
Θράκης	1	-	-	-
Καραγκούνικο	-	-	-	-
Κατσικά	1	-	-	-
Σκοπέλου	-	-	-	-

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σημερινή εξέλιξη και κατανομή των διαφόρων ειδών και φυλών προβάτων στην Ελλάδα, είναι το αποτέλεσμα εξελίξεων και αλλαγών που σημειώθηκαν τα τελευταία τριάντα χρόνια. Η ανεξέλεγκτη διασταύρωση μεταξύ των διαφόρων φυλών και η απροσδόκητη έκταση της τεχνητής γονιμοποίησης έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην εξαφάνιση ορισμένων μικρότερων φυλών και στη μείωση του αριθμού των ορεινών πληθυσμών καθαρόαιμων φυλών και αυτό οδήγησε στη δημιουργία ενός προβάτου που προέρχεται από διασταυρώσεις και που σήμερα αντιπροσωπεύει την πλειοψηφία των Ελληνικών πληθυσμών προβάτων (Georgoudis, Hatziminaoglou, and Pappas 1995).

Για περίπου 10.000 χρόνια, οι κτηνοτρόφοι ασκούσαν βιώσιμη διαχείριση των εξημερωμένων ζώων, που οδήγησε σε φυλές με υψηλά επίπεδα προσαρμογής στις τοπικές συνθήκες. Με την εντατικοποίηση της κτηνοτροφίας, όμως, η εικόνα άρχισε να αλλάζει: τα ζώα επιλέγονται, σχεδόν αποκλειστικά, στη βάση χαρακτηριστικών που συνδέονται με την παραγωγικότητα των κοπαδιών. Το αποτέλεσμα αυτών των μεθόδων είναι ο κατακερματισμός των φυλών και η έντονη μείωση της γενετικής τους ποικιλότητας. Εξαιτίας του τρόπου διαχείρισής τους, πολλές φυλές παρουσιάζουν σήμερα φαινόμενα ομομικτικού υποβιβασμού με ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Από την άλλη, οι οικονομικές πιέσεις και η ελλιπής ενημέρωση οδηγούν τους κτηνοτρόφους στην εγκατάλειψη ή στην επιμειξία των παραδοσιακών φυλών με άλλες πιο παραγωγικές. Τα αποτελέσματα αυτών των πρακτικών απειλούν τις τοπικές φυλές με εκφυλισμό και έκλειψη χωρίς να εξασφαλίζουν μακροπρόθεσμα καλύτερα αποτελέσματα στους κτηνοτρόφους.

Η διατήρηση της γενετικής ποικιλότητας στις αυτόχθονες φυλές προβάτων, κρίνεται αναγκαία καθώς, σε αντίθετη περίπτωση, αυτό το είδος θα κινδυνέψει να εκλείψει, αφού δεν θα είναι ικανό να ανταπεξέλθει σε περιβαλλοντικές αλλαγές και τον ανταγωνισμό μεταξύ των ειδών ή στην προσβολή από ένα παράσιτο.

Στην παρούσα μελέτη, έγινε μια προσπάθεια να εκτιμηθεί ο γενετικός πολυμορφισμός του γονιδίου MC1R σε ελληνικούς πληθυσμούς προβάτων, ώστε να διερευνηθεί και να καταγραφεί η έκταση της γενετικής ποικιλότητας των αυτοχθόνων φυλών.

Το αλληλόμορφο 1 (wild type E⁺), ήταν μακράν το πιο συχνά εντοπιζόμενο και βρισκόταν και σε ομοζυγωτία και σε ετεροζυγωτία σχεδόν σε όλες τις αυτόχθονες φυλές που μελετήθηκαν. Ακολούθησε το αλληλόμορφο 2 (wild type E⁺), που ήταν παρόν σε όλες τις φυλές, κυρίως σε ετεροζυγωτία, εκτός από τον μαύρο πληθυσμό της φυλής Φριζάρτα και τα άτομα από την φυλή Άργους που ήταν όλα μαύρα. Το αλληλόμορφο 3 ήταν παρόν με μικρότερη συχνότητα σε όλα τα άτομα με μαύρο χρώμα στις φυλές Φριζάρτα και Άργους, επιβεβαιώνοντας ότι πρόκειται για το επικρατές αλληλόμορφο E^D. Τέλος, το αλληλόμορφο 4 βρέθηκε μόνο στις φυλές της Φλώρινας και Θράκης.

Τα αλληλόμορφα 1 και 2, που έχουν μεταξύ τους συνώνυμες μεταλλάξεις, αντιστοιχούν στους απλότυπους 1 και 3 των (Fontanesi et al. 2010) και πιθανότατα αποτελούν αλληλόμορφα αγρίου τύπου και δεν επηρεάζουν τόσο το χρωματισμό στο τρίχωμα των προβάτων (συνήθως προκύπτει λευκός φαινότυπος με καφε ή μαύρες κηλίδες σε πρόσωπο και άκρα), όσο τα αλληλόμορφα του γενετικού τόπου Agouti με τα οποία θα συνκληρονομηθούν.

Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με εκείνα των (Stamatis et al. 2017) που αφορούσαν μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων για τις ίδιες αυτόχθονες φυλές.

Η ανάλυση του γονιδίου *MC1R*, με τη διαδικασία της αλληλούχισης καθώς και η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, δεν αποκάλυψε ένα ικανοποιητικό επίπεδο ποικιλότητας ανάμεσα στις φυλές (πιθανότατα λόγω επιμεικτικών σχέσεων μεταξύ των τοπικών φυλών), ενώ υπήρχαν μικρά επίπεδα ποικιλότητας μεταξύ των ατόμων μιας φυλής, τα οποία και είχαν διαφορετικό φαινότυπο στο χρωματισμό του τριχώματός τους.

Σε προηγούμενες μελέτες, έχει γίνει ήδη γνωστό πως διαφορετικές μεταλλάξεις μπορεί να ευθύνονται για το μαύρο χρώμα τριχώματος στις διάφορες φυλές (Fontanesi et al. 2010; Vla age et al. 2003; Royo et al. 2008; Vla age et al. 1999; Fontanesi et al. 2011). Αυτό αντανakλά το γεγονός πως οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με ένα φαινοτυπικό γνώρισμα σε μια φυλή, δεν είναι απαραίτητα οι υπεύθυνες μεταλλάξεις που προκαλούν τον ίδιο φαινότυπο σε άλλες φυλές και μάλιστα, οι υπεύθυνες μεταλλάξεις θα μπορούσαν να εντοπίζονται ακόμα και σε διαφορετικό γενετικό τόπο. Άλλωστε, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, τα γονίδια που ρυθμίζουν το χρώμα τριχώματος είναι εκατοντάδες και μελέτες δείχνουν πως ακόμα και το περιβάλλον θα μπορούσε να είναι υπεύθυνο για αλλαγές στο χρωματισμό του τριχώματος.

Κρίνεται αναγκαία η πραγματοποίηση και άλλων γονοτυπικών ελέγχων σε μεγαλύτερο αριθμό ατόμων που ανήκουν στις αυτόχθονες φυλές προβάτων για τον προσδιορισμό των επικρατέστερων γονοτύπων σε κάθε μία από αυτές, αλλά και τον υπολογισμό των σχετικών συχνοτήτων τους, με χρήση και άλλων γενετικών τόπων που σχετίζονται με το χρωματισμό στο τρίχωμα των προβάτων. Έτσι, μελλοντικά οι πληροφορίες αυτές θα μας βοηθήσουν να καθορίσουμε ποιοι είναι οι κατάλληλοι χειρισμοί για την εκτροφή και επιλεκτική διασταύρωση προβάτων στις φυλές του ελλαδικού χώρου, αλλά και θα μας δώσουν στοιχεία για τις σχέσεις μεταξύ των παρατηρούμενων φαινοτύπων στο χρωματισμό του τριχώματος των προβάτων και τις μεταλλάξεις στον υποδοχέα 1 της μελανοκορτίνης, θα καταδείξουν την ιστορία των αυτόχθονων φυλών και τις μεταξύ τους σχέσεις, αλλά και θα συμβάλουν στην προσπάθεια διατήρησης της γενετικής ποικιλότητας στις ελληνικές φυλές προβάτων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Andersson, L.

2012 How Selective Sweeps in Domestic Animals Provide New Insight into Biological Mechanisms: Review: Selective Sweeps in Domestic Animals. *Journal of Internal Medicine* 271(1): 1–14. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2796.2011.02450.x>, accessed April 23, 2018.

Boitard, Simon, Mekki Boussaha, Aurélien Capitan, Dominique Rocha, and Bertrand Servin

2016 Uncovering Adaptation from Sequence Data: Lessons from Genome Resequencing of Four Cattle Breeds. *Genetics* 203(1): 433–450. <http://www.genetics.org/lookup/doi/10.1534/genetics.115.181594>, accessed April 23, 2018.

Declining Breeds of Mediterranean Sheep

N.d. <http://www.fao.org/docrep/004/X6508E/X6508E04.htm>, accessed October 9, 2017.

Deng, W. D., W. Shu, S. L. Yang, X. W. Shi, and H. M. Mao

2009 Pigmentation in Black-Boned Sheep (*Ovis Aries*): Association with Polymorphism of the MC1R Gene. *Molecular Biology Reports* 36(3): 431–436. <http://link.springer.com/10.1007/s11033-007-9197-9>, accessed October 8, 2017.

Deng, W. D., S. L. Yang, Y. Q. Huo, et al.

2006 Physiological and Genetic Characteristics of Black-Boned Sheep (*Ovis Aries*). *Animal Genetics* 37(6): 586–588. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2052.2006.01530.x>, accessed October 8, 2017.

Fariello, Maria-Ines, Bertrand Servin, Gwenola Tosser-Klopp, et al.

2014 Selection Signatures in Worldwide Sheep Populations. David Caramelli, ed. *PLoS ONE* 9(8): e103813. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0103813>, accessed April 23, 2018.

Fontanesi, L., F. Beretti, V. Riggio, et al.

2010 Sequence Characterization of the Melanocortin 1 Receptor (MC1R) Gene in Sheep with Different Coat Colours and Identification of the Putative e Allele at the Ovine Extension Locus. *Small Ruminant Research* 91(2–3): 200–207. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448810000908>, accessed October 8, 2017.

Fontanesi, Luca, Francesca Beretti, Stefania Dall'Olio, et al.

2011 A Melanocortin 1 Receptor (MC1R) Gene Polymorphism Is Useful for Authentication of Massese Sheep Dairy Products. *Journal of Dairy Research* 78(01): 122–128. http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0022029910000890, accessed August 18, 2018.

Georgoudis, A., J. Hatziminaoglou, and V. Pappas
1995 The Breeding Scheme of the Karagouniko Sheep in Greece. *Strategies for Sheep and Goat Breeding. Cahiers Options Mediterraneennes* 11.

Groeneveld, L. F., J. A. Lenstra, H. Eding, et al.
2010 Genetic Diversity in Farm Animals - a Review. *Animal Genetics* 41: 6–31. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2052.2010.02038.x>, accessed April 23, 2018.

Hatziminaoglu, J., N. P. Zervas, and J. Boyazoglu
N.d. *Options Méditerranéennes En Ligne - Collection Numérique - Prolific Dairy Sheep Breeds in Greece*. <http://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=Ci910164>, accessed October 9, 2017.

Hepp, D., G.L. Gonçalves, G.R.P. Moreira, et al.
2012 Identification of the e Allele at the Extension Locus (MC1R) in Brazilian Creole Sheep and Its Role in Wool Color Variation. *Genetics and Molecular Research* 11(3): 2997–3006. <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2012/vol11-3/pdf/gmr1752.pdf>, accessed August 18, 2018.

Kominakis, A., and E. Rogdakis
N.d. *Rare Indigenous Sheep Breeds of Greece*. http://www.agrobiodiversity.net/greece/pdf/Rare_indigenous_sheepbreeds.pdf, accessed October 9, 2017.

Kugler, Waltraud
N.d. *Synonyms, Occurrence, Description of Rare Breeds and Varieties in Greece*: 129.

Larson, Greger, and Joachim Burger
2013 A Population Genetics View of Animal Domestication. *Trends in Genetics* 29(4): 197–205. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168952513000152>, accessed April 23, 2018.

Li, M. H., T. Tiirikka, and J. Kantanen
2014 A Genome-Wide Scan Study Identifies a Single Nucleotide Substitution in ASIP Associated with White versus Non-White Coat-Colour Variation in Sheep (*Ovis Aries*). *Heredity* 112(2): 122. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3907097/>, accessed October 8, 2017.

Loukovitis, D., A. Siasiou, I. Mitsopoulos, et al.

2016 Genetic Diversity of Greek Sheep Breeds and Transhumant Populations Utilizing Microsatellite Markers. *Small Ruminant Research* 136(Supplement C): 238–242. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448816300335>, accessed October 11, 2017.

Royo, L. J., I. Álvarez, J. J. Arranz, et al.

2008 Differences in the Expression of the ASIP Gene Are Involved in the Recessive Black Coat Colour Pattern in Sheep: Evidence from the Rare Xalda Sheep Breed: Differences in Expression of the Sheep ASIP Gene. *Animal Genetics* 39(3): 290–293. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2052.2008.01712.x>, accessed October 8, 2017.

Stamatis, C., Th Giannoulis, E. Galliopoulou, Ch Billinis, and Z. Mamuris

2017 Genetic Analysis of Melanocortin 1 Receptor Gene in Endangered Greek Sheep Breeds. *Small Ruminant Research* 0(0). [http://www.smallruminantresearch.com/article/S0921-4488\(17\)30263-8/fulltext](http://www.smallruminantresearch.com/article/S0921-4488(17)30263-8/fulltext), accessed October 9, 2017.

Taberlet, P., A. Valentini, H. R. Rezaei, et al.

2008 Are Cattle, Sheep, and Goats Endangered Species? *Molecular Ecology* 17(1): 275–284. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-294X.2007.03475.x>, accessed April 23, 2018.

V\age, Dag Inge, Malcolm R. Fleet, Ricardo Ponz, et al.

2003 Mapping and Characterization of the Dominant Black Colour Locus in Sheep. *Pigment Cell & Melanoma Research* 16(6): 693–697. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1600-0749.2003.00090.x/full>, accessed October 8, 2017.

V\age, Dag Inge, Helge Klungland, Dongsu Lu, and Roger D. Cone

1999 Molecular and Pharmacological Characterization of Dominant Black Coat Color in Sheep. *Mammalian Genome* 10(1): 39–43. <http://www.springerlink.com/index/h800bru487qmhtck.pdf>, accessed October 8, 2017.

Welcome to the Agrobiodiversity Network

N.d. <http://www.agrobiodiversity.net/greece/>, accessed May 6, 2018.

Zeder, M. A.

2008 Domestication and Early Agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, Diffusion, and Impact. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(33): 11597–11604. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0801317105>, accessed April 23, 2018.