



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Γενετική ταυτοποίηση της Βραχυκερατικής φυλής
αγελάδων (*Bos taurus*) με τη χρήση μοριακών δεικτών.**



Βασιλείου-Νικάκη Μαρία του Παύλου

Λάρισα 2024

«Γενετική ταυτοποίηση της Βραχυκερατικής φυλής αγελάδων (*Bos taurus*) με τη χρήση μοριακών δεικτών»

«Genetic identification of the Shorthorn breed of cattle (*Bos taurus*) using molecular markers»

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Μαμούρης Ζήσης: Καθηγητής Γενετικής Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (Επιβλέπων)

Θεμιστοκλής Γιαννούλης: Επίκουρος Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών: Γονιδιωματική, Εξέλιξη, Βιοποικιλότητα, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής (Συνεπιβλέπων)

Μούτου Αικατερίνη: Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας (BIOZ) του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων μου κ. Μαμούρη Ζήση, Καθηγητή Γενετικής πληθυσμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ανάθεση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας και την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα αντικείμενο των ερευνητικών μου ενδιαφερόντων. Ταυτόχρονα, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τον κ. Γιαννούλη Θεμιστοκλή, Επίκουρο Καθηγητή Γονιδιωματικής, Εξέλιξης και Βιοποικιλότητας του τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής του πανεπιστημίου Θεσσαλίας, και την κ. Μούτου Αικατερίνη, Καθηγήτρια Βιολογίας σπονδυλωτών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές τους καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γιαννούλη για την άψογη συνεργασία, την υποστήριξη, τη βοήθεια, αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Ακόμη, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στα μέλη του εργαστηρίου BIOZ, για τη βοήθειά τους κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων μου, αλλά και για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που δημιουργήσαν κατά την περίοδο παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου που ήταν δίπλα μου σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Στη σύγχρονη εποχή η υπερθέρμανση του πλανήτη, ως αποτέλεσμα της κλιματικής αλλαγής, επιφέρει δυσμενείς επιπτώσεις στην κτηνοτροφία, με την εκτροφή βοοειδών να υφίσταται υποβάθμιση αναφορικά με την παραγωγικότητα και τη φυσιολογία των ζώων εξαιτίας της θερμικής καταπόνησης που τους ασκείται. Μία προσέγγιση αντιμετώπισης της συγκεκριμένης πρόκλησης, καθίσταται η διατήρηση των προστατευόμενων αυτόχthonων φυλών αγελάδων, και ειδικότερα της Ελληνικής Βραχυκερατικής φυλής, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή ικανότητα αρμοστικότητας στις εκάστοτε κλιματεδαφικές συνθήκες. Στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία, επιλέχθηκε η μελέτη μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) μιτοχondριακού DNA, δειγμάτων αίματος Βραχυκερατικών αγελάδων συγκριτικά με δείγματα αγελάδων της φυλής Holstein, προκειμένου να εντοπιστούν οι γενετικές διαφορές μεταξύ τους και να αναπτυχθούν δείκτες γενετικής ταυτοίησης της Βραχυκερατικής φυλής. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε είναι η HRM (High Resolution Melting Analysis), μέσα από την οποία εντοπίσαμε τους πρότυπους γονοτύπους των 2 φυλών για τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν και επιλέχθηκαν. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των πρότυπων δειγμάτων, απέδειξαν ότι τελικά οι δείκτες που μελετήσαμε δεν είναι οι κατάλληλοι για την επίτευξη του στόχου μας, και για το λόγο αυτό απαιτείται περισσότερη έρευνα στο μέλλον σε επίπεδο γονιδιώματος, για την ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων ταυτοποίησης και διατήρησης της φυλής.

Abstract

In modern times, global warming, as a result of climate change, has adverse effects on animal husbandry, with cattle breeding suffering a degradation in terms of productivity and animal physiology due to the thermal stress exerted on them. One approach to dealing with this challenge is the conservation of the protected indigenous breeds of cows, and in particular the Greek Shorthorn breed, which is characterized by a high ability to adapt to the current climatic conditions. In this thesis, the study of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of mitochondrial DNA, of blood samples of Shorthorn cows compared to samples of Holstein cows was chosen, to identify the genetic differences between them and to develop genetic identification markers of the Shorthorn breed. The technique used is HRM (High Resolution Melting Analysis), through which we identified the standard genotypes of the 2 breeds for the designed and selected primers. The results of the sequencing of the standard samples, proved that finally the markers we studied are not suitable to achieve our goal, and for this reason more research is required in the future at the genome level, for the development of alternative methods of identification and conservation of the breed.

Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες	4
Περίληψη	5
Abstract	6
1)Εισαγωγή	9
1.1) <i>Bos taurus</i> (domesticated cattle).....	9
1.2) Ελληνική βραχυκερατική φυλή	12
1.2.1) Ιστορία.....	12
1.2.2) Μορφολογικά- Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά	13
1.2.3) Παραγωγικά και άλλα χαρακτηριστικά	14
1.3) Κλιματική αλλαγή.....	14
1.4) Επιπτώσεις κλιματικής αλλαγής στον <i>Bos taurus</i>	15
1.5) Ανάγκη διατήρησης της Ελληνικής Βραχυκερατικής φυλής	18
1.6) Βιολογία διατήρησης (Conservation Biology)- Γενετική της διατήρησης (Conservation Genetics)	19
1.7) Μοριακοί δείκτες (molecular markers)	20
1.8) Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA).....	23
1.9) Τεχνικές διατήρησης φυλών του είδους <i>Bos taurus</i>	25
1.9.1) <i>In situ</i> διατήρηση	25
1.9.2) <i>Ex situ</i> διατήρηση.....	26
1.9.2.i) <i>Ex situ in vivo</i> μέθοδος διατήρησης	26
1.9.2.ii) Μέθοδος κρυοσυντήρησης (Cryoconservation ή Cryopreservation) ...	26
1.10) Σκοπός	28
2.1) Αποσαφήνιση εξελικτικών σχέσεων των φυλών του <i>Bos taurus</i>	29
2.1.1) Αλληλουχίες μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων	29
2.1.2) Στοίχιση γονιδιωμάτων	29
2.1.3) Φυλογενετική ανάλυση	30
2.2) Μοριακές αναλύσεις για τον διαχωρισμό των φυλών	31
2.2.1) Εντοπισμός πολυμορφικών θέσεων (SNPs)	31
2.2.2) Γενετική ταυτοποίηση SNPs.....	31
2.3) Σχεδιασμός εκκινήτων	33
2.4) Δείγματα	35

2.4.1) Απομόνωση DNA	35
2.4.2) Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA	36
2.4.3) Ποσοτική ανάλυση δειγμάτων	37
2.5) PCR - Έλεγχος εκκινήτων	37
2.6) HRM (High Resolution Melting Analysis)	39
2.7) Προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων προς αλληλούχιση	42
2.7.1) qPCR	42
2.7.2) Καθαρισμός δειγμάτων DNA	42
2.8) Αλληλούχιση δειγμάτων και ανάλυση των αποτελεσμάτων της	43
3) Αποτελέσματα	44
3.1) Φυλογενετικό δέντρο	44
3.2) Απομόνωση DNA και αξιολόγηση της ηλεκτροφόρησης	45
3.3) Επιλογή primer	46
3.4) Εύρεση των πρότυπων γονοτύπων	46
3.5) Αποτελέσματα αλληλούχισης πρότυπων δειγμάτων	52
4) Συζήτηση	59
Βιβλιογραφία	64

1)Εισαγωγή

Η κτηνοτροφία ως πρωτογενής τομέας παραγωγής αποτελεί αναντίρρητα βασική πηγή οικονομικής ανάπτυξης για τη χώρα, παρέχοντας εισόδημα σε χιλιάδες οικογένειες, ενώ ταυτόχρονα η παραγωγή και εξαγωγή κτηνοτροφικών προϊόντων συμβάλλει στην ανάκαμψη του εμπορίου και την ενίσχυση της οικονομίας. Η βοοτροφία, ως βασικός κλάδος της κτηνοτροφίας που επικεντρώνεται στην εκτροφή και διαχείριση βοοειδών, σήμερα καλείται να αντιμετωπίσει σημαντικές προκλήσεις, όπως οι επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής στην παραγωγή, αλλά και την παραγκώνιση των παραδοσιακών μεθόδων εκτροφής, από σύγχρονες μεθόδους που προωθούν τα γενετικά βελτιωμένα ζώα. Έτσι, μία από τις κύριες κατευθύνσεις αντιμετώπισης του προβλήματος, είναι η διατήρηση των αυτόχθονων φυλών βοοειδών, ανάμεσα στις οποίες βρίσκεται η Ελληνική Βραχυκερατική φυλή, που αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης της παρούσας πτυχιακής εργασίας, καθώς και η ανάπτυξη δεικτών γενετικής τους ταυτοποίησης.

1.1) *Bos taurus* (domesticated cattle)

Οι οικόσιτες αγελάδες είναι μεγάλα και εύρωστα ζώα, που έχουν προσαρμοστεί σε πολλά διαφορετικά ενδιαίτηματα παγκοσμίως, ενώ η εξέλιξή τους τις καθιστά ιδιαιτέρως σημαντικές για αναπαραγωγικούς σκοπούς. Ήδη από τα αρχαία χρόνια, η εξημέρωση των αγελάδων, αποτέλεσε ένα καθοριστικής σημασίας γεγονός στην πρόοδο της γεωργίας, της κτηνοτροφίας, της διατροφής και της οικονομίας των ανθρώπινων κοινωνιών. Συγκεκριμένα, εκτός από τη χρήση τους ως τροφή υψηλής διατροφικής αξίας, τα βοοειδή χρησιμοποιούνται και στη γεωργία για διάφορες εργασίες όπως το όργωμα και η μετακίνηση βαρέων φορτίων.

Μοριακές αναλύσεις απέδειξαν τον κοινό πρόγονο των διάφορων φυλών βοοειδών τον Ούρο (*Bos primigenius*) (Εικόνα 1), πριν από περίπου 250.000 χρόνια (Papachristou et al., 2020). Συγκεκριμένα, ο *Bos primigenius* καταλάμβανε την Ευρώπη, την Ασία και τη Βόρεια Αμερική κατά την περίοδο του Ολόκαινου και εξαφανίστηκε περί το 1624.



Εικόνα 1: *Bos primigenius*, Εθνικό Μουσείο Δανίας ([Aurochs - Wikipedia](#))

Τα σύγχρονα βοοειδή, ως απόγονοι του *Bos primigenius*, των οποίων η εξημέρωση υπολογίζεται ότι ξεκίνησε πριν από περίπου 10.000 χρόνια στην Ασία, χωρίζονται σε δύο είδη: το *Bos taurus* που μελετήσαμε στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία και το *Bos indicus*. Αναλύσεις μονογονεϊκών και αυτοσωμικών δεικτών απέδειξαν ότι τα 2 αυτά είδη προέρχονται από δύο γεωγραφικά και γενετικά διαχωρισμένους προγόνους.

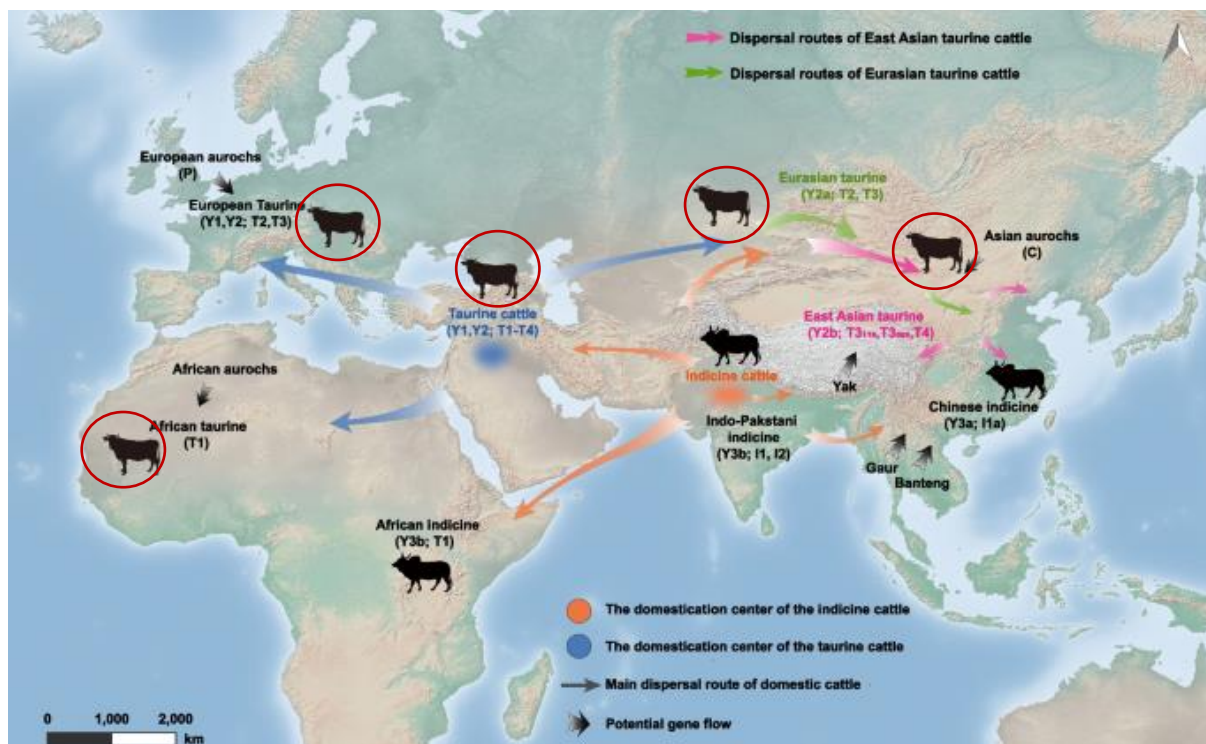
Ο *Bos taurus* κυρίως διανέμεται σε περιοχές με εύκρατο και ψυχρό κλίμα και ιδιαίτερα στο Βόρειο Ημισφαίριο, ενώ ορισμένες φυλές του έχουν εξαπλωθεί σε Αφρική και Αμερική. Ωστόσο, η πάροδος του χρόνου έδειξε την εμφάνισή του σε όλες τις κατοικημένες ηπείρους.

Παράλληλα, οι περιβαλλοντικές συνθήκες και ειδικότερα το κλίμα, το υψόμετρο, καθώς και η παρουσία ή απουσία νερού στο εκάστοτε ενδιαίτημα, αποτέλεσαν κομβικό σημείο στην προσαρμογή των βοοειδών και την έντονη γονιδιακή ποικιλότητα μεταξύ των διάφορων φυλών τους.

Η μεταναστευτική πορεία των φυλών του *Bos taurus* από τη Μέση Ανατολή στην Αφρική χρονολογείται πριν από 6.800 χρόνια, στο Βόρειο τμήμα της Ανατολικής Ασίας πριν από 5.000-4000 χρόνια και η εισαγωγή τους στην Βόρεια και Νότια Αμερική από την Ευρώπη και την Αφρική χρονολογείται το 1.492.

Αξιοσημείωτο επίσης κρίνεται και το γεγονός ότι γενετικές αναλύσεις απέδειξαν ότι οι Ευρωπαϊκές φυλές βοοειδών του *Bos taurus*, κατανέμονται σε εύκρατα κλίματα, φέρουν αλληλόμορφα από την ανάμειξή τους με Ευρωπαϊκά βοοειδή του είδους *Bos primigenius*, και αποτελούν τον πρόγονο των

περισσότερων φυλών που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία σε παγκόσμιο επίπεδο (Xia et al., 2023).



Εικόνα 2: Κύρια μεταναστευτική πορεία. Σε κύκλο διαφαίνονται τα βοοειδή του είδους *Bos taurus*. (Xia et al., 2023)

Κατά την περίοδο εισαγωγής της οικόσιτης αγελάδας στην Ευρώπη, η Μεσόγειος και ειδικότερα η Ελλάδα λόγω της γεωγραφικής της θέσης κατείχαν σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση των κτηνοτρόφων με τα κοπάδια τους από την Ανατολή. Ιστορικά, η Νότια Βαλκανική χερσόνησος πρωταγωνίστησε στις μετακινήσεις πληθυσμών, ήδη από τη Νεολιθική εποχή σχεδόν, μέχρι το κοντινό παρόν πριν από 40 περίπου χρόνια. Οι μεταναστευτικές αυτές κινήσεις, που βοήθησαν στη γονιδιακή ροή, η γενετική παρέκκλιση (genetic drift), η απομόνωση των βοοειδών λόγω φυσικών και γεωγραφικών εμποδίων, καθώς και ο ανθρώπινος παράγοντας οδήγησαν στη δημιουργία τοπικών φυλών αγελάδων καλά προσαρμοσμένων σε πιο σκληρά περιβάλλοντα (Papachristou et al., 2020).

Στην Ελλάδα τα γηγενή βοοειδή κατατάσσονται σε δύο φυλές του είδους *Bos taurus*, την Ελληνική Βραχυκερατική φυλή και την Ελληνική Στεππική φυλή, καθώς και σε μια φυλή βούβαλου του είδους *Bubalus bubalis* (Ελληνικός Βούβαλος) (Βραχυκερατική Φυλή - Ένωση Εκτροφέων Ελληνικής Βραχυκερατικής Φυλής Βοοειδών (vrachikeratiki.gr)

1.2) Ελληνική βραχυκερατική φυλή

1.2.1) Ιστορία

Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1950, εξαιτίας των αντίξωων κλιματεδαφικών, οικονομικών και κοινωνικών συνθηκών που επικρατούσαν στη χώρα, τα γηγενή βοοειδή, δε σημείωσαν γενετική και παραγωγική βελτίωση. Τα βοοειδή της Ελληνικής Βραχυκερατικής φυλής, εκείνη την περίοδο εκτρέφονταν σχεδόν σε όλες τις περιοχές της Ελλάδας και αντιπροσώπευαν περίπου το 80% του συνόλου των εγχώριων φυλών. Ωστόσο, από το 1946 και έπειτα, λόγω της αυξημένης ανάγκης για κτηνοτροφικά προϊόντα, άρχισε η μαζική εισαγωγή ταύρων και αγελάδων της φυλής «Φαιά των Άλπεων» (Σβιτς) και η εφαρμογή προγραμμάτων τεχνητής σπερματέγχυσης για τη βελτίωση των αποδόσεων των ελληνικών βοοειδών.

Σήμερα, στην Ελλάδα, πληθυσμοί της Ελληνικής Βραχυκερατικής φυλής απαντώνται κυρίως σε ορεινές περιοχές της Αιτωλοακαρνανίας, της Ηπείρου, των Γρεβενών, της Ροδόπης, του Μπέλες, του Παγγαίου, της Θεσσαλίας, της υπόλοιπης Δυτικής Μακεδονίας και Πίνδου, καθώς και σε νησιά όπως η Κεφαλονιά και η Ιθάκη.

Η Ελληνική Βραχυκερατική φυλή θεωρείται συγγενής άλλων βραχυκερατικών φυλών των Βαλκανίων με καταγωγή από την αρχαία ιλλυρική φυλή. Μεταξύ αυτών είναι: η φυλή Busa ή Busha της Γιουγκοσλαβίας από την οποία προέρχονται τα βραχυκερατικά ζώα της Αλβανίας, η φυλή Busa της Ρουμανίας, και η Βραχυκερατική της Ροδόπης στη Βουλγαρία. Συγκριτικά με αυτές τις φυλές, η Ελληνική Βραχυκερατική είναι η πιο μικρόσωμη (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Αγελάδα Ελληνικής Βραχυκερατικής φυλής

1.2.2) Μορφολογικά- Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά

Πρόκειται για ζώα μικρού σωματικού βάρους (95-115 εκ. ύψος ακρωμίου), κοντά με αδύνατα άκρα, ενώ ο φυλετικός διμορφισμός είναι ξεκάθαρος, καθώς τα αρσενικά είναι μεγαλύτερα από τα θηλυκά. Το τρίχωμά τους είναι μονόχρωμο σε διάφορα χρώματα από γκριζο, καστανό, καστανοκόκκινο, ωχρο ή και τελείως μαύρο. Σε όλους τους πιθανούς χρωματισμούς τα άσπρα σημάδια ή κηλίδες δεν είναι αποδεκτά. Επιπρόσθετα, στα αρσενικά κυρίως είναι πιθανή μία χρωματική διαφοροποίηση κατά μήκος της ραχοκοκαλιάς και στο μέτωπο. Το χρώμα των βλεννωδών ιστών είναι συνήθως γκρι ή μαύρο, ενώ όταν το ζώο προέρχεται από επιμειξία με βοοειδές της Ιλλυρικής φυλής, το πίσω μέρος μπορεί να είναι ροζ. Επιπλέον, τα βοοειδή της Ελληνικής Βραχυκερατικής φυλής, και κυρίως τα θηλυκά διακρίνονται για το μικρό και σχετικά στενό κεφάλι με μύτη σφηνοειδούς σχήματος και μεγάλα μάτια. Τα κέρατά τους είναι μικρά και λεπτά και συνήθως έχουν στεφανοειδή κλίση προς τα μπροστά ή προς τα επάνω και το τρίχωμά τους είναι τραχύ και σε ορισμένα σημεία, όπως το μέτωπο των ταύρων, πυκνό. Τέλος, το ρινικό κάτοπτρο των ζώων της συγκεκριμένης φυλής, είναι γκριζο- μαύρου χρώματος, με έναν πιο ανοιχτόχρωμο δακτύλιο να το περιβάλλει (πιθανή εξαίρεση αποτελούν τα εντελώς μαύρα βοοειδή).

1.2.3) Παραγωγικά και άλλα χαρακτηριστικά

Η Ελληνική Βραχυκερατική φυλή αγελάδων αποτελεί κυρίως κρεοπαραγωγική φυλή, αν και σχετική βιβλιογραφία αναφέρει ότι αποτελεί μικτή φυλή, δηλαδή για παραγωγή κρέατος και γάλατος. Ωστόσο, συγκριτικά με τις γενετικά βελτιωμένες φυλές, η Βραχυκερατική σημειώνει χαμηλότερη απόδοση σε κρέας και γάλα, αν και μελλοντικά με την επιλογή των κατάλληλων γεννητόρων, θα μπορούσε να υπάρξει βελτίωση. Επιπρόσθετα, οι αγελάδες διατηρούνται στην αναπαραγωγή για περισσότερο από 15 χρόνια και διακρίνονται για εύκολη ικανότητα σύλληψης, καθώς έρχονται σε οίστρο 3-4 εβδομάδες μετά τον τοκετό. Τα νεογέννητα βοοειδή, δέχονται αμέσως τη φροντίδα της μητέρας τους και σημειώνουν χαμηλό ποσοστό θνησιμότητας κατά τη γέννηση. Η συμπεριφορά των βοοειδών ποικίλει και εξαρτάται από τη δραστηριότητα του κοπαδιού, καθώς και από το σύστημα εκτροφής και χειρισμού τους από τον κτηνοτρόφο. Αναλυτικότερα, όσο αφορά τις συνθήκες εκτροφής τους, παρουσιάζουν μικρή ανάγκη για συμπληρωματική διατροφή (κυρίως το χειμώνα) και κτηνιατρική φροντίδα (για παράδειγμα, σπάνια υπάρχει ανάγκη παροχής ανθρώπινης βοήθειας στον τοκετό), και ακόμη το κόστος συντήρησής τους σε συνθήκες εκτατικής εκτροφής είναι σχετικά χαμηλό. Ταυτόχρονα, τα Ελληνικά Βραχυκερατικά βοοειδή, αποτελούν μία φυλή υψηλής αρμοστικότητας και ανθεκτικότητας στις άλλοτε δύσκολες κλιματεδαφικές και περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα ζώα αξιοποιούν πλήρως τις διαθέσιμες πηγές τροφής, δηλαδή λιβάδια και βοσκοτόπους (ποολίβαδα, φρυγαβολίβαδα, θαμνολίβαδα, δασολίβαδα, δάση, καλαμιώνες, υγρολίβαδα, εγκαταλελειμένοι αγροί) όλες τις εποχές του χρόνου. Η ιδιαίτερη αυτή ικανότητα της Βραχυκερατικής φυλής να προσαρμόζεται στο περιβάλλον εκτροφής με τον καλύτερο δυνατό τρόπο, της δίνει πλεονέκτημα επιβίωσης και αναπαραγωγής ακόμα και σε αντίξοες συνθήκες, οι οποίες στις μέρες μας λόγω της έκδηλης κλιματικής αλλαγής απασχολούν σημαντικά την ανθρώπινη κοινωνία και ιδιαιτέρως τους κτηνοτρόφους (Βραχυκερατική Φυλή - Ένωση Εκτροφέων Ελληνικής Βραχυκερατικής Φυλής Βοοειδών (vrachikeratiki.gr)).

1.3) Κλιματική αλλαγή

Η κλιματική αλλαγή αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα καίρια ζητήματα της εποχής μας με ολέθριες επιπτώσεις για ολόκληρο τον πλανήτη. Η πιο έκδηλη μορφή της καθίσταται αναμφίβολα η υπερθέρμανση του πλανήτη, η οποία ορίζεται ως η σταθερή και μακροχρόνια αύξηση της ετήσιας θερμοκρασίας σε παγκόσμια κλίμακα. Ήδη από τη δεκαετία του 1980 έχει σημειωθεί αύξηση της θερμοκρασίας κατά 0.18 °C ανά δεκαετία, γεγονός που οδηγεί σε πρόβλεψη για άνοδο της θερμοκρασίας από 2.1 °C έως 3.9 °C από το 2100. Οι δραστικές αλλαγές θερμοκρασίας έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ακραίων καιρικών

φαινομένων, όπως καύσωνας και ξηρασία, την άνοδο της στάθμης των υδάτων, το λιώσιμο των πάγων και τις πλημμύρες (Donolou et al., 2023).

Η κλιματική αλλαγή λοιπόν, έχει άμεση επίπτωση στη γεωργικό και κτηνοτροφικό τομέα. Αναλυτικότερα, η ραγδαία αύξηση της θερμοκρασίας επηρεάζει την ποιότητα των ζωοτροφών, των βοσκοτόπων και των καλλιεργειών. Όσο αναφορά τα βοοειδή παρατηρείται μείωση της βιωσιμότητας, της παραγωγικότητάς τους, της γονιμότητάς τους και καθίστανται επιρρεπή σε ασθένειες (Passamonti et al., 2021).

Φυσικά, οι αρνητικές επιπτώσεις της κλιματικής κρίσης στον παραγωγικό τομέα έχουν άμεση επίπτωση και στον άνθρωπο. Εκτός από τα υπέρογκα ποσά δισεκατομμυρίων δολαρίων που έχουν χαθεί σε εθνικό επίπεδο λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας, η επιπλέον θερμότητα που παράγεται από τη μεταβολική δραστηριότητα των ζώων αναμένεται να έχει δύο έως τέσσερις φορές μεγαλύτερο αντίκτυπο συγκριτικά με την κλιματική αλλαγή (Collier et al., 2018). Για το λόγο αυτό, μείζονος σημασίας κρίνεται η διατήρηση ισορροπίας ανάμεσα στην παραγωγή, τη διατροφική ασφάλεια και τη διατήρηση του περιβάλλοντος (Rojas-Downing et al., 2017).

1.4) Επιπτώσεις κλιματικής αλλαγής στον *Bos taurus*

Η ραγδαία άνοδος της ετήσιας θερμοκρασίας και ιδίως κατά τους καλοκαιρινούς μήνες αποτελεί κρίσιμη απειλή για την κτηνοτροφία, καθώς τα βοοειδή υπόκεινται σε θερμικό στρες (Donolou et al., 2023).

Ως θερμικό στρες, ορίζουμε το σύνολο των εσωτερικών και εξωτερικών δυνάμεων που ενεργούν σε ένα ζώο με στόχο την αύξηση της θερμοκρασίας του σώματός του και την πρόκληση φυσιολογικής απόκρισης. Στα βοοειδή, η υψηλή θερμοκρασία του αέρα, η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, καθώς και η υγρασία, οδηγούν σε συσσώρευση θερμότητας. Όταν τα ζώα επιδέχονται θερμικό στρες, προσπαθούν να διατηρήσουν την ισορροπία θερμικής ενέργειας και κατ' επέκταση την εσωτερική τους θερμοκρασία σταθερή. Για να επιτευχθεί αυτό, η ενέργεια του μεταβολισμού θα πρέπει να ισούται με την ενέργεια που χάνεται στο περιβάλλον. Διαταραχή του παραπάνω ισοζυγίου συνεπάγεται απορρύθμιση της θερμικής ισορροπίας (Becker et al., 2020).

Επάλληλα, το θερμικό στρες προκαλεί αύξηση εμφάνισης μολυσματικών και μεταβολικών ασθενειών, μειωμένη παραγωγή γάλατος και υπογονιμότητα στις αγελάδες. Προκειμένου να προσαρμοστούν στις νέες περιβαλλοντικές συνθήκες και να αντισταθμίσουν τις δυσμενείς επιδράσεις του θερμικού στρες, τα βοοειδή

έχουν αναπτύξει συμπεριφορικούς, φυσιολογικούς, ενδοκρινικούς και μοριακούς μηχανισμούς θερμορύθμισης.

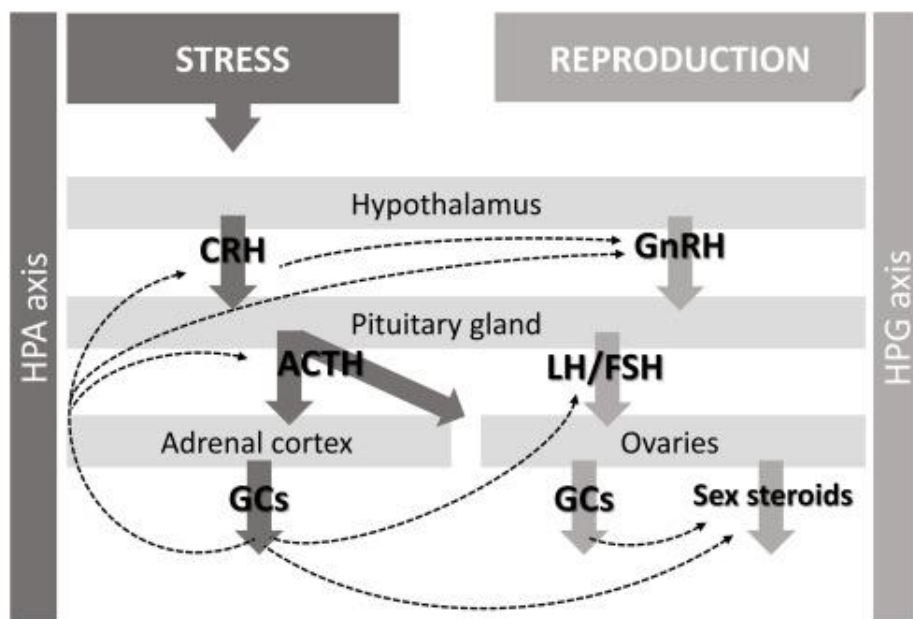
Αναλυτικότερα, η πρώτη αντίδραση των βοοειδών στο θερμικό στρες είναι η αλλαγή της συμπεριφοράς τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το ότι οι αγελάδες γαλακτοπαραγωγής υπό την αύξηση του θερμικού στρες τείνουν να περνούν περισσότερο χρόνο όρθιες παρά καθιστές. Ωστόσο, η αλλαγή αυτή έχει επιπτώσεις στην υγεία, τη γονιμότητα και την παραγωγική τους απόδοση (Donolou et al., 2023).

Ακόμη, η αύξηση της θερμοκρασίας επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα και τη θρεπτική αξία της τροφής που καταναλώνουν τα οικόσιτα ζώα και επομένως και τα βοοειδή. Όταν λοιπόν, τα βοοειδή βιώνουν θερμική καταπόνηση, αδυνατούν να καλύψουν τις διατροφικές τους ανάγκες με αποτέλεσμα να επηρεάζονται σημαντικά οι πεπτικές και μεταβολικές τους λειτουργίες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί η μεταβολική αλκάλωση στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής λόγω έλλειψης νατρίου και καλίου εξαιτίας του θερμικού στρες, γεγονός που οδηγεί στην αύξηση του ρυθμού αναπνοής. Στην κατεύθυνση αυτή, η μειωμένη πρόσληψη ζωοτροφών υψηλής διατροφικής αξίας, οδηγεί σε αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο και σε περιορισμό αύξησης του σωματικού βάρους. Ταυτόχρονα, και η ελαττωμένη πρόσληψη νερού λόγω της δραματικής αύξησης της θερμοκρασίας, μπορεί να μειώσει την εφίδρωση καθώς και την πρόσληψη τροφής (Rojas-Downing et al., 2017).

Αναφορικά με τα αναπαραγωγικά προβλήματα, ως μία από τις σημαντικότερες συνέπειες του θερμικού στρες στα βοοειδή, σχετική έρευνα απέδειξε ότι η μειωμένη γονιμότητα σχετίζεται άμεσα με τη λειτουργία δύο νευροενδοκρινικών αξόνων: του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA), και του άξονα υποθαλαμικής υπόφυσης-γονάδων (HPG), η δράση των οποίων παρουσιάζεται στην εικόνα 4. Οι δύο αυτοί άξονες έχουν αντίρροπη δράση, δηλαδή η ενεργοποίηση του HPA, έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή του HPG, και οι μεταβολές που προκαλούνται από τη δράση τους σχετίζονται άμεσα με αναπαραγωγικά προβλήματα (Huber et al. 2020).

Ουσιαστικά, το θερμικό στρες προκαλεί έκκριση της ορμόνης απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης (CRH) από τον υποθάλαμο, και έτσι ενεργοποιείται ο άξονας HPA. Επάλληλα, η παραγωγή CRH, οδηγεί σε έκκριση αδρενοκορτικοτροπικής ορμόνης (ACTH) από την υπόφυση, η οποία με τη σειρά της προκαλεί τη σύνθεση και απελευθέρωση γλυκοκορτικοειδών (GCs) από τα επινεφρίδια. Επιπλέον, τα υψηλά επίπεδα CRH, ελαττώνουν την παραγωγή της συσχετιζόμενης με απελευθέρωση γοναδοτροπίνης ορμόνης GnRH, η οποία διεγείρει την έκκριση των ορμονών του αναπαραγωγικού συστήματος LH και FSH

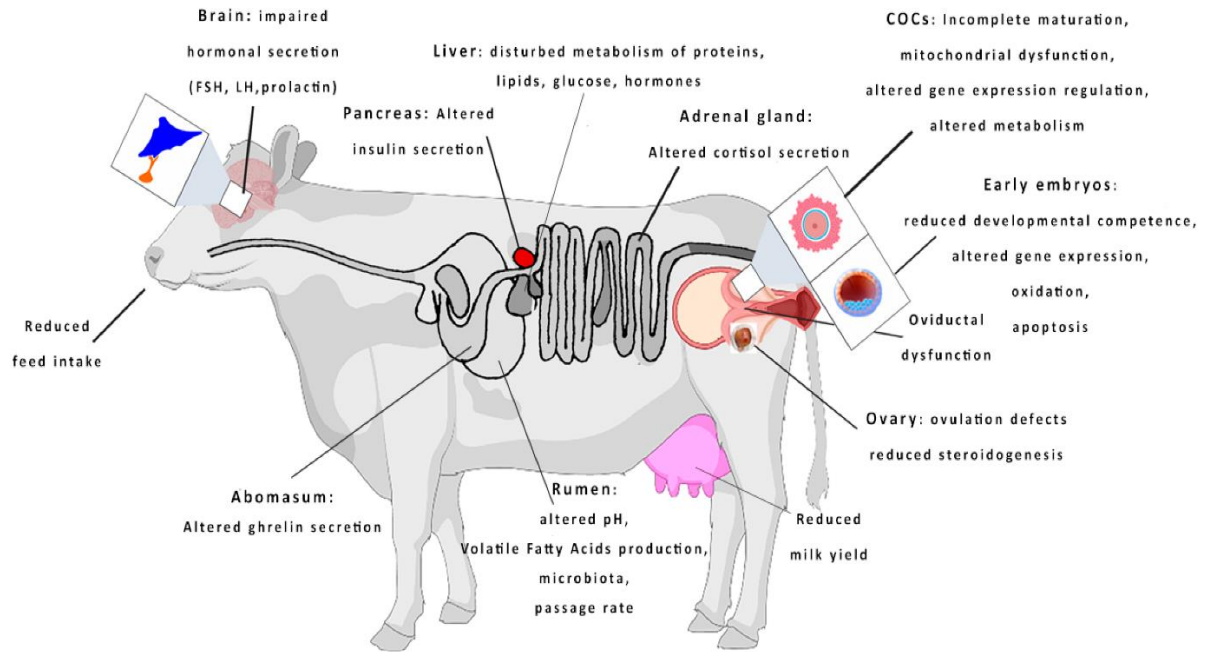
από την υπόφυση. Οι ορμόνες αυτές είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό του ωοθυλακίου και του ωχρού σωματίου, καθώς και την ωορρηξία. Η μείωση των επιπέδων τους λοιπόν, έχει άμεση επίδραση στις ωοθήκες, τις οποίες καθιστά δυσλειτουργικές. Μάλιστα, το θερμικό στρες προκαλεί ορμονικές μεταβολές, αυξάνει τα επίπεδα προγεστερόνης και μειώνει εκείνα της LH, δυσχεραίνοντας τη γονιμοποίηση και οδηγώντας τελικά σε απόρριψη του εμβρύου από τη μήτρα (Naranjo-Gómez et al., 2021).



Εικόνα 4: Απεικόνιση της αλληλεπίδρασης των δύο αξόνων (Huber et al., 2020).

Βέβαια, ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι σύμφωνα με σχετική έρευνα των (Naranjo-Gómez και συνεργατών, 2021), λόγω του θερμικού στρες, ενεργοποιούνται πολλά γονίδια ανάμεσα στα οποία είναι και η κυκλοοξυγενάση 1 και 2 (COX1, COX2), που αποτελεί πηγή πολυμορφισμών όπως θα δούμε στη συνέχεια.

Συνολικά, οι επιπτώσεις του θερμικού στρες στα βοοειδή, απεικονίζονται στην παρακάτω εικόνα 5.



Εικόνα 5: Τα αποτελέσματα έκθεσης σε θερμικό στρες στα βοοειδή του είδους *Bos taurus* (Dovolou et al., 2023).

1.5) Ανάγκη διατήρησης της Ελληνικής Βραχυκερατικής φυλής.

Δεδομένου λοιπόν της έκδηλης και έντονης οικολογικής κρίσης ως επακόλουθο της κλιματικής αλλαγής, καθώς και των επιπτώσεων αυτών στη φυσιολογία και την παραγωγικότητα των βοοειδών, η ελληνική κτηνοτροφία καλείται να αντιμετωπίσει μία επιπλέον πρόκληση, τη διατήρηση της Ελληνικής Βραχυκερατικής φυλής. Πιο συγκεκριμένα, η διατήρηση αυτής της φυλής καθίσταται επιτακτική ανάγκη, καθώς μπορεί να βοηθήσει στην ανάκαμψη της κτηνοτροφίας μιας και όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η σωματοδομή, η ευκολία προσαρμογής και η ελάχιστη ανάγκη ανθρώπινης παρέμβασης που χαρακτηρίζει τα βοοειδή της φυλής, μπορούν να ωφελήσουν οικονομικά τον κτηνοτρόφο σε σχέση με άλλες φυλές εισαγόμενες και εγχώριες. Επιπρόσθετα, τα ζώα διακρίνονται από κρέας υψηλής διατροφικής αξίας, πλούσιο σε Ω3 και Ω6 λιπαρά, καθώς αξιοποιούν πλήρως την πανίδα των βοσκοτόπων τους συγκριτικά με τις εισαγόμενες φυλές. Μάλιστα, πολλές από τις εκτροφές είναι πιστοποιημένες βιολογικές, γεγονός που αποδεικνύει την υψηλή ποιότητα του κρέατος και των γαλακτοκομικών προϊόντων της φυλής. Ωστόσο, αν και η συγκεκριμένη φυλή δεν ενδείκνυται για παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων γάλακτος, με τις εισαγόμενες αγελάδες της φυλής Holstein κυρίως να κατακλύζουν την αγορά, το γάλα τους είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά. Για τον λόγο αυτό, θα μπορούσε να προωθηθεί περαιτέρω η εξαγωγή γνήσιων κρεοπαραγωγικών κυρίως προϊόντων με

κατοχυρωμένη προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (ΠΟΠ), γεγονός που αναμφισβήτητα θα συνέβαλε στην ενίσχυση της εγχώριας οικονομίας και θα αποτελούσε κίνητρο για μεγαλύτερη ενασχόληση με την κτηνοτροφία. Στην ίδια κατεύθυνση, η εκτροφή της Ελληνικής Βραχυκερατικής φυλής, θα μπορούσε να οδηγήσει στην εκμετάλλευση αναξιοποίητων μέχρι τώρα εκτάσεων και τη διατήρηση και προστασία των εκάστοτε οικοσυστημάτων.

Βέβαια, η διατήρηση της Ελληνικής Βραχυκερατικής φυλής αγελάδων, εκτός από οικονομικούς λόγους, καθίσταται απαραίτητη για τη διάσωση της βιοποικιλότητας της Ελληνικής υπαίθρου, καθώς τα συγκεκριμένα βοοειδή έχουν σημειώσει ιστορία χρόνων και είναι άρρηκτα συνδεδεμένα με τη διατροφική και πολιτιστική ταυτότητα του τόπου μας.

Για τους παραπάνω λόγους, τα τελευταία χρόνια η διατήρηση της συγκεκριμένης φυλής, αποτελεί εκτός από στόχο των κτηνοτρόφων, αντικείμενο έντονης ερευνητικής δραστηριότητας, κυρίως από τους βιολόγους που ασχολούνται με τη διατήρηση.

1.6) Βιολογία διατήρησης (Conservation Biology)- Γενετική της διατήρησης (Conservation Genetics)

Η Βιολογία διατήρησης, αποτελεί τον κλάδο της Βιολογίας που προσπαθεί να κατανοήσει και να επιλύσει τα βασικά προβλήματα της παγκόσμιας κρίσης βιοποικιλότητας. Αποτελεί ένα σύνθετο επιστημονικό πεδίο, με την έρευνα να εστιάζει στις αιτίες υποβάθμισης της βιοποικιλότητας, όπως η κλιματική αλλαγή, η καταστροφή των οικοσυστημάτων, η υπερεκμετάλλευση των φυσικών πόρων, η περιβαλλοντική ρύπανση και η δράση του ανθρώπινου παράγοντα (Fonseca et al., 2021).

Η Γενετική της διατήρησης από την άλλη, στηρίζεται στην εφαρμογή της γενετικής για την κατανόηση και τη μείωση του κινδύνου εξαφάνισης των διάφορων πληθυσμών και ειδών. Ασχολείται κυρίως με τους γενετικούς παράγοντες που σχετίζονται με την εξαφάνιση, όπως η απώλεια της γενετικής ποικιλότητας. Τις τεχνικές τις οποίες χρησιμοποιεί αποτελούν κυρίως τα προγράμματα μαθηματικής μοντελοποίησης, οι υπολογιστικές προσομοιώσεις, τα εργαστηριακά πειράματα και οι εργασίες πεδίου, οι μετα-αναλύσεις, καθώς και ο συνδυασμός των παραπάνω. Λόγω της πολυπλοκότητας του συγκεκριμένου κλάδου, μεμονωμένα πειράματα απαιτούν συμπληρωματική ενίσχυση με βελτίωση της στατιστικής ανάλυσης, την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, τους δείκτες DNA και τη Γενωμική (Frankham, 2019).

1.7) Μοριακοί δείκτες (molecular markers)

Μια από τις σημαντικότερες και πιο χρησιμοποιούμενες τεχνικές της Γενετικής της Διατήρησης, είναι οι Μοριακοί δείκτες. Ειδικότερα, οι μοριακοί δείκτες χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών, την εύρεση της γενετικής ποικιλότητας, καθώς και των ατόμων που καθορίζουν τη γονιδιακή δεξαμενή (gene pool) του είδους, και τη μελέτη της συγγένειας των ατόμων ενός είδους με τη σύγκριση γονοτύπων σε πολλούς πολυμορφικούς γενετικούς τόπους.

Σήμερα, οι επιστήμονες για τη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας αξιοποιούν μία πληθώρα μοριακών δεικτών. Μεταξύ αυτών, συγκαταλέγονται και οι δείκτες DNA που στηρίζονται στη θεωρία της PCR (Polymerase chain reaction), με μερικούς από τους κυριότερους να είναι οι εξής: **RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA), **AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphisms), **VNTRs** (Variable number tandem repeats), το μιτοχονδριακό DNA (**mtDNA**), και **RFLP** (restriction fragment length polymorphism) (Bhaskar & Sharon, 2023). Ακόμη, κάποιοι από τους δείκτες που χρησιμοποιούνται στη διατήρηση είναι οι **SSRs** (simple sequence repeats), τα **SNPs** (Single nucleotide polymorphisms) και οι **μικροδορυφόροι** (Microsatellites). Οι δείκτες SSR, εν αντιθέσει με τους RAPD και AFLP, χρειάζονται περισσότερες πληροφορίες σε μοριακή βάση για την αλληλουχία που μελετάμε για το σχεδιασμό των εκκινήτων. Οι προαναφερθείς δείκτες χρησιμοποιούνται διότι επιτρέπουν τον ταυτόχρονο έλεγχο πολλών γενετικών τόπων. Συγκριτικά με την ικανότητά τους γενετικής διαφοροποίησης, ισχύει ότι: SSR > AFLP > RAPD. Μάλιστα, οι δείκτες RAPD και AFLP είναι κυρίαρχοι καθώς διαθέτουν δύο αλληλόμορφα για κάθε γενετικό τόπο. Αντιθέτως, οι δείκτες SSRs, είναι συγκυρίαρχοι, μπορούν να αναγνωρίσουν και τα δύο αλληλόμορφα και διακρίνονται από ικανότητα διαφοροποίησης μεταξύ ομοζυγωτίας και ετεροζυγωτίας (Arif et al., 2011).

Παρακάτω ακολουθεί μια σύντομη ανάλυση μερικών από τους κυριότερους μοριακούς δείκτες DNA που χρησιμοποιούνται στη Γενετική της Διατήρησης:

- ❖ **RAPD:** Πρόκειται για ενισχυμένα προϊόντα του λιγότερο λειτουργικού τμήματος του γονιδιώματος, χωρίς ποικιλία σε επίπεδο πιέσεων επιλογής και φαινοτύπου. Χρησιμοποιούνται για περιοχές DNA που μπορούν να συγκεντρώσουν περισσότερες μεταλλάξεις για την αξιολόγηση της γενετικής διαφοροποίησης. Επιπρόσθετα, οι δείκτες RAPD χρησιμοποιούν έναν αυθαίρετο εκκινητή (primer) (8-12 νουκλεοτίδια) ο οποίος στοχεύει τυχαία στο γονιδίωμα. Οι συγκεκριμένοι δείκτες επιλέγονται καθώς έχουν την ικανότητα να παράγουν προϊόντα διαφόρων μεγεθών με τη χρήση του ίδιου primer σε διαφορετικά άτομα του ίδιου είδους. Συνήθως οι δείκτες αυτοί εντοπίζονται σε περιοχές μη κωδικοποιητικού DNA και το βασικό

τους πλεονέκτημα είναι ότι προσφέρουν τη δυνατότητα μελέτης πολλών γενετικών τόπων και ατόμων. Ωστόσο, το βασικό τους μειονέκτημα είναι η αδυναμία διάκρισης ομοζυγωτών και ετεροζυγωτών. Επίσης, για την εφαρμογή των RAPD δεικτών θεωρείται δεδομένο ότι ο υπό έρευνα πληθυσμός βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Τέλος, η εφαρμογή τους μπορεί να γίνει για τον εντοπισμό παράλογων προϊόντων PCR, στα οποία διαφορετικές περιοχές DNA έχουν ίσα μήκη σε έναν αποκλειστικά γενετικό τόπο (Bhaskar & Sharon, 2023).

❖ **AFLP:** Οι δείκτες αυτοί είναι ενισχυμένα θραύσματα περιορισμού που ενισχύονται με PCR, χρησιμοποιούν εκκινητές πολλαπλών θέσεων και συμβάλουν στην ταυτόχρονη ενίσχυση πολλαπλών γενετικών τόπων (Arif et al., 2011). Χρησιμοποιούν ολόκληρο το γονιδίωμα για την εύρεση πολυμορφισμών, και τα βασικά πλεονεκτήματα τους αφορούν τον αριθμό των πολυμορφισμών ανά αντίδραση, την αναπαραγωγικότητα λόγω των αυστηρών συνθηκών υβριδισμού που απαιτεί η χρήση τους, την ευκολία εφαρμογής και το κόστος της ανάλυσης. Ακόμη, συγκριτικά με άλλους μοριακούς δείκτες όπως SNP, SSR και RAPD, οι δείκτες AFLP εντοπίζουν μεγαλύτερο αριθμό πολυμορφισμών. Τα μειονεκτήματά τους έγκεινται στο γεγονός ότι η εφαρμογή τους είναι αρκετά περίπλοκη διαδικασία πολλών σταδίων και η αντίδραση απαιτεί αρκετά μεγάλη ποσότητα (300–1000 ng ανά αντίδραση) καλής ποιότητας DNA. Ακόμα χρειάζονται gel πολυακρυλαμιδίου και χρώση αργύρου και ραδιενέργεια φθορίζοντων ανιχνευτών, σε αντίθεση με το απλό πήκτωμα αγαρόζης άλλων δεικτών και υπάρχει δυσκολία στην αναγνώριση ετεροζυγωτίας παρουσία του αλληλομόρφου (Sheeja et al., 2020).

❖ **RFLP:** Πρόκειται για τον πιο χρησιμοποιούμενο μοριακό δείκτη που στηρίζεται στην τεχνική του υβριδισμού. Η ανάλυση με αυτούς τους δείκτες πραγματοποιείται με βάση την ύπαρξη ή όχι θέσεων αναγνώρισης μιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης. Ένας ανιχνευτής RFLP είναι μια σημασμένη αλληλουχία DNA που υβριδοποιείται με ένα ή περισσότερα θραύσματα του αποδιαταγμένου DNA, από το οποίο μετά διαχωρίζονται με εφαρμογή ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης (Bhaskar & Sharon, 2023). Στους RFLP δείκτες, υπάρχει διαφορά στο μήκος των θραυσμάτων που δημιουργεί ένας συγκεκριμένος τύπος περιοριστικού ενζύμου, μεταξύ μεμονωμένων οργανισμών και ειδών, γεγονός που βοηθά στην εύρεση γενετικών πολυμορφισμών. Ωστόσο, τα μειονεκτήματα εφαρμογής των συγκεκριμένων μοριακών δεικτών αφορούν το κόστος, την

πολυπλοκότητα της μεθόδου λόγω των πολλών σταδίων που απαιτούνται, και τη διαδικασία ανάλυσης, καθώς απαιτούνται πολλά στάδια και είναι χρονοβόρα συγκριτικά με άλλους δείκτες που ακολουθούν την εφαρμογή PCR (Chaudhary & Maurya, 2019).

❖ **Μικροδορυφόροι (Microsatellites):** Πρόκειται για δείκτες που αποτελούνται από διαδοχικές επαναλήψεις μεγέθους 1-6 ζευγών βάσεων. Είναι δείκτες άφθονοι στα γονιδιώματα των περισσότερων ειδών και βρίσκονται σε γονίδια διαγονιδιακών περιοχών. Επιπλέον, παρουσιάζουν μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων, κάτι που ευθύνεται για τη δημιουργία μεγάλου αριθμού αλληλομόρφων σε κάθε θέση μικροδορυφόρου σε έναν πληθυσμό. Οι μικροδορυφόροι είναι ευρέως χρησιμοποιούμενοι δείκτες σε έρευνες πληθυσμιακής γενετικής και γενετικής της διατήρησης, κυρίως λόγω της γονιδιωματικής τους κατανομής, του υψηλού ενδοειδικού πολυμορφισμού τους, της αναπαραγωγιμότητας της διαδικασίας εφαρμογής τους και λόγω του συν-κυρίαρχου τρόπου κληρονόμισής τους. Βέβαια, τα τελευταία χρόνια, η πρόοδος της Βιοπληροφορικής βοήθησε τη συναρμολόγηση των γονιδιωμάτων με ή χωρίς την παρουσία αλληλουχίας αναφοράς και τον εντοπισμό των θέσεων μικροδορυφόρων (Antunes et al., 2022). Το κύριο μειονέκτημα της εφαρμογής των μικροδορυφόρων είναι η δυσκολία της μεθόδου. Μάλιστα, για το σχεδιασμό primer για την PCR, θα πρέπει να γίνεται και προσδιορισμός της συμπληρωματικής αλληλουχίας του θραύσματος του δείκτη (Bhaskar & Sharon, 2023).

❖ **SNPs:** Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί, αποτελούν την πιο κοινή ανάλυση μοριακών δεικτών, καθώς ανιχνεύουν αφθονία πολυμορφισμών σε κωδικές και μη κωδικές περιοχές. Οι πολυμορφισμοί που εντοπίζουν προκαλούνται από σημειακές μεταλλάξεις αλληλομόρφων που περιέχουν εναλλακτικές βάσεις για μία συγκεκριμένη νουκλεοτιδική θέση σε ένα γενετικό τόπο. Σήμερα, η ανάλυση της αλληλούχησης DNA, αποτελεί την πιο ακριβή μέθοδο εύρεσης SNPs. Ένα SNP στη θέση αναγνώρισής του εντός ενός γενετικού τόπου μπορεί να αντικαταστήσει τις τέσσερις βάσεις (A, T, C και G) (Bhaskar & Sharon, 2023). Συγκεκριμένα, οι μηχανισμοί των μεταλλάξεων οδηγούν σε αντικατάσταση πουρίνης σε πουρίνη (A,G) και πυριμιδίνης σε πυριμιδίνη (T,C), καθώς και σε ανταλλαγές μεταξύ πουρίνης και πυριμιδίνης. Αναφορικά με τον εντοπισμό των SNPs, υπάρχουν αρκετές προσεγγίσεις, με κάποιες από τις πιο σύγχρονες να αποσκοπούν στο γενετικό προσδιορισμό γονοτύπων. Όταν λοιπόν, ελέγχονται γονίδια μιας συγκεκριμένης περιοχής DNA, συνήθως επιλέγεται η απευθείας

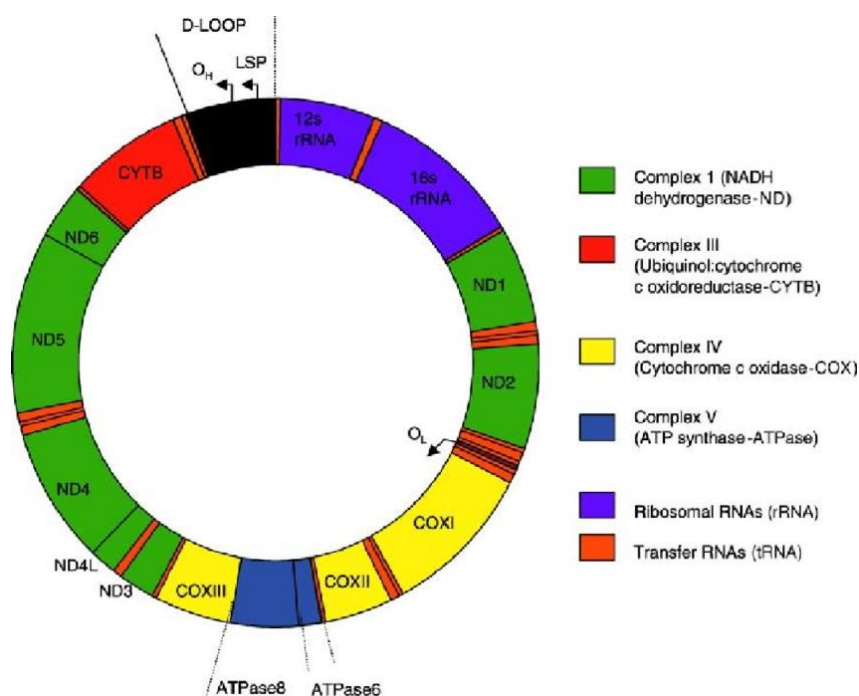
αλληλούχιση των προϊόντων PCR που προέρχονται από το γονιδίωμα διαφορετικών ατόμων. Παρόλα αυτά, όταν η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται εκτεταμένα, τείνει να είναι δαπανηρή, διότι απαιτείται ειδικός σχεδιασμός εκκινητών για την PCR, γιατί η εφαρμογή της περιορίζεται σε περιοχές που υπάρχουν γνωστά δεδομένα αλληλουχίας και γιατί οδηγεί σε παραγωγή διπλοειδών ακολουθιών, στις οποίες είναι δύσκολο κάποιες φορές να εντοπίσουμε πολυμορφισμούς, όπως για παράδειγμα συμβαίνει στους ετεροζυγώτες (Vignal et al., 2002).

Τέλος, ένας ακόμη καθολικά χρησιμοποιούμενος μοριακός δείκτης είναι το **μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)**. Στη παρούσα πτυχιακή εργασία, μελετήσαμε μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs) σε μιτοχονδριακό DNA βοοειδών της Ελληνικής Βραχυκερατικής φυλής.

1.8) Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA), αποτελεί τον πιο χρησιμοποιούμενο δείκτη σε μελέτες πληθυσμιακής ανάλυσης σε ζώα σύμφωνα με έρευνα των (Avise et al. 1987). Ο βασικός λόγος για την επιλογή αυτή, είναι το ότι ο συγκεκριμένος δείκτης χαρακτηρίζεται από μεγάλη διαθεσιμότητα σε αλληλουχίες και εκκινητές. Όταν ένας πληθυσμός βρίσκεται σε ισορροπία μετάλλαξης-γενετικής παρέκκλισης (drift), ουσιαστικά το επίπεδο ποικιλότητας ενός ουδέτερου γενετικού τόπου είναι ανάλογο με το πραγματικό μέγεθος του πληθυσμού. Ως επακόλουθο, το μιτοχονδριακό DNA θεωρείται ότι αντανakλά τις διακυμάνσεις σε μέγεθος πληθυσμού, και άρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως χρήσιμο μοριακό εργαλείο για σκοπούς διατήρησης (Nabholz et al., 2008).

Ταυτόχρονα, το μιτοχονδριακό DNA, λόγω του υψηλού ποσοστού μεταλλάξεων που συγκεντρώνει, χρησιμοποιείται και στις φυλογενετικές αναλύσεις μεταξύ συγγενικών ειδών. Όσο αναφορά τη δομική του λειτουργία, το mtDNA, μεταγράφεται εκτός της περιοχής ελέγχου και της ρυθμιστικής αλληλουχίας D-loop (περίπου 1kb) από όπου ξεκινά το μόριο να αντιγράφεται και να μεταγράφεται. Δεδομένου λοιπόν, ότι η περιοχή αυτή διαθέτει περισσότερες μη κωδικοποιητικές αλληλουχίες, παρουσιάζει και έντονο πολυμορφισμό συγκριτικά με τις κωδικοποιητικές μιτοχονδριακές αλληλουχίες, όπως το κυτόχρωμα b και το γονίδιο της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI), κάτι που δικαιολογείται εξαιτίας της λιγότερης πίεσης της φυσικής επιλογής. Επιπλέον, το γονίδιο 16S rRNA είναι η λιγότερο εξελισσόμενη περιοχή των μιτοχονδρίων (Bhaskar & Sharon, 2023), και το μιτοχονδριακό γονίδιο COX1, αποτελεί σημαντικό εργαλείο μοριακής ταξινόμησης και ταυτοποίησης (Galtier et al., 2009).



Εικόνα 6: Δομή mtDNA θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου των βοοειδών (Sutarno & Setyawan, 2015)

Αναμφίβολα, το mtDNA, παρουσιάζει πληθώρα πλεονεκτημάτων στην εφαρμογή του ως μοριακός δείκτης, γεγονός που δικαιολογεί την επιλογή του σε γενετικές αναλύσεις. Πιο αναλυτικά, το μιτοχονδριακό DNA υπάρχει σε πολλαπλά αντίγραφα μέσα σε ένα κύτταρο και διαθέτει εξαιρετικά διατηρημένες περιοχές όπως για παράδειγμα το ριβοσωμικό DNA, στις οποίες ευνοείται ο σχεδιασμός εκκινητών για την PCR. Συνεπώς το mtDNA θεωρείται η πιο εύκολη και οικονομική επιλογή μοριακού δείκτη, όταν πρόκειται να μελετηθεί σε γενετικό επίπεδο ένα νέο είδος στο φυσικό του περιβάλλον.

Όσο αναφορά τις έρευνες βιοποικιλότητας το μιτοχονδριακό DNA φαίνεται να αποτελεί την ιδανικότερη επιλογή για τους ακόλουθους λόγους:

- Αρχικά, διευκολύνεται σημαντικά η ανάλυση γενετικών ενδοειδικών δεδομένων, διότι το μιτοχονδριακό DNA δρα ως ένας ενιαίος μη ανασυνδυασμένος γενετικός τόπος, καθώς κληρονομείται από τη μητέρα σε όλους τους απογόνους της.
- Επιπλέον, το μιτοχονδριακό DNA λειτουργεί σαν ένα μοριακό ρολόι, καθώς αντικατοπτρίζει τους χρόνους απόκλισης των ειδών, έχοντας ως γνώμονα

τη συσσώρευση των ουδέτερων κυρίως μεταλλάξεων με την πάροδο του χρόνου (Galtier et al., 2009).

Στην κατεύθυνση αυτή, ένας ακόμη λόγος προτίμησης του μιτοχονδριακού DNA για φυλογενετικές αναλύσεις και αναλύσεις ταυτοποίησης ειδών, είναι η απουσία ανασυνδυασμού, η ύπαρξη υψηλά διατηρημένων περιοχών, το υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων λόγω απουσία μηχανισμών επιδιόρθωσης του μιτοχονδρίου εξαιτίας της απλοειδίας και η μεγαλύτερη ενδοκυτταρική του συγκέντρωση συγκριτικά με μοριακούς δείκτες πυρηνικού DNA (Bhaskar & Sharon, 2023).

Ωστόσο, δεδομένου της οικολογικής κρίσης που χαρακτηρίζει την εποχή μας και της ανάγκης διατήρησης των γηγενών φυλών βοοειδών, η επιστημονική κοινότητα εκτός από την εφαρμογή μοριακών δεικτών και γενετικών αναλύσεων, συνεργάζεται και με τον κλάδο της κτηνοτροφίας με στόχο την αναζήτηση και εφαρμογή τεχνικών αναπαραγωγής και διατήρησης που εφαρμόζονται στο εξωτερικό ή τη χώρα μας ή μπορούν να αξιοποιηθούν στο μέλλον.

1.9) Τεχνικές διατήρησης φυλών του είδους *Bos taurus*

Ο κτηνοτροφικός τομέας στην εποχή μας υφίσταται σημαντική υποβάθμιση, κυρίως λόγω της αντικατάστασης των παραδοσιακών μεθόδων παραγωγής με την εκτεταμένη εκτροφή και τις σύγχρονες μεθόδους που επιβάλλουν την παραγωγική κυριαρχία νέων βελτιωμένων βοοειδών (Boudalia et al., 2020). Συνεπώς, κρίνεται επιτακτική η υιοθέτηση τεχνικών πληθυσμιακής διαχείρισης και διατήρησης της Ελληνικής Βραχυκερατικής φυλής.

Οι βασικές στρατηγικές διατήρησης φυλών βοοειδών είναι οι ακόλουθες:

1.9.1) *In situ* διατήρηση

Η *in situ* μέθοδος διατήρησης εστιάζει στην διαχείριση της γενετικής ποικιλομορφίας των βοοειδών εντός του πληθυσμού. Πιο συγκεκριμένα, καθώς το περιβάλλον υφίσταται διαρκώς μεταβολές, οι πληθυσμοί θα πρέπει να ανταποκρίνονται και να προσαρμόζονται σε αυτές (Bolaji et al., 2021). Για το λόγο αυτό η μέθοδος αυτή επιλέγεται, καθώς τα ζώα εξακολουθούν να ζουν στο φυσικό τους περιβάλλον και αναπτύσσουν μηχανισμούς αρμοστικότητας μέσω των πιέσεων της φυσικής επιλογής. Επάλληλα, με αυτόν τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα στους ερευνητές να παρατηρήσουν την ικανότητα ανταπόκρισης των υπό μελέτη φυλών σε συνθήκες όπως η ξηρασία και οι ασθένειες (Woolliams et al., 2008). Επιπλέον, βασικό άξονα για την επιτυχία της συγκεκριμένης μεθόδου

διατήρησης είναι η κατανόηση της αρχικής αιτίας που οδήγησε σε μείωση του πληθυσμού στη φύση, των βιολογικών περιορισμών του είδους, της τρέχουσας κατάστασης του πληθυσμού και το πως σε δεύτερο χρόνο θα μπορούσε να υλοποιηθεί η παρακολούθηση και αξιολόγησή του (Moloney et al., 2023).

1.9.2) *Ex situ* διατήρηση

1.9.2.i) *Ex situ in vivo* μέθοδος διατήρησης

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, έχουμε μία εφαρμογή διατήρησης χαμηλού σχετικά οικονομικού κόστους, στην οποία όμως τα ζώα των φυλών υπό διατήρηση μεταφέρονται εκτός του αρχικού περιβάλλοντος προσαρμογής τους. Συνολικά, η τεχνική αυτή, περιλαμβάνει την ταυτόχρονη διατήρηση των ζώντων οργανισμών (*in vivo*) και τη διατήρηση των αναπαραγωγικών τους ιδιοτήτων μέσω της συντήρησης των αναπαραγωγικών τους οργάνων με κρυοσυντήρηση (*in vitro*) (Bolaji et al., 2021).

1.9.2.ii) Μέθοδος κρυοσυντήρησης (Cryoconservation ή Cryopreservation)

Πρόκειται για μία τεχνική *ex situ* (*in vitro*) διατήρησης, όπου ο βασικός άξονας είναι η κρυοσυντήρηση γαμετών, ιστών γενετικών οργάνων, εμβρύων και σωματικών κυττάρων, διατηρώντας το γενετικό υλικό των οργανισμών ακόμα και μετά το θάνατό τους. Παράλληλα, δίνεται και η δυνατότητα μεταγενέστερης ανασύστασης των οργανισμών. Επιπλέον, προκειμένου να αποφευχθεί η ενδογαμία (*inbreeding*) σε έναν πληθυσμό, κρίνεται σημαντική η δημιουργία μιας γονιδιακής τράπεζας (**gene bank**), με μεγάλο αριθμό γονιδίων από αρσενικά και θηλυκά ζώα.

❖ Κρυοσυντήρηση σπέρματος:

Η κρυοσυντήρηση σπέρματος βοοειδών επιλέγεται λόγω της αφθονίας του συγκεκριμένου γαμέτη και την ευκολία εφαρμογής της μεθόδου. Το κατεψυγμένο σπέρμα αξιοποιείται για εφαρμογές εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF), καθώς και τεχνητής γονιμοποίησης (AI) σε έναν πληθυσμό, διατηρώντας με αυτό τον τρόπο τη γενετική ποικιλότητα. Όμως, λόγω της κατάψυξης και αφετέρου της απόψυξης για τη χρήση τους, τα σπερματοζωάρια υφίστανται φυσιολογικές και λειτουργικές βλάβες, και για το λόγο αυτό απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την ανάπτυξη μεθόδων προστασίας τους ενάντια στις ιδιαίτερα χαμηλές θερμοκρασίες (Bolaji et al., 2021).

❖ Κρυοσυντήρηση ωοκυττάρων:

Κατά τη συγκεκριμένη μέθοδο πραγματοποιείται συλλογή ωαρίων αγελάδων με διάφορους τρόπους όπως: παρακέντηση ωοθυλακίου, βιοψία ωοθηκών, ωοθηκεκτομή, και συγκέντρωση των ωοθηκών μετά το θάνατο του ζώου. Τα ωοκύτταρα που συλλέγονται, μπορούν να διατηρηθούν, να καταψυχθούν και να αξιοποιηθούν σε μεθόδους *in vitro* γονιμοποίησης (IVF).

Όμως, τα ωοκύτταρα καθίστανται ευαίσθητα στην ψύξη και δεν επιλέγονται στον ίδιο βαθμό για κρυοσυντήρηση συγκριτικά με τα σπερματοζωάρια και τα έμβρυα, που θα αναλυθούν στη συνέχεια. Αυτό συμβαίνει επειδή τα ωοκύτταρα έχουν χαμηλή αναλογία επιφάνειας προς όγκο και χαμηλό συντελεστή διαπερατότητας, γεγονός που παρεμποδίζει την ενδοκυτταρική διέλευση νερού και κρυοπροστατευτικών ουσιών (CPAs) (Bolaji et al., 2021).

❖ Κρυοσυντήρηση εμβρύων

Η κρυοσυντήρηση εμβρύων θεωρείται μία μέθοδος διατήρησης της ετεροζυγωτίας και της γενετικής ποικιλότητας σε έναν πληθυσμό. Για την αποκατάσταση ενός πληθυσμού χρειάζεται η διατήρηση μεγάλου αριθμού εμβρύων. Μάλιστα, τα έμβρυα των βοοειδών είναι πιο ανθεκτικά στην ψύξη συγκριτικά με εκείνα των χοίρων και των αλόγων.

Η πρώτη επιτυχημένη μεταφορά κατεψυγμένων εμβρύων βοοειδών σημειώθηκε το 1973.

Βέβαια, πειράματα κυοφορίας κρυοσυντηρημένων εμβρύων αγελάδων έδειξαν καλύτερα αποτελέσματα σε περιπτώσεις μεταφοράς εμβρύου (ET) από την τεχνητή γονιμοποίηση (AI). Επίσης, τα *in vitro* διατηρημένα έμβρυα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε συνθήκες θερμικού στρες συγκριτικά με τους γαμέτες, ενώ για τη γονιμοποίηση χρειάζεται μικρότερος αριθμός σπερματοζωαρίων.

Όμως, τα έμβρυα αυτά, φαίνεται να είναι ευαίσθητα στην ψύξη λόγω της συσσώρευσης λιπιδίων στα κύτταρά τους, τα οποία ενδεχομένως να οφείλονται στο μέσο καλλιέργειας, ενώ αναπτύσσονται στρατηγικές για την ανάπτυξη ανθεκτικότερων εμβρύων (Bolaji et al., 2021).

1.10) Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας είναι η γενετική ταυτοποίηση βοοειδών που ανήκουν στην προστατευόμενη Ελληνική Βραχυκερατική φυλή, με τη χρήση μοριακών δεικτών και συγκριτικά με το γονιδίωμα βοοειδών της φυλής Holstein. Συγκεκριμένα, οι μοριακοί δείκτες που μελετήσαμε είναι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) μιτοχονδριακού DNA και η κύρια μέθοδος ανάλυσης, είναι η HRM (High Resolution Melting analysis). Η σύγκριση των γονιδιωμάτων των δύο φυλών, θα οδηγήσει στην ανάπτυξη δεικτών ταυτοποίησής τους, προκειμένου να γίνει γενετικός διαχωρισμός των καθαρόαιμων βοοειδών της Βραχυκερατικής φυλής, γεγονός που θα βοηθήσει στην ανάπτυξη στρατηγικών διατήρησής και αύξησης του πληθυσμού τους.

2) Υλικά και Μέθοδοι

2.1) Αποσαφήνιση εξελικτικών σχέσεων των φυλών του *Bos taurus*

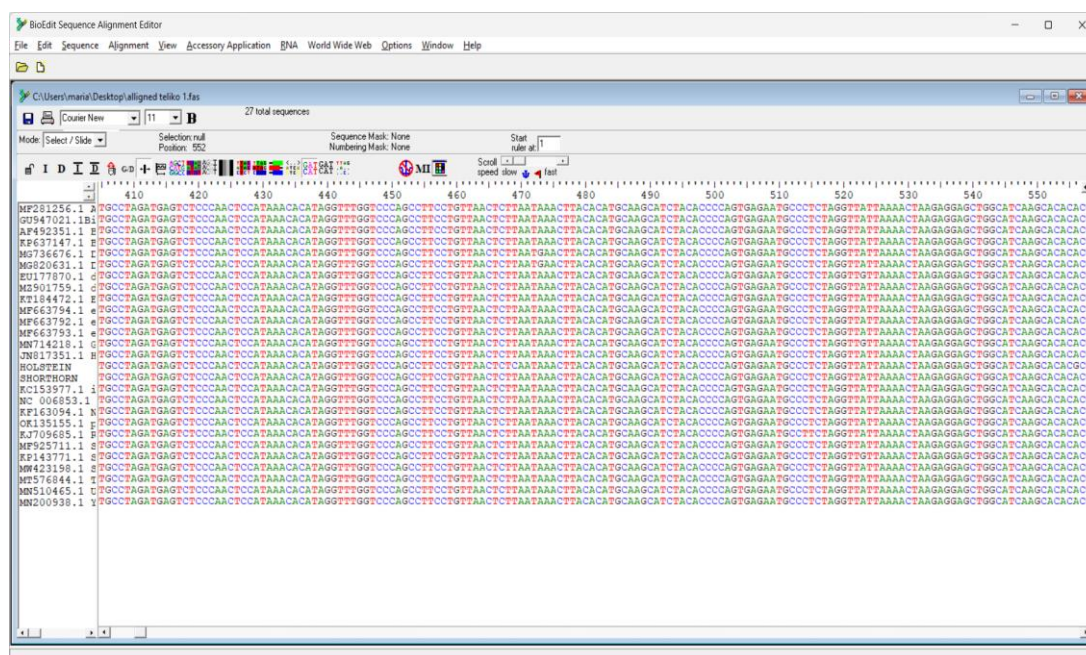
2.1.1) Αλληλουχίες μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων

Το πρώτο βήμα για τη διεκπεραίωση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας, ήταν η εύρεση των μιτοχονδριακών αλληλουχιών των διάφορων φυλών αγελάδων του είδους *Bos taurus*. Αρχικά, δόθηκε η πρότυπη αλληλουχία του μιτοχονδριακού DNA της φυλής Holstein, η οποία είχε βρεθεί προηγουμένως στη βάση δεδομένων ensembl (<https://www.ensembl.org/>) (accession number: NC_006853.1), καθώς και η αλληλουχία του μιτοχονδριακού DNA της Ελληνικής Βραχυκερατικής φυλής.

Ακολουθώντας, χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), ορίζεται στη μπάρα αναζήτησης το *Bos taurus* mitochondrial DNA, και από τα αποτελέσματα επιλέγεται από τη στήλη genomes το nucleotide. Αμέσως μετά, ορίζεται το μήκος της αλληλουχίας από 15000 έως 30000 και από τις σελίδες που προκύπτουν μετά την αναζήτηση επιλέγονται οι αλληλουχίες των διάφορων φυλών βοοειδών σύμφωνα με το accession number τους, οι οποίες και αποθηκεύονται σε αρχείο με τη μορφή FASTA.

2.1.2) Στοιχισμός γονιδιωμάτων

Στη συνέχεια, με τη βοήθεια του προγράμματος BioEdit version 7.2.5, έγινε στοιχισμός των αλληλουχιών με την επιλογή Alignment, και αποθηκεύτηκε το αρχείο.



Εικόνα 7: Alignment των αλληλουχιών mtDNA των διάφορων φυλών

2.1.3) Φυλογενετική ανάλυση

Το επόμενο βήμα ήταν η χρησιμοποίηση του αρχείου με τη στοίχιση των γονιδιωμάτων προκειμένου να πραγματοποιηθεί φυλογενετική ανάλυση και να γνωστοποιηθεί η εξελικτική και γενετική σχέση μεταξύ των φυλών του *Bos taurus* και να προσδιοριστούν οι εξελικτικές σχέσεις των δύο φυλών (Βραχυκερατικής και Holstein). Ειδικότερα, σήμερα για τις περισσότερες φυλογενετικές αναλύσεις, επιλέγεται η μέθοδος των bootstraps και το πρόγραμμα ανάλυσης δεδομένων MEGA. Ουσιαστικά, η μέθοδος αυτή, αποτελεί μια διαδικασία επανάληψης κύκλων δειγματοληψίας, έτσι ώστε σε κάθε κύκλο να δημιουργείται ένα αντίγραφο της στοίχισης. Για το λόγο αυτό, για κάθε αντίγραφο αφαιρούνται ορισμένες τοποθεσίες από την αρχική στοίχιση, ενώ άλλες αποτελούν αντικείμενο δειγματοληψίας για παραπάνω από μία φορές. Έτσι, δημιουργείται ένα δέντρο αντιγραφής για κάθε αντίγραφο της στοίχισης. Επίσης, σε κάθε φυλογενετικό δέντρο οι τιμές bootstrap οι οποίες αναγράφονται σε κάθε κλάδο, εκφράζουν την αναλογία των δέντρων που αντιγράφηκαν γι' αυτόν, ενώ ο αριθμός των επαναλήψεων σχετίζεται με την ακρίβεια της δοκιμής, δηλαδή το βαθμό που οι τιμές bootstrap, που αντιστοιχούν σε έναν αριθμό πεπερασμένων επαναλήψεων ταυτίζεται με τις αντίστοιχες τιμές που προκύπτουν στην περίπτωση των άπειρων επαναλήψεων (De Moraes Russo & Selvatti, 2018).

Παράλληλα, για να υλοποιηθεί η εξαγωγή των φυλογενετικών δέντρων στο πρόγραμμα MEGA version 11, όπου και χρησιμοποιήσαμε, επιλέγονται δύο κύριες μέθοδοι: εκείνες που σχετίζονται με την απόσταση, όπως η Neighbor Joining (NJ), και σε εκείνες που βασίζονται σε χαρακτηριστικά, με κυριότερη τη Maximum Likelihood (ML). Στη συγκεκριμένη περίπτωση επιλέχθηκε η μέθοδος ML, καθώς ακολουθεί στατιστική ακρίβεια και αξιοποιεί πλήρως τα αρχικά δεδομένα (Zou et al., 2024).

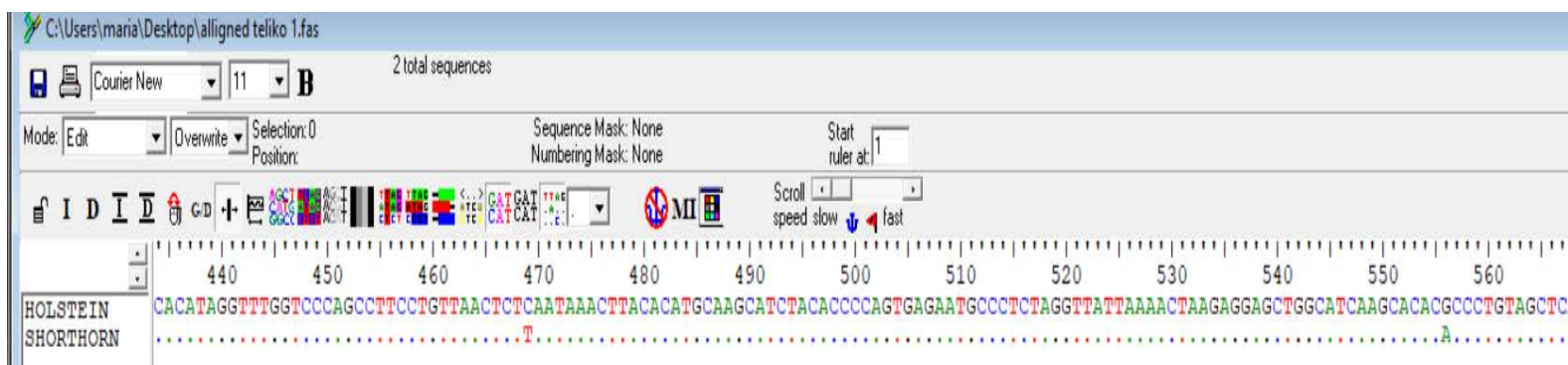
Στην παρούσα εργασία λοιπόν, αρχικά εισήχθη στο MEGA το αρχείο με την στοίχιση των γονιδιωμάτων και επιλέχθηκε για ανάλυση η συντηρημένη περιοχή μεταξύ τους, όπου υπάρχουν καλύτερα αποτελέσματα στοίχισης. Μετά, από την επιλογή Models → Find best DNA/ protein model (ML), από τη λίστα αποτελεσμάτων, επιλέχθηκε το μοντέλο με τη μικρότερη τιμή στη λίστα των παραμέτρων, καθώς θεωρείται το πιο αξιόπιστο. Έτσι, η καλύτερη επιλογή ήταν το μοντέλο HKY+G. Ακολούθως, επιλέχθηκε το εξής: Phylogeny → Construct/ Test Maximum Likelihood tree και ορίστηκε για επεξεργασία το ήδη υπάρχον αρχείο, ενώ έπειτα τέθηκαν στο παράθυρο M11 Analysis Preferences οι παράμετροι που επιλέξαμε, που αφορούν τη μέθοδο Bootstrap, καθώς και το μοντέλο κατασκευής του φυλογενετικού δέντρου. Έτσι, κατασκευάστηκε το επιθυμητό ML tree, στο οποίο θέσαμε ως ρίζα το είδος *Bos premigenius* ως τον κοινό πρόγονο των υπό

μελέτη φυλών, με στόχο την εξακρίβωση της εξελικτικής και συγγενικής σχέσης τους.

2.2) Μοριακές αναλύσεις για τον διαχωρισμό των φυλών

2.2.1) Εντοπισμός πολυμορφικών θέσεων (SNPs)

Με τη στοίχιση των αλληλουχιών όλων των φυλών που εντοπίστηκαν, παρατηρείται μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των φυλών Holstein, Red Mountain cattle και Ελληνική Βραχυκερατική. Ωστόσο, για την εύρεση των πολυμορφισμών, επιλέγονται μόνο οι φυλές για τις οποίες έχει πραγματοποιηθεί δειγματοληψία, όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια, δηλαδή οι φυλές Holstein και η Ελληνική Βραχυκερατική. Οι δύο αλληλουχίες αποθηκεύονται σε διαφορετικό αρχείο και ακολουθεί η εύρεση των θέσεων όπου σημειώνεται διαφορετική νουκλεοτιδική βάση μεταξύ των δύο γονιδιωμάτων, δηλαδή μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (SNP).



Εικόνα 8: Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στις θέσεις 469 και 556

2.2.2) Γενετική ταυτοποίηση SNPs

Έχοντας εντοπίσει τις θέσεις μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών μεταξύ των δύο φυλών, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Πιο συγκεκριμένα, στην επιλογή Nucleotide Blast, εισάγεται σε μορφή FASTA το ολικό mtDNA του είδους *Bos taurus*, επιλέγεται το Alignments και ακολούθως το GenBank και εμφανίζεται μία λίστα με το είδος το γενετικού τόπου που αντιστοιχεί στα διάφορα τμήματα της

αλληλουχίας του mtDNA. Επομένως, έχοντας εντοπίσει τις θέσεις των SNPs προηγουμένως, έγινε εύρεση του γονιδίου στο οποίο σημειώνεται η πολυμορφική θέση.

The screenshot displays a GenBank BLAST report. The top section shows the query sequence and its alignment with the reference sequence. The reference sequence is identified as 'COX1' (cytochrome c oxidase subunit I) from the mitochondrial genome of *Canis lupus familiaris*. The alignment shows a high degree of similarity between the query and the reference sequence. The bottom section shows the alignment of the query sequence with the reference sequence for 'COX2' (cytochrome c oxidase subunit II). The alignment shows a high degree of similarity between the query and the reference sequence.

Εικόνα 9: Παράδειγμα γονιδίων που εμφανίζουν πολυμορφικές θέσεις

Έτσι, τα γονίδια στα οποία εμφανίζονται SNPs, είναι: γονίδια που κωδικοποιούν *rRNA*, γονίδια *ND1*, *ND2*, *ND4*, *ND5*, *ATP8*, *COX1* και *COX2*, καθώς και γονίδια *CYTb*. Τα γονίδια *ND1*, *ND2*, *ND4* και *ND5*, κωδικοποιούν για πρωτεΐνες της υπομονάδας της αφυδρογονάσης NADH. Το γονίδιο *ATP8*, κωδικοποιεί για υπομονάδα της ATP συνθάσης, ενώ τα γονίδια *COX1* και *COX2*, αποτελούν γονίδια των υπομονάδων του ενζύμου COX της κυτοχρωμικής οξειδάσης c (Τιμόν-Γόμεζ et al., 2018). Το γονίδιο *CYTb*, του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος b, κατέχει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά ηλεκτρονίων και χρησιμοποιείται σε φυλογενετικές αναλύσεις.

Από τις παραπάνω κατηγορίες γονιδίων, επιλέχθηκε ένας μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός για κάθε μια, για το σχηματισμό των εκκινητών (primers).

Γονίδια	SNP
<i>rRNA</i>	556
<i>rRNA</i>	1608
<i>ND1</i>	3350
<i>ND2</i>	4883
<i>COX1</i>	5727
<i>COX1</i>	5763
<i>COX2</i>	7955
<i>COX2</i>	8003
<i>ND4</i>	11242
<i>ND5</i>	12535
<i>CYTb</i>	14528

Πίνακας 1: Οι πολυμορφικές θέσεις που επιλέχθηκαν για κάθε γονίδιο

2.3) Σχεδιασμός εκκινητών

Το επόμενο βήμα που αποτελεί βασική προϋπόθεση για την εφαρμογή της HRM, της βασικής μεθόδου ανάλυσης που χρησιμοποιήσαμε όπως θα δούμε στη συνέχεια, ήταν ο σχεδιασμός των εκκινητών. Επί της ουσίας, οι εκκινητές θα πρέπει να ενισχύουν την περιοχή του γονιδιώματος που μας ενδιαφέρει, δηλαδή τις θέσεις εκείνες στις οποίες περιλαμβάνονται οι πολυμορφισμοί που εντοπίσαμε.

Για το σχεδιασμό των primers λοιπόν, χρησιμοποιήσαμε τα προγράμματα primer 3 (<https://primer3.ut.ee/>), Beacon designer ([Beacon Designer Free Edition \(premierbiosoft.com\)](https://www.beacondesignerfreeedition.com/)) και Primer Blast ([Primer designing tool \(nih.gov\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία του εγχειριδίου χρήσης των μεθόδων PCR και HRM, © 2009 QIAGEN (Type-it HRM PCR Handbook 07/2009), οι εκκινητές οι οποίοι θα ενισχύσουν το προϊόν στην HRM, θα πρέπει να έχουν μήκος 18-30 νουκλεοτίδια, καθώς όσο μεγαλώνει η περιοχή ενίσχυσης, συσσωρεύονται μεταλλάξεις, ενώ το ποσοστό το βάσεων GC, θα πρέπει να είναι 40–60%, και να αποφεύγεται να βρίσκεται σε μεγάλο βαθμό στο 3' άκρο (όχι 3 ή περισσότερες βάσεις G,C). Επιπλέον, η θερμοκρασία τήξης (T_m), δηλαδή η θερμοκρασία όπου έχει υλοποιηθεί κατά το ήμισυ αποδιάταξη του DNA, και υπολογίζεται από τον τύπο $T_m = 2^{\circ}\text{C} \times (\text{αριθμός [A+T]}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{αριθμός [G+C]})$, θα πρέπει να έχει τουλάχιστον την τιμή 56°C, ενώ ιδανική περίπτωση θεωρείται ο σχεδιασμός ζευγών εκκινητών με παρόμοια τιμή T_m . Επάλληλα, κατά το σχεδιασμό, θα πρέπει να αποφεύγεται η ύπαρξη 2 ή 3 συμπληρωματικών βάσεων στο 3' άκρο του εκκινητή, ώστε να μη σχηματίζονται διμερή, καθώς και οι συμπληρωματικές αλληλουχίες εντός και μεταξύ των ζευγών primers, προς αποφυγή της δημιουργίας δομών φουρκέτας (hairpin).

Έτσι, σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, αρχικά στη βάση δεδομένων primer 3, αφού έγινε εισαγωγή της αλληλουχίας ενδιαφέροντος, ορίστηκαν κάποιες παράμετροι προς σχηματισμό πιθανών εκκινητών. Συγκεκριμένα:

- Ποσοστό βάσεων GC: 60%
- Μέγεθος προϊόντος: 80-150
- Tm: 60 °C
- Μέγεθος εκκινητών: 18-25 νουκλεοτίδια

Στη συνέχεια, αφότου σχεδιάστηκαν ζεύγη εκκινητών που πιθανώς να αποτελούν τους αποδεκτούς primers, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα primer Blast ([Primer designing tool \(nih.gov\)](http://primerdesigningtool.nih.gov)), όπου θέτοντας τις παραμέτρους που αναφέρθηκαν και ορίζοντας ως είδος το *Bos taurus*, πραγματοποιήθηκε ξανά σχεδιασμός εκκινητών, προκειμένου να έχουμε μεγαλύτερο αριθμό επιλογών.

Ακολούθως, αξιοποιώντας το Beacon designer, από τη σελίδα Oligo Analysis και την επιλογή SYBR Green, έγινε εισαγωγή των ζευγών εκκινητών που σχεδιάστηκαν προηγουμένως και πραγματοποιήθηκε έλεγχός τους για την παρουσία διμερών και δομών φουρκέτας, ώστε να επιλεχθούν οι βέλτιστοι primers.

Τέλος, έγινε χρήση της βάσης δεδομένων *In silico* PCR (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>), όπου επιλέγοντας τον οργανισμό και τον κωδικό Assembly, γίνεται έλεγχος των primer που επιλέχθηκαν, εισάγοντας την αλληλουχία τους. Το αποτέλεσμα της αναζήτησης είναι η περιοχή υβριδισμού του εκάστοτε ζεύγους εκκινητών σε μορφή FASTA, καθώς επίσης και το χρωμόσωμα στο οποίο βρίσκεται. Έτσι, δίνεται επιβεβαίωση για το αν τα ζεύγη των εκκινητών που σχεδιάστηκαν είναι τα κατάλληλα για τη μελέτη των επιθυμητών πολυμορφισμών.

Συνεπώς, σύμφωνα με τις παραπάνω αναζητήσεις τα ζεύγη των primer που επιλέχθηκαν είναι τα ακόλουθα:

SNP	Primer
556	Forward: CATGCAAGCATCTACACCCC Reverse: GTTAAGCAAGGCGTCGTGAG
1608	Forward: AGTACCGCAAGGGAACGATG Reverse: TCTGGTTTCGGGCTGCTTAG
3350	Forward: GAACCACTACGACCCGCTAC Reverse: ACGGCTAGGCTTGATATGGC
4883	Forward: AGCCTACTCATCAATCGCTCA Reverse: ACAGGGTAGTGGTGGTGGAA
5727,5763	Forward: CATTAACCGCTGACTATTCTC Reverse: CGTCTCCGAGCAGAGTTCCG
7955, 8003	Forward: GGACTAAAAACAGACGCAATCC Reverse: AGTGGGACTAACTCAAGGACA
11242	Forward: CTCACGTAGAAGCCCCCATC Reverse: ATTCGTAGCATACCGTACCCC
12535	Forward: GCTCATCCTTGTAACCGCAA Reverse: TGTGTTTGCATCTGCTCGTC
14528	Forward: TGAAAAACCATCGTTGTCATTCA Reverse: TTTGATGGGGCTGGAAGGTC

Πίνακας 2: Οι αλληλουχίες των εκκινήτων που επιλέχθηκαν για τους αντίστοιχους πολυμορφισμούς

2.4) Δείγματα

Για τη διεκπεραίωση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία αίματος σε καθαρόαιμα βοοειδή της Ελληνικής Βραχυκερατικής φυλής από τον Κλεινοβό Τρικάλων, από όπου συγκεντρώθηκαν συνολικά 38 δείγματα. Παράλληλα, προκειμένου να γίνει η γονιδιωματική σύγκριση, χρησιμοποιήθηκαν και 35 δείγματα DNA από αγελάδες της φυλής Holstein, τα οποία είχαν προηγουμένως απομονωθεί από τα αντίστοιχα δείγματα αίματος των αγελάδων από τα μέλη του εργαστηρίου «Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας».

2.4.1) Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA από τα δείγματα των αγελάδων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του kit «PureLink Genomic DNA kit» της εταιρίας Invitrogen, με το πρωτόκολλο του εγχειρίδιου και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.4.2) Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA

Μετά το πέρας της απομόνωσης του DNA, σειρά είχε η ποιοτική ανάλυσή του, η οποία πραγματοποιήθηκε μέσω της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Γενικά, η ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης, αποτελεί την πιο αποτελεσματική μέθοδο διαχωρισμού θραυσμάτων DNA διαφορετικών μεγεθών. Η αγαρόζη προέρχεται από 2 είδη φυκιών: *Gelidium* και *Gracilaria*, ενώ περιέχει επαναλαμβανόμενες υπομονάδες L και D γαλακτόζης. Για την πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση, το DNA φορτώνεται σε «πηγαδάκια» στο gel της αγαρόζης υπό την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος και λόγω του γεγονότος ότι το DNA αποτελεί ένα αρνητικά φορτισμένο μόριο μετακινείται από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Ο ρυθμός μετακίνησης του μορίου DNA εντός του πηκτώματος, εξαρτάται από το μέγεθός του, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, την τάση του ηλεκτρικού ρεύματος που ασκείται, καθώς και από την παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου. Όταν ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός, πραγματοποιείται οπτικοποίηση των μορίων σε υπεριώδες φως υπό κατάλληλη χρώση (Lee et al., 2012).

Έτσι λοιπόν, για το συγκεκριμένο πείραμα:

Υλικά:
• 0,5 gr αγαρόζης σε σκόνη
• 50 ml TAE 1X
• 4 μL χρωστικής Xpert Green
• Διάλυμα φόρτωσης (χρωστική ουσία και DNA)

Πίνακας 3: Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν (για gel αγαρόζης 1%)

Μεθοδολογία:

Το πρώτο στάδιο για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA, ήταν η παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης. Για το σκοπό αυτό, ζυγίστηκαν 0,5 gr αγαρόζης σε σκόνη και τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη, στην οποία αμέσως μετά προστέθηκαν 50 ml TAE με συγκέντρωση 1X. Το μείγμα στη συνέχεια θερμάνθηκε με ταυτόχρονη ανάδευση έως ότου να διαλυθεί όλη η ποσότητα της αγαρόζης και να δημιουργηθεί ένα διαυγές διάλυμα. Η κωνική φιάλη έπειτα ψύχθηκε με τη βοήθεια νερού, ενώ ταυτόχρονα αναδευόταν διαρκώς προκειμένου να μην αρχίσει η πήξη του δείγματος πριν την τοποθέτησή του στο εκμαγείο, και ακολούθως με τη βοήθεια πιπέτας εισήχθησαν 4 μL χρωστικής Xpert Green (η οποία αντικατέστησε το βρωμιούχο αιθίδιο). Στο σημείο αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα μικρό εκμαγείο το οποίο προηγουμένως είχε τυλιχθεί περιμετρικά με διηθητική ταινία, ώστε να αποφευχθεί η διαρροή του μείγματος πριν πήξει. Αφού το περιεχόμενο της φιάλης

εισήχθη στο εκμαγείο, τοποθετήθηκαν σ αυτό ειδικά «χτενάνια» με σκοπό να σχηματιστούν στο gel τα πηγαδάκια στα οποία γίνεται η φόρτωση του δείγματος ηλεκτροφόρησης. Έτσι, το εκμαγείο αφέθηκε στον πάγκο για 15 περίπου λεπτά, μέχρι τη σταθεροποίησή του πηκτώματος, και έπειτα αφαιρέθηκαν η ταινία και τα «χτενάνια», και το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Μέσα στη συσκευή αυτή, η οποία τροφοδοτείται από ηλεκτρικό ρεύμα, το gel θα έπρεπε να καλύπτεται από TAE 1X, ώστε να δράσει το ηλεκτρικό πεδίο και να γίνει η μετακίνηση του DNA.

Στη συνέχεια, φορτώθηκαν 5 μ L δείγματος DNA και 3 μ L χρωστικής ουσίας, η οποία αξιοποιήθηκε για την παρακολούθηση του DNA όσο «τρέχει» στο πήκτωμα καθώς και στη συσκευή UV. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης ρυθμίστηκε σε ένταση 100 V, και μετά το πέρας 15 λεπτών περίπου, αφότου το δείγμα «έτρεξε» αρκετά, το πήκτωμα απομακρύνθηκε και τοποθετήθηκε στη συσκευή υπεριώδους φωτός.

2.4.3) Ποσοτική ανάλυση δειγμάτων

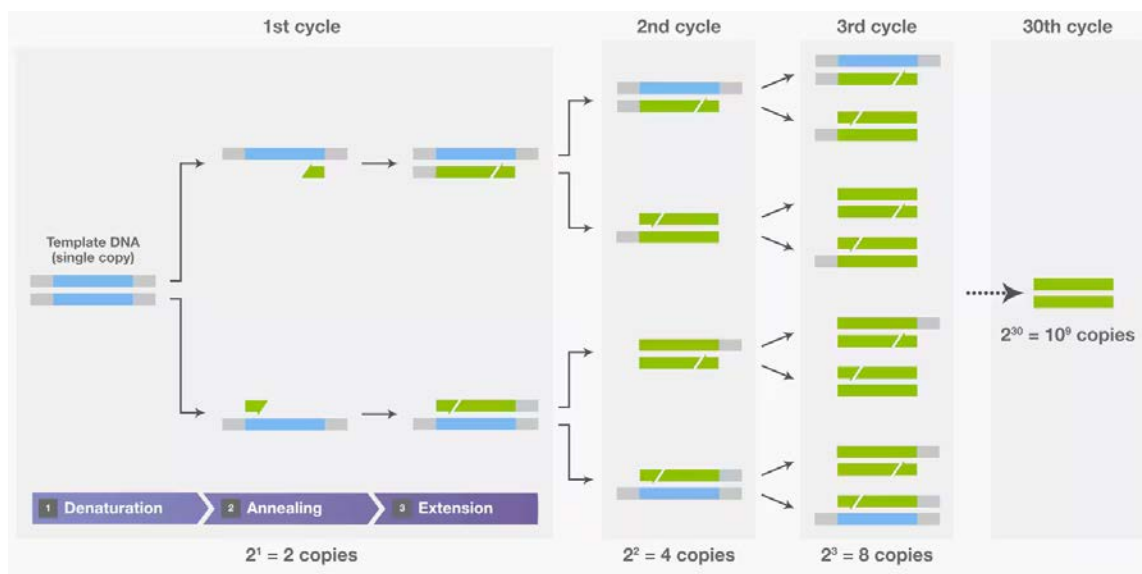
Μετά την ποιοτική αξιολόγηση των δειγμάτων DNA, σειρά είχε η ποσοτική τους ανάλυση με μέτρηση των συγκεντρώσεών τους. Αυτό επιτεύχθηκε μέσω μέτρησης φθορισμού με τη χρήση του kit Qubit της εταιρίας ThermoFisher, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που δόθηκε.

2.5) PCR - Έλεγχος εκκινήτων

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR (Polymerase Chain Reaction), αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές εφαρμογές της Μοριακής Βιολογίας, η οποία προτάθηκε ως μοριακό εργαλείο για την ενίσχυση του DNA από τον Kary Mullis το 1983.

Η PCR αποτελεί μία διαδικασία 3 σταδίων. Πιο αναλυτικά, το πρώτο βήμα είναι η αποδιάταξη του DNA κατά την οποία οι 2 κλώνοι του μορίου θερμαίνονται με αποτέλεσμα να σπάσουν οι μεταξύ τους νουκλεοτιδικοί δεσμοί και να διαχωριστούν, με στόχο τη δημιουργία μονόκλωνου DNA. Το δεύτερο στάδιο της αντίδρασης είναι ο υβριδισμός των κλώνων από τους εκκινήτες, η θερμοκρασία του οποίου καθορίζεται από τη θερμοκρασία τήξης των primers. Το τρίτο στάδιο, λοιπόν, είναι η επέκταση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας, μία αντίδραση η οποία καταλύεται από το ένζυμο Taq polymerase, το οποίο επεκτείνει το άκρο 3' κάθε εκκινήτη κατά μήκος των κλώνων του εκμαγείου, προσθέτοντας συμπληρωματικά νουκλεοτίδια. Οι κύκλοι της PCR είναι συνήθως 25-35, προκειμένου να

παραχθούν εκθετικά ακριβή αντίγραφα του μορίου DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε (Delidow et al., 2003), (Εικόνα 10)



Εικόνα 10: Τα 3 στάδια της αντίδρασης PCR ([PCR Basics | Thermo Fisher Scientific - GR](#)).

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την αντίδραση PCR στο συγκεκριμένο πείραμα είναι το εξής:

Αντιδραστήρια για master mix	Όγκος V (μL)
Buffer (TaqA)	5
MgCl ₂	1
dNTPs	1
Forward primer	0,5
Reverse primer	0,5
H ₂ O	38
Taq polymerase	0,2

Πίνακας 4: Αντιδραστήρια PCR master mix

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 μL, όπου μετά την παρασκευή του master mix προστέθηκαν σε Eppendorf 4 μL DNA (αφότου

πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες αραιώσεις με βάση τις τιμές των συγκεντρώσεων των δειγμάτων) και 46 μL mix.

Το τελικό διάλυμα εισήχθη σε ειδικό μηχάνημα για αντίδραση υπό τις εξής συνθήκες:

Συνθήκες αντίδρασης:	
Αρχική αποδιάταξη	95°C για 4 λεπτά
Αποδιάταξη	95 °C για 30 δευτερόλεπτα
Υβριδισμός	54 °C για 30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72 °C για 20 δευτερόλεπτα
Τελική επιμήκυνση	72 °C για 10 λεπτά
Αποθήκευση	4 °C για ∞

Πίνακας 5: Επιλεγμένες συνθήκες αντίδρασης PCR

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης, και μέσω της οπτικοποίησης με τη χρήση υπεριώδους φωτός, ελέγχθηκε εάν οι εκκινητές ενίσχυαν το επιθυμητό προϊόν.

2.6) HRM (High Resolution Melting Analysis)

Η μέθοδος ανάλυσης με τήξη υψηλής ανάλυσης HRM (High Resolution Melting analysis), αποτελεί μία απλή, γρήγορη και οικονομική τεχνική, οποία βασίζεται στη θεωρία της PCR και χρησιμοποιείται συνήθως σε μελέτες πληθυσμιακής γενετικής για την εύρεση της γενετικής ποικιλότητας μεταξύ των πληθυσμών, για την εύρεση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs), καθώς και για γονοτύπηση (Kim et al., 2023).

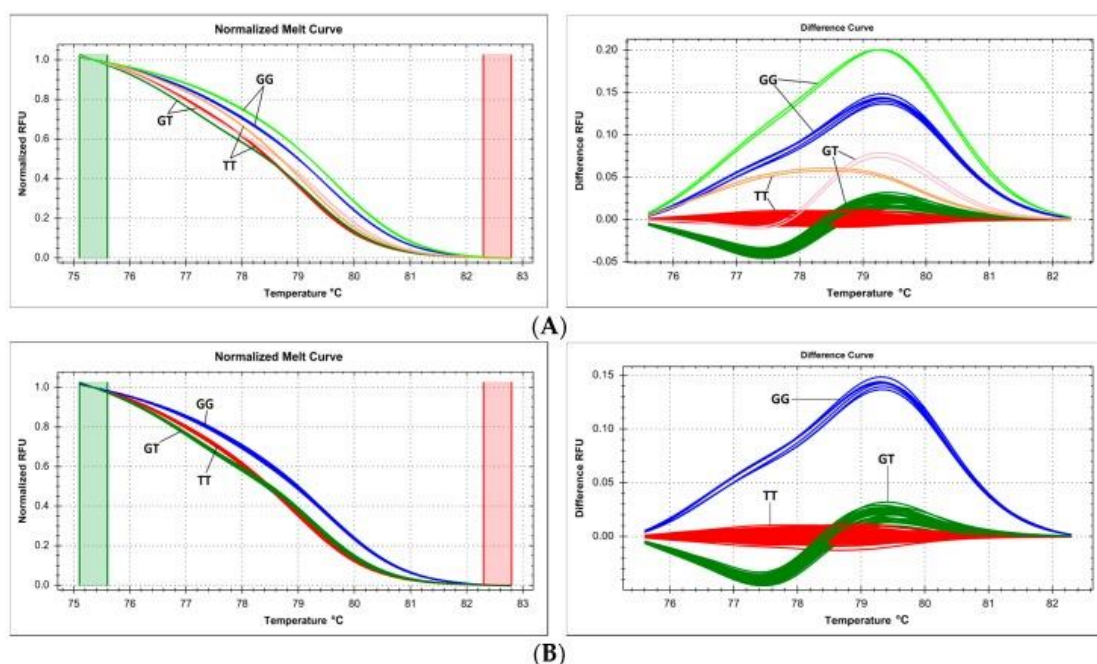
Η HRM, χαρακτηρίζει τα δείγματα με βάση το ποσοστό βάσεων GC που περιέχουν, το μέγεθος της αλληλουχίας τους και την ικανότητά τους αποδιάταξης υπό αύξηση της θερμοκρασίας, καθώς το δίκλωνο μόριο μετατρέπεται σε μονόκλωνο.

Πριν την εφαρμογή της μεθόδου, η αλληλουχία στόχος ενισχύεται παρουσία της φθορίζουσας χρωστικής EvaGreen, η οποία δεσμεύεται στο δίκλωνο DNA, όπου και φθορίζει έντονα. Η αλλαγή στο φθορισμό, μπορεί να αξιοποιηθεί για την απευθείας μέτρηση της τήξης του DNA. Επιπλέον, κατά τη διεξαγωγή της HRM η θερμοκρασία αυξάνεται από χαμηλότερες σε υψηλότερες τιμές, κι έτσι μετράται ο φθορισμός της EvaGreen. Συγκεκριμένα, η χρωστική φθορίζει διαρκώς όσο παραμένει δεσμευμένη στο δίκλωνο μόριο και ο φθορισμός είναι πιο έντονος κατά

την έναρξη της αντίδρασης. Όταν γίνει η τήξη του δίκλωνου DNA, η χρωστική απελευθερώνεται και ο φθορισμός μειώνεται. Μάλιστα, η φθορίζουσα αυτή ουσία, εμφανίζει μέγιστη εκπομπή στα 530 nm, και σε αντίθεση με τη χρωστική SYBR Green I που χρησιμοποιείται στην qPCR που θα αναφερθεί στη συνέχεια, έχει την ικανότητα να συνδέεται τόσο σε περιοχές πλούσιες σε G/C όσο και σε A/T, στον ίδιο βαθμό, γεγονός που δικαιολογεί και την επιλογή της για φθορισμό στην τεχνική αυτή (QIAGEN, 2009).

Επιπρόσθετα, λόγω της μετουσίωσής του DNA, δημιουργούνται καμπύλες τήξης, μέσα από τις οποίες μπορεί να γίνει ο διαχωρισμός ανάμεσα στα «wild type», τα ομόζυγα και ετερόζυγα δείγματα που επιλέγονται, λόγω του φθορισμού που είναι πιο έντονος πριν την αποδιάταξη των 2 κλώνων του μορίου (Er et al, 2012).

Ουσιαστικά, το αποτέλεσμα της HRM που μας ενδιαφέρει για την ανάλυση είναι η καμπύλη τήξης (melt curve), που φαίνεται η σχέση θερμοκρασίας-φθορισμού, καθώς και η καμπύλη ενίσχυσης έπειτα από κανονικοποίηση, η οποία απεικονίζει το φθορισμό αναλογικά με τον κύκλο της αντίδρασης, και από την οποία προκύπτουν οι διαφορετικοί γονότυποι των δειγμάτων (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Παραδείγματα καμπύλης τήξης και καμπύλης ενίσχυσης μετά από κανονικοποίηση (Stomka et al., 2017)

Για την πραγματοποίηση του πειράματός μας, χρησιμοποιήσαμε το kit «Type-it HRM PCR Kit» της εταιρείας QIAGEN. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 20 μ L. Έτσι στα PCR Eppendorf, προσθέσαμε 1,5 μ L από τα δείγματα στα οποία

προηγούμενως είχαμε κανονικοποιήσει τις συγκεντρώσεις όπως αναφέρθηκε προηγούμενως, και 18,5 μL HRM Master Mix, το οποίο παρασκευάστηκε ως εξής:

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)
Buffer	10
Forward primer	0,7
Reverse primer	0,7
H ₂ O	7,1

Πίνακας 6: Αντιδραστήρια για τη σύνθεση του HRM Master Mix

Το HRM Master Mix που χρησιμοποιήσαμε, περιείχε ως συστατικά τα ακόλουθα:

HotStarTaq Plus DNA Polymerase, Type-it HRM PCR Buffer, Q-Solution, και dNTPs.

Η HotStarTaq Plus DNA Polymerase, αποτελεί ένα ένζυμο που αρχικά δεν είναι ενεργό σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να μη σχηματιστούν προϊόντα διμερών, ενώ ενεργοποιείται στο πρώτο στάδιο της αντίδρασης στους 95 °C για 5 λεπτά.

Έπειτα, τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο μηχάνημα Rotor-Gene, όπου επιλέχθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες για την αντίδραση.

Συνθήκες HRM	
Αρχικό στάδιο της αντίδρασης, όπου ενεργοποιείται η HotStarTaq Plus DNA Polymerase	95°C για 5 λεπτά
Κύκλοι 3 σταδίων (συνολικά 40 κύκλοι) - Αποδιάταξη του DNA - Υβριδισμός εκκινητών - Επιμήκυνση DNA	95 °C για 10 sec 55 °C για 30 sec 72 °C για 10 sec
Αντίδραση HRM	65–95°C, αύξηση θερμοκρασίας 0.1°C, διάρκεια σταδίου 2 sec

Πίνακας 7: Συνθήκες αντίδρασης HRM (QIAGEN, 2009).

2.7) Προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων προς αλληλούχιση

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης HRM, από τις καμπύλες ενίσχυσης επιλέχθηκαν τα πρότυπα διαλύματα που εκφράζουν τους διαφορετικούς γονοτύπους για κάθε primer. Στη συνέχεια, τα δείγματα αυτά ενισχύθηκαν με Real Time PCR (qPCR), με στόχο τη βέλτιστη ποιότητα DNA στη μετέπειτα αλληλούχισή τους.

2.7.1) qPCR

Η βασική διαφορά της qPCR με τη συμβατική PCR, είναι ότι η πρώτη μας δίνει τη δυνατότητα να εντοπίσουμε γρήγορα και σε πραγματικό χρόνο τις περιοχές-στόχους, μέσω του ελέγχου με εκκινητές και φθορίζουσες ουσίες (Jalali et al., 2017)

Η κύρια φθορίζουσα ουσία που χρησιμοποιείται είναι η SYBR GREEN I, η οποία έχει μεγαλύτερη απόδοση όταν προσδένεται σε δίκλωνο DNA.

Στο σημείο αυτό επιλέξαμε να ακολουθήσουμε πρωτόκολλο για double Real Time PCR, δηλαδή να παρασκευάσουμε ποσότητα master mix για διπλάσια ποσότητα δειγμάτων από αυτή που είχαμε. Αυτό, συνέβη γιατί θέλαμε ο κάθε γονότυπος ουσιαστικά να ενισχυθεί 2 φορές και μέσω της σύγκρισης των καμπυλών ενίσχυσης να ελέγξουμε την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Δηλαδή, οι 2 καμπύλες για το ίδιο δείγμα θα πρέπει να είναι όσο πιο κοντινές μεταξύ τους γίνεται.

Έτσι το πρωτόκολλο που επιλέχθηκε είναι το παρακάτω:

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)
SYBR GREEN I	10
Forward primer	0,6
Reverse primer	0,6
H ₂ O	7,3

Πίνακας 8: Αντιδραστήρια για την παρασκευή master mix για double qPCR.

Η παραπάνω ποσότητες πολλαπλασιάστηκαν με το διπλάσιο αριθμό δειγμάτων που επιλέχθηκαν και κάθε PCR Eppendorf, είχε 1,5 μL DNA και 18,5 μl master mix.

2.7.2) Καθαρισμός δειγμάτων DNA

Το τελευταίο βήμα πριν την αλληλούχιση του γονιδιώματος των δειγμάτων, ήταν ο καθαρισμός τους από τυχόν παραπροϊόντα της qPCR ή των εκκινητών. Για το

σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε το kit SureClean Plus από την εταιρία meridian Bioscience. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα παρακάτω:

- Αρχικά, ενώσαμε το περιεχόμενο των 2 αντιγράφων qPCR κάθε πρότυπου δείγματος σε ένα νέο Eppendorf (0,5 μL)
- Ακολούθησε προσθήκη 6 μL χρωστικής Co-Precipitant Pink, που θα βοηθήσει στην οπτικοποίηση των pellets που σχηματίστηκαν στη συνέχεια.
- Αμέσως μετά έγινε ανάδευση με vortex για 30 sec
- Έπειτα σειρά είχε η προσθήκη 50 μL από το Buffer SureClean Plus, το οποίο απομακρύνει από το διάλυμα πρωτεΐνες, primers, διμερή primer, καθώς και dNTPs, και έγινε ανάδευση.
- Κατόπιν ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 14.000 g για 10 min, αφότου τα διαλύματα είχαν αφεθεί για 10 min στον πάγκο προηγουμένως.
- Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο με τη βοήθεια πιπέτας και έγινε προσθήκη 100 μL διαλύματος αιθανόλης,
- Ύστερα από vortex 10 sec, σημειώθηκε φυγοκέντρηση σε 14.000 g για 10 min.
- Στο επόμενο βήμα, η αιθανόλη αφαιρέθηκε με πιπέτα και τα Eppendorf παρέμειναν στον πάγκο με ανοιχτά καπάκια έως ότου εξατμιστούν τα σταγονίδια αιθανόλης που διέφυγαν της πιπέτας.
- Μετά, προστέθηκαν 22 μL H₂O, και αφότου τα pellets διαλύθηκαν πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR για να ελέγξουμε την επιτυχία της διαδικασίας και την ύπαρξη DNA.
- Τέλος, τα διαλύματα ψύχθηκαν και στάλθηκαν για αλληλούχιση [pi-50235_sureclean_plus_v5.pdf \(bioline.com\)](https://www.bioline.com/pi-50235-sureclean-plus-v5.pdf).

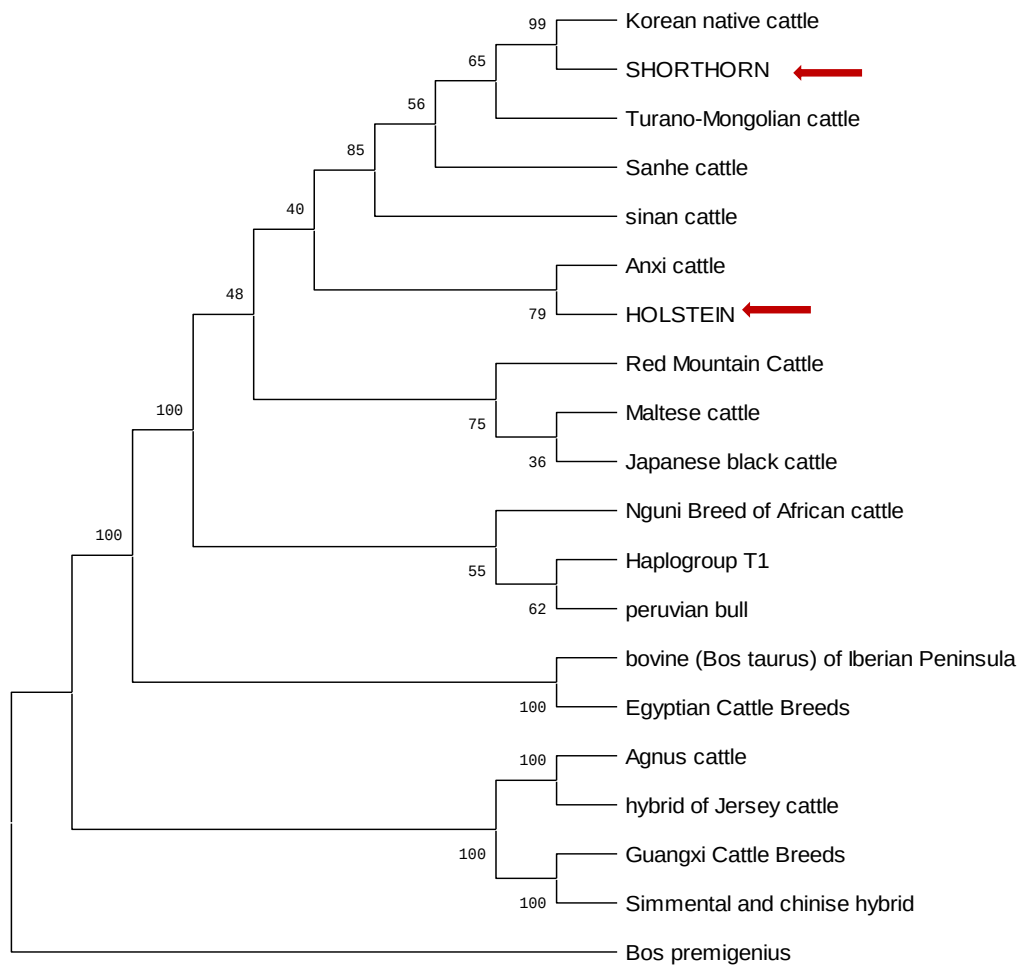
2.8) Αλληλούχιση δειγμάτων και ανάλυση των αποτελεσμάτων της

Η αλληλούχιση των δειγμάτων είναι απαραίτητη για να μας δώσει τα τελικά αποτελέσματα σχετικά με τη γενετική ταυτοποίηση των 2 φυλών αγελάδων, με την αξιοποίηση των πρότυπων διαλυμάτων που αντιπροσωπεύουν τους διαφορετικούς γονοτύπους. Η διαδικασία αυτή διεξήχθη σε εξωτερικό εργαστήριο και τα αποτελέσματα της αλληλούχισης στάλθηκαν ηλεκτρονικά με τη μορφή χρωματογραφήματος κατά Sanger, τα οποία ελέγχθηκαν και αναλύθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος BioEdit version 7.2.5

3) Αποτελέσματα

3.1) Φυλογενετικό δέντρο

Το φυλογενετικό δέντρο που σχεδιάστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Maximum Likelihood από το πρόγραμμα MEGA version 11 είναι το παρακάτω:

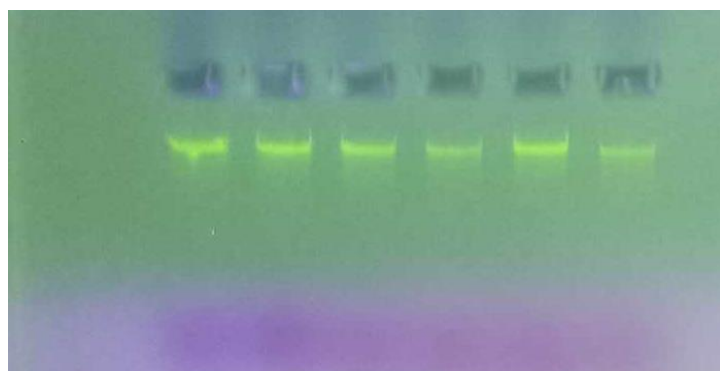


Εικόνας 12: Φυλογενετικό δέντρο έπειτα από ανάλυση των αλληλουχιών με το πρόγραμμα MEGA 11

Με βέλη διαφαίνονται οι υπό μελέτη φυλές αγελάδων, δηλαδή η Ελληνική Βραχυκερατική (Shorthorn) και η φυλή Holstein. Σύμφωνα με τη φυλογενετική ανάλυση λοιπόν, η Βραχυκερατική φυλή, βρίσκεται στον ίδιο κλάδο (δηλαδή στην ίδια ομάδα φυλών με κοινό πρόγονο) με τη φυλή αγελάδων της Κορέας, ενώ η φυλή Holstein, φαίνεται να ανήκει στον ίδιο κλάδο με τη φυλή αγελάδων της Κίνας, Αηκί, η οποία θεωρείται απειλούμενη (Guo et al., 2017). Ουσιαστικά, και οι δύο φυλές που μελετήσαμε στο συγκεκριμένο πείραμα, βρίσκονται στον ίδιο κλάδο με φυλές της Ασίας, γεγονός που υποδηλώνει την προέλευσή τους. Η γενετική συγγένεια της Ελληνικής Βραχυκερατικής αγελάδας με εκείνη της Κορέας, φαίνεται να δικαιολογεί και το φαινότυπό της, δηλαδή τη μικρόσωμη δομή της. Επιπλέον, η ανάλυση του φυλογενετικού δέντρου έδειξε πως η Βραχυκερατική φυλή ανήκει σε διαφορετικό κλάδο σε σχέση με την Holstein, ωστόσο οι δύο αυτοί κλάδοι είναι σχετικά κοντινοί μεταξύ τους και δεδομένου ότι οι κλάδοι του φυλογενετικού δέντρου αναπαριστούν τις εξελικτικές σχέσεις από τον κοινό πρόγονο στους απογόνους, πιθανώς το γεγονός αυτό να αποτελεί ένδειξη ότι οι δύο φυλές διαχωρίστηκαν στο πρόσφατο παρελθόν και η γενετική τους διαφοροποίηση ενδεχομένως να μην είναι ιδιαίτερα μεγάλη.

3.2) Απομόνωση DNA και αξιολόγηση της ηλεκτροφόρησης

Η παρακάτω εικόνα, αποτελεί ένα από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, όπως προκύπτει έπειτα από έκθεση σε φως UV. Με πράσινο χρώμα κάτω από τα «πηγαδάκια» του πηκτώματος της αгарόζης, διαφαίνεται το DNA που απομονώθηκε από τα δείγματα. Επίσης, κάθε χρώση αντιστοιχεί σε διαφορετικό δείγμα και η ένταση της χρώσης είναι συνήθως ανάλογη της συγκέντρωσής τους.



Εικόνα 13: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης DNA

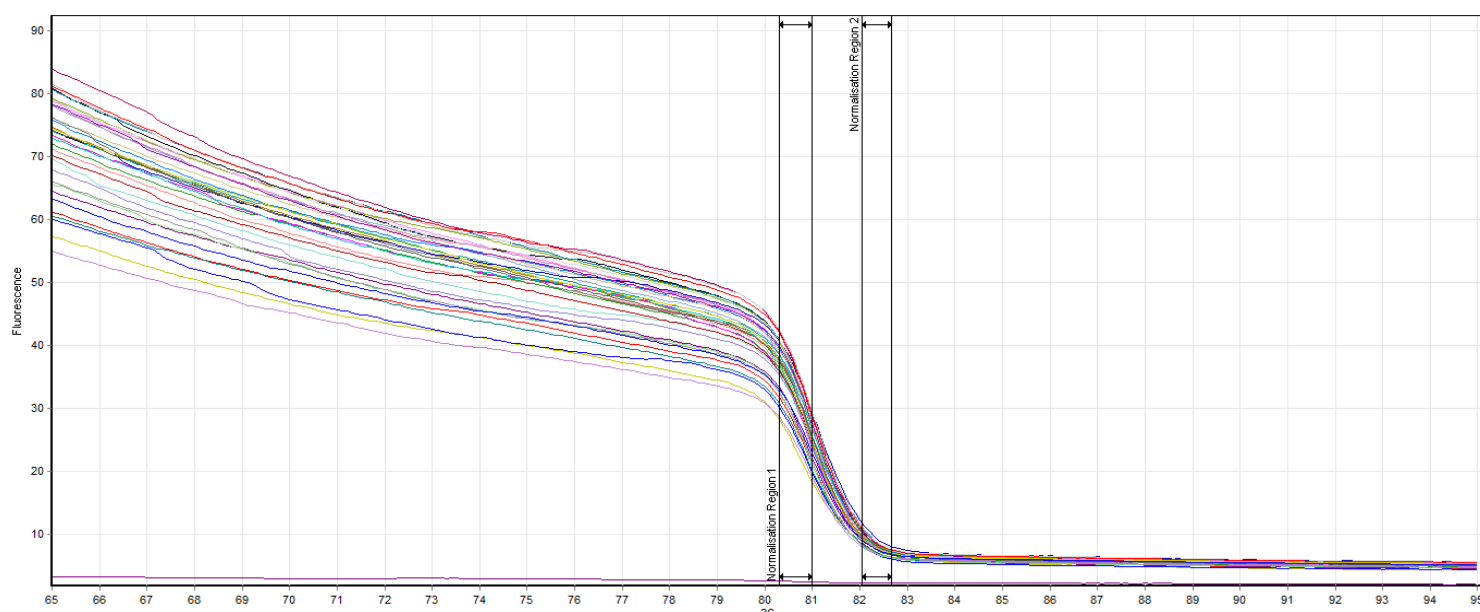
3.3) Επιλογή primer

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα «Υλικά- Μέθοδοι», αφότου ολοκληρώθηκε ο σχεδιασμός των εκκινητών, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR και μετά με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, διαπιστώθηκε το αν ενισχύουν τελικά το επιθυμητό προϊόν. Ακολούθως έγιναν δοκιμαστικές αντιδράσεις HRM, για κάθε ζεύγος primer, και τελικά το αποτέλεσμα ήταν ότι το ζεύγος εκκινητών για τα SNPs των θέσεων 7955 και 8003 δε δίνουν αποτέλεσμα στις αντιδράσεις και συνεπώς δεν υβριδίζουν το DNA.

Όλα τα άλλα ζεύγη εκκινητών που σχεδιάστηκαν, φάνηκαν να δίνουν το επιθυμητό αποτέλεσμα, ωστόσο επιλέξαμε να συνεχίσουμε το πείραμα με τους primers των πολυμορφισμών 556, 11.242 και 12.535, διότι παρουσίασαν τη βέλτιστη απόδοση στις καμπύλες ενίσχυσης της HRM, και επομένως είχαμε καλύτερη εικόνα για την εύρεση των διαφορετικών γονοτύπων όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια.

3.4) Εύρεση των πρότυπων γονοτύπων

Αφότου ολοκληρώθηκε η επιλογή και ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας των εκκινητών, πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικές αντιδράσεις HRM των δειγμάτων για κάθε ζεύγος primer. Το αποτέλεσμα των αντιδράσεων αυτών ήταν οι καμπύλες HRM.

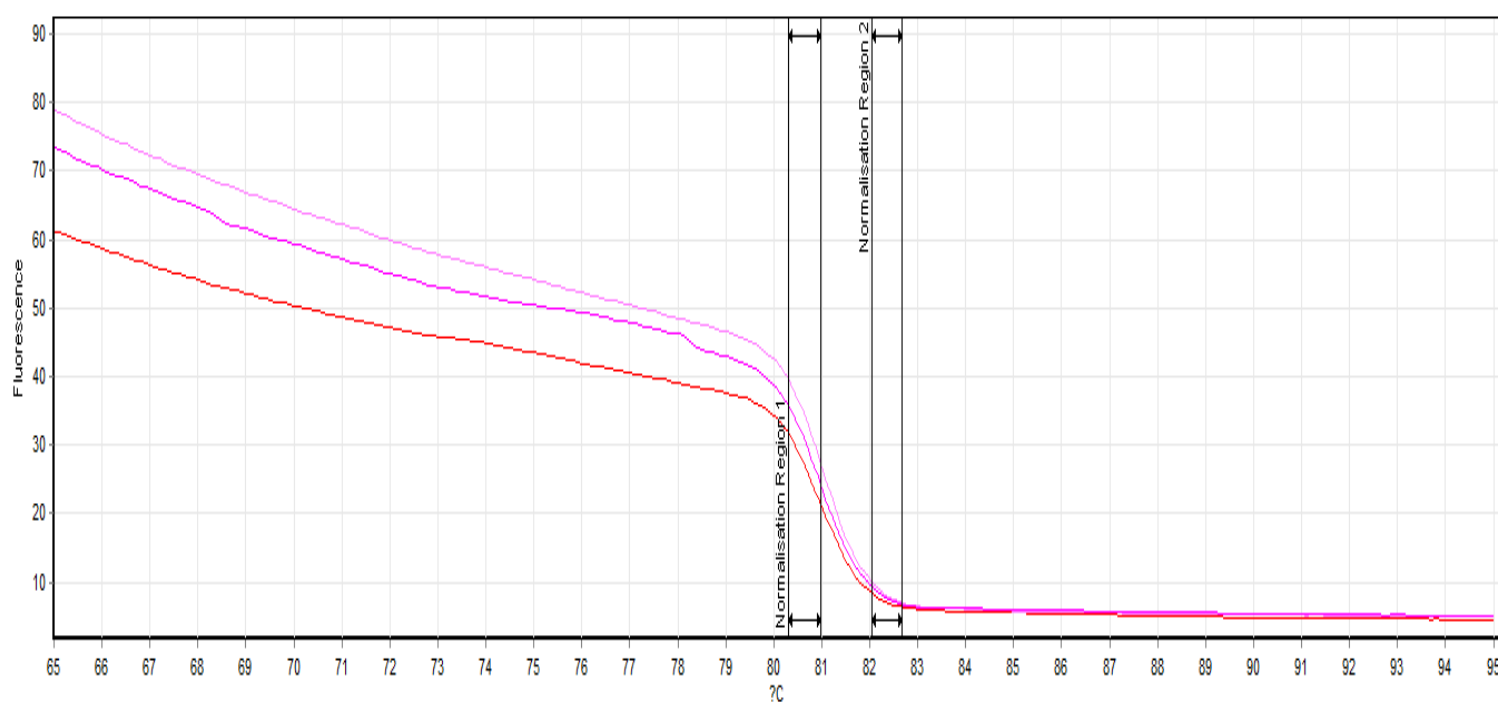


Εικόνα 14: Καμπύλη αντίδρασης HRM, έπειτα από κανονικοποίηση για το ζεύγος primer 556

Σύμφωνα με τις καμπύλες των αντιδράσεων βρέθηκαν τα πρότυπα δείγματα, δηλαδή εκείνα που αντιστοιχούν σε διαφορετικό γονότυπο, δηλαδή που φέρουν διαφορετική μετάλλαξη, και σύμφωνα με τα οποία θα γινόταν και η κατηγοριοποίηση όλων των δειγμάτων. Επιπλέον, μέσα από τις καμπύλες δόθηκαν και τα ποσοστά επιτυχίας αντιστοίχισης των δειγμάτων στον εκάστοτε γονότυπο, μετακινώντας τα πλαίσια normalization regions στην αρχή και στο τέλος του σημείου καμπής των δειγμάτων.

Έτσι λοιπόν τα αποτελέσματα για κάθε ζεύγος εκκινητών ήταν τα ακόλουθα:

- **Primer 556**



Εικόνα 15: Καμπύλες πρότυπων γονοτύπων για τον primer 556

Για το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών, οι πρότυποι γονότυποι προέκυψαν από τα δείγματα των Βραχυκερατικών αγελάδων. Στην καμπύλη με κόκκινο χρώμα αναπαρίστανται το δείγμα 1, με ροζ το δείγμα 5 και με μπλε το δείγμα 10.

No.	C	Name	Genotype	Confidence %					
1		mut1	1	100,00	17		2	99,73	
2				3	94,49	18		1	99,63
3				3	99,04	19		1	98,74
4				3	98,85	20		2	99,47
5		mut2	2	100,00	21		3	99,33	
6				2	95,50	22		2	99,90
7				3	99,05	23		2	99,39
8			3	97,89	24		2	99,81	
9			3	98,81	25		2	91,94	
10		mut3	3	100,00	26		2	98,79	
11				2	99,43	27		2	99,58
12			3	98,99	28		2	99,43	
13			2	98,85	29		2	98,48	
14			1	98,94	30		1	99,84	
15			2	99,74	31		3	99,10	
16			2	98,94	32		2	99,12	
					33		2	99,54	
					34		3	99,82	
					35		2	99,60	
					36		Variation		

Εικόνα 16: Παράδειγμα ποσοστού επιτυχίας κατάταξης των δειγμάτων με βάση τους πρότυπους γονοτύπους για τον primer 556. Η θέση 36 αντιστοιχεί στο δείγμα ελέγχου (control).

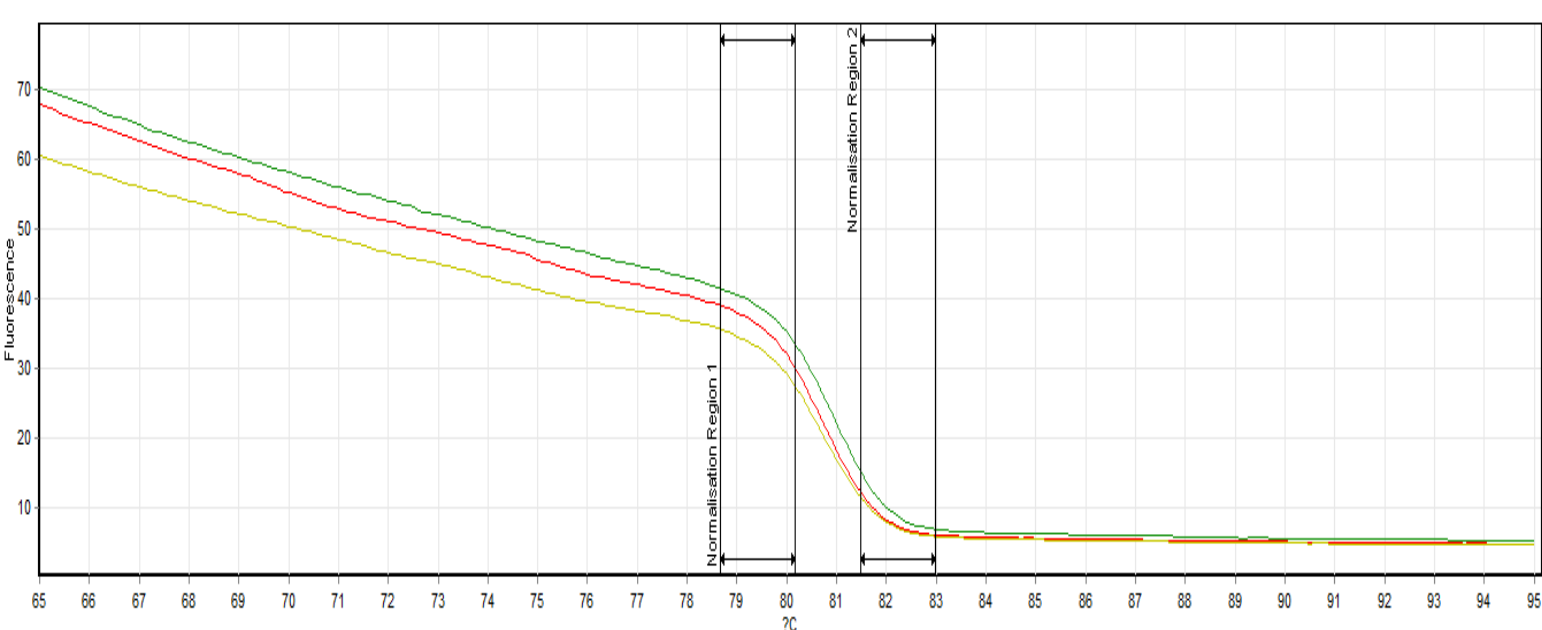
Παρατηρήσαμε ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά στην κατάταξη των δειγμάτων σύμφωνα με τους 3 πρότυπους γονοτύπους, γεγονός που υποδηλώνει την ορθότητα επιλογής τους, κάτι το οποίο συνέβη και στις αντιδράσεις των υπολοίπων ζευγών primer. Έτσι, συνολικά για το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινήτων, τα αποτελέσματα για τα δείγματα ήταν τα παρακάτω:

Δείγματα	SHORTHORN	HOLSTEIN
Πρότυπο 1	3	2
Πρότυπο 2	7	12
Πρότυπο 3	8	3

Πίνακας 9: Συγκεντρωτικός πίνακας πρότυπων δειγμάτων για τον primer 556

Ομοίως, προέκυψαν και τα αποτελέσματα για τα άλλα 2 ζεύγη εκκινήτων που επιλέχθηκαν για τις αντιδράσεις.

- **Primer 11.242**



Εικόνα 17: Καμπύλες πρότυπων γονοτύπων για τον primer 11.242

2	mut2	2	100,00
3		3	95,59
4		3	99,83
5		2	96,03
6		3	97,47
7		3	98,37
8		3	94,75
9	mut3	3	100,00
10		3	96,08
11		3	97,58
12		3	94,91
13		3	96,79
14		3	97,86
19		2	97,01
20		2	99,01
21		2	96,35
22		2	98,43

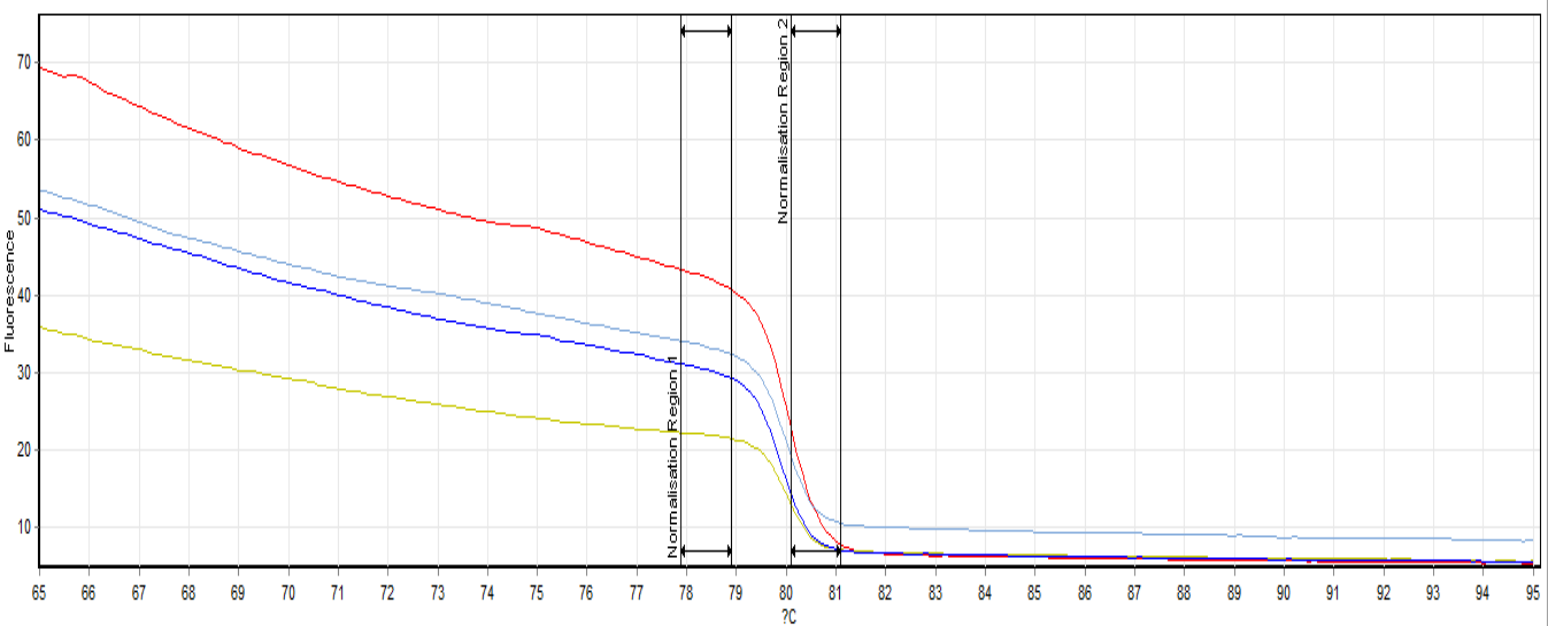
Εικόνα 19: Παράδειγμα ποσοστού επιτυχίας κατάταξης των δειγμάτων με βάση τους πρότυπους γονοτύπους για τον primer 11.242

Εξίσου υψηλά ποσοστά παρατηρήθηκαν για όλα τα δείγματα που συμμετείχαν στην αντίδραση, ενώ πρέπει να σημειωθεί, ότι και γι' αυτό τον primer τα πρότυπα δείγματα ήταν μόνο από αγελάδες της Βραχυκερατικής φυλής.

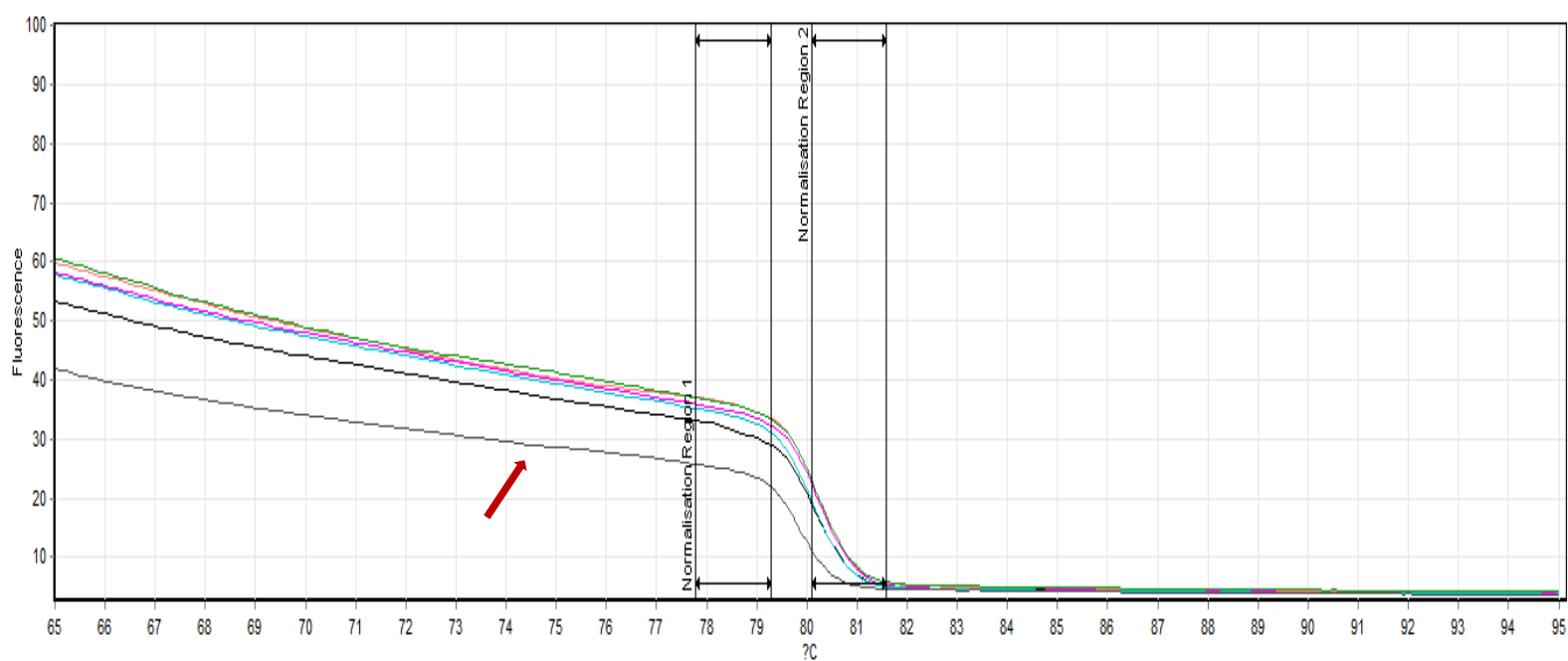
Δείγματα	SHORTHORN	HOLSTEIN
Πρότυπο 1	3	3
Πρότυπο 2	7	10
Πρότυπο 3	28	20

Πίνακας 10: Συγκεντρωτικός πίνακας πρότυπων δειγμάτων για τον primer 11.242

- **Primer 12.535**



Εικόνα 18: Καμπύλες πρότυπων γονοτύπων για τον primer 12.535 (δείγματα Shorthorn)



Εικόνα 19: Καμπύλη πρότυπου γονοτύπου για τον primer 12.535 (δείγματα Holstein)

Οι καμπύλες των αντιδράσεων έδειξαν ότι για το συγκεκριμένο primer, προέκυψαν 4 πρότυποι γονότυποι από δείγματα Βραχυκερατικών αγελάδων, καθώς και ένας από δείγματα αγελάδων της φυλής Holstein. Στην παραπάνω εικόνα με βέλος φαίνεται ο γονότυπος του δείγματος Holstein σε σύγκριση με τυχαία δείγματα της αντίδρασης. Ουσιαστικά, τα υπόλοιπα δείγματα της φυλής αυτής, ακολουθούσαν τους 4 πρότυπους γονοτύπους της Βραχυκερατικής φυλής. Μάλιστα, και στην περίπτωση αυτού του εκκινήτη παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά στην κατάταξη δειγμάτων σύμφωνα με τους πρότυπους γονοτύπους.

1	mut1	1	100,00
2	mut2	2	100,00
3	mut3	3	100,00
4		1	98,48
5		3	96,63
6		1	98,38
7		4	99,29
8		1	99,40
9		1	99,81
10		4	97,96
11		1	97,27
12		1	99,68
13		4	98,12
14		1	99,78
15		1	98,71
16	mut4	4	100,00
17		1	99,75
18		1	99,81

Εικόνα 20: Παράδειγμα ποσοστού επιτυχίας κατάταξης των δειγμάτων με βάση τους πρότυπους γονοτύπους για τον primer 12.535

Έτσι, συνολικά για τα πρότυπα διαλύματα των αντιδράσεων με τον εκκινητή 12.535, προέκυψαν τα εξής:

Δείγματα	SHORTHORN	HOLSTEIN
Πρότυπο 1	20	23
Πρότυπο 2	1	1
Πρότυπο 3	9	8
Πρότυπο 4	8	
Πρότυπο 5		3

Πίνακας 11: Συγκεντρωτικός πίνακας πρότυπων δειγμάτων για τον primer 12.535

3.5) Αποτελέσματα αλληλούχισης πρότυπων δειγμάτων

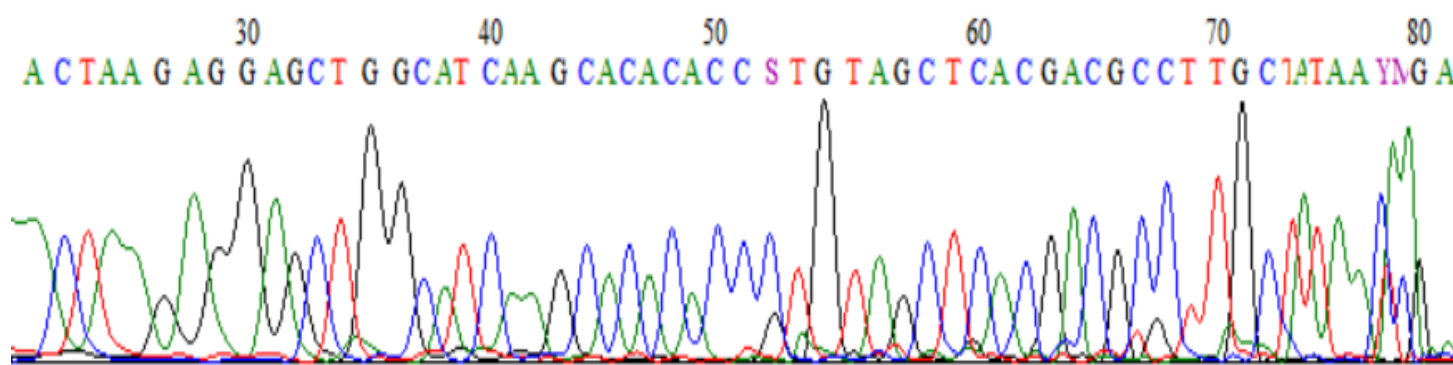
Αφότου συγκεντρώθηκαν τα πρότυπα δείγματα, ακολούθως πραγματοποιήσαμε αντιδράσεις qPCR, με στόχο να ελέγξουμε την ενίσχυσή τους, όπως αναλύθηκε στην ενότητα 2.10. Στη συνέχεια διεξήχθη ηλεκτροφόρηση για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων. Αφού συμπεράναμε την επιτυχία των αντιδράσεων και ότι πράγματι υπήρχε ποσότητα DNA στα διαλύματα που προετοιμάσαμε για να σταλούν για αλληλούχιση, ελέγξαμε ποιον primer από κάθε ζεύγος εκκινητών θα επιλέγαμε, με τη βοήθεια του προγράμματος BLAST. Συγκεκριμένα, καθώς εντοπίσαμε την περιοχή ενίσχυσης κάθε εκκινητή, επιλέξαμε τον αντίστοιχο primer (Forward ή Reverse), με κριτήριο να μην περιλαμβάνει τη θέση του πολυμορφισμού που μελετάμε και να βρίσκεται πιο μακριά από αυτόν, προκειμένου να γίνει σωστά η υβριδοποίηση.

Έτσι, για το ζεύγος εκκινητών 556, επιλέχθηκε ο Forward primer: CATGCAAGCATCTACACCCC, για το ζεύγος εκκινητών 11.242, επίσης ο Forward

primer: CTCACGTAGAAGCCCCCATC, ενώ για το ζεύγος 12.535 επιλέχθηκε ο Reverse primer: TGTGTTGCATCTGCTCGTC.

Μόλις, λοιπόν τα δείγματα προετοιμάστηκαν για αλληλούχιση, όπως έχει ήδη αναφερθεί, στάλθηκαν σε εξωτερικό εργαστήριο και τα διαγράμματα Sanger που στάλθηκαν έδωσαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:

- **Primer 556**



Εικόνα 21: Αποτέλεσμα αλληλούχισης πρότυπου δείγματος 1

Ομοίως με το πρότυπο δείγμα 1, προέκυψαν και τα χρωματογραφήματα και για τα υπόλοιπα πρότυπα δείγματα. Από κάθε διάγραμμα αφαιρέσαμε τις πρώτες βάσεις για να έχουμε καλύτερη συνολική εικόνα για την αλληλουχία κάθε δείγματος, καθώς οι κορυφές αντιστοιχούν στις διάφορες νουκλεοτιδικές βάσεις. Μάλιστα, στα διαγράμματα κατά Sanger με S συμβολίζονται οι νουκλεοτιδικές βάσεις G/C, με Y οι βάσεις C/T, ενώ με M οι βάσεις A/C. Έτσι λοιπόν, σύμφωνα με τα παραπάνω εξήγαμε σε μορφή FASTA, την αλληλουχία κάθε πρότυπου διαλύματος από το αντίστοιχο χρωματογράφημα μέσα από το πρόγραμμα BioEdit version 7.2.5.

Το επόμενο βήμα ήταν με τη χρήση του προγράμματος BLAST, να ελέγξουμε το ποσοστό ταυτοποίησης του κάθε πρότυπου γονοτύπου με το γονιδίωμα αναφοράς του είδους *Bos taurus*.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν ποσοστό ταυτοποίησης 100 % για τα πρότυπα δείγματα 1 και 10.

Bos taurus isolate RC-08-b mitochondrion, partial genome

Sequence ID: [OR137966.1](#) Length: 1923 Number of Matches: 1

Range 1: 525 to 579 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
102 bits(55)	2e-18	55/55(100%)	0/55(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACTAAGAGGAGCTGGCATCAAGCACACACCCTGTAGCTCACGACGCCTTGCTTAA 55			
Sbjct 525	ACTAAGAGGAGCTGGCATCAAGCACACACCCTGTAGCTCACGACGCCTTGCTTAA 579			

Εικόνα 22: Ποσοστό ταυτοποίησης του πρότυπου γονιδιώματος του δείγματος 1 για τον primer 556 με το γονιδίωμα αναφοράς.

Ωστόσο για το πρότυπο δείγμα 5, τα αποτελέσματα ήταν διαφορετικά. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μία μονονουκλεοτιδική μετάλλαξη στη θέση 545, σε θέση του γονιδιώματος που σύμφωνα με το GenBank του BLAST, αντιστοιχεί σε μη κωδικοποιητική περιοχή και συγκεκριμένα σε rRNA.

Bos taurus isolate RC-08-b mitochondrion, partial genome

Sequence ID: [OR137966.1](#) Length: 1923 Number of Matches: 1

Range 1: 525 to 579 [GenBank](#) [Graphics](#)

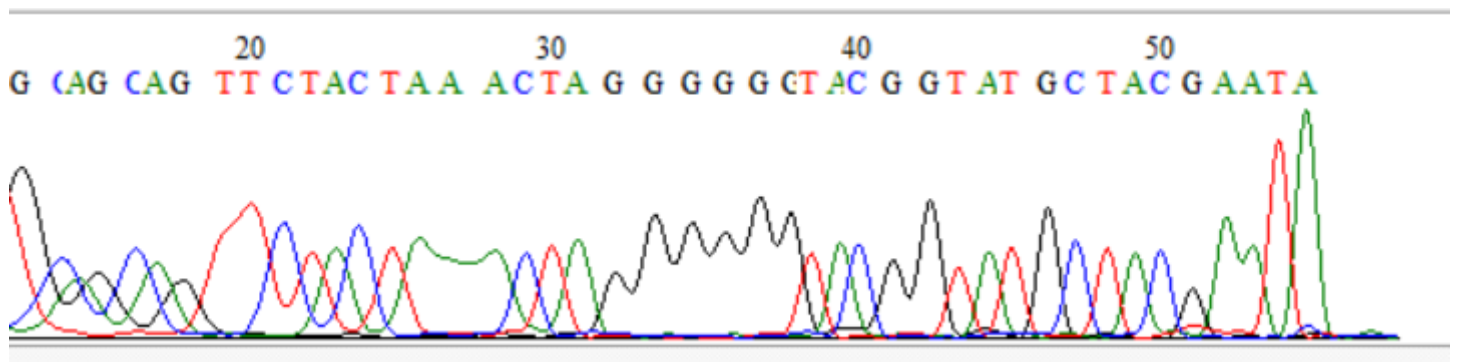
▼ [Next Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
97.1 bits(52)	1e-16	54/55(98%)	0/55(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACTAAGAGGAGCTGGCATCAGGCACACACCCTGTAGCTCACGACGCCTTGCTTAA 55			
Sbjct 525	ACTAAGAGGAGCTGGCATCAAGCACACACCCTGTAGCTCACGACGCCTTGCTTAA 579			

↑

Εικόνα 23: Ποσοστό ταυτοποίησης του πρότυπου γονιδιώματος του δείγματος 5 για τον primer 556 με το γονιδίωμα αναφοράς. Με βέλος φαίνεται η θέση της μετάλλαξης.

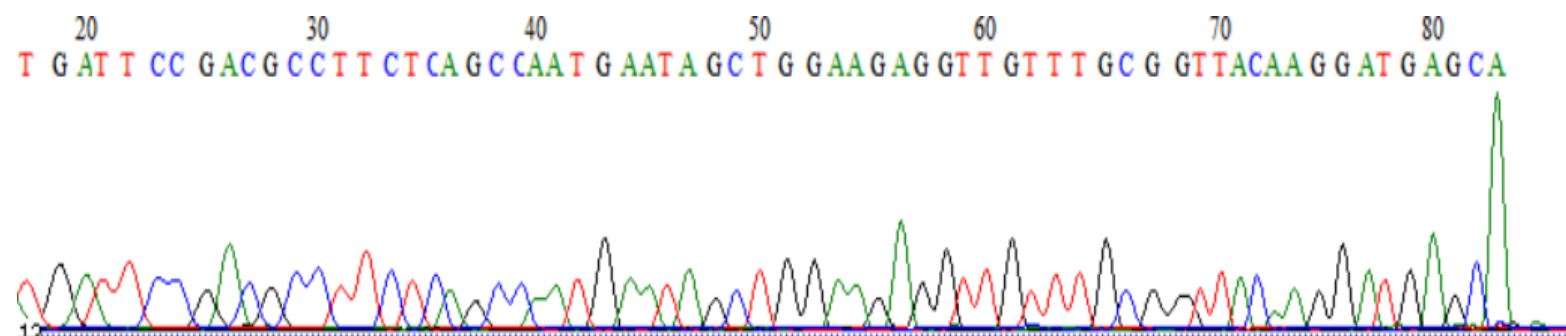
- **Primers 11.242, 12.535**



Εικόνα 24: Αποτέλεσμα αλληλούχισης πρότυπου δείγματος 6 για τον χprimer 11.242

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και με τον primer 556 και τα αποτελέσματα του BLAST έδειξαν ποσοστό ταυτοποίησης 100% και για τα 3 πρότυπα δείγματα.

Τα ίδια αποτελέσματα προέκυψαν και για τον εκκινητή 12.535, όπου και τα 5 πρότυπα δείγματα σημείωσαν ποσοστό ταυτοποίησης με το γονότυπο αναφοράς 100%. Ενδεικτικά, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το πρότυπο δείγμα 35.



Εικόνα 25: Αποτέλεσμα αλληλούχισης πρότυπου δείγματος 35 για τον χprimer 12.535

Bos taurus isolate BG2_24i mitochondrion, complete genome

Sequence ID: [OR766837.1](#) Length: 16340 Number of Matches: 1

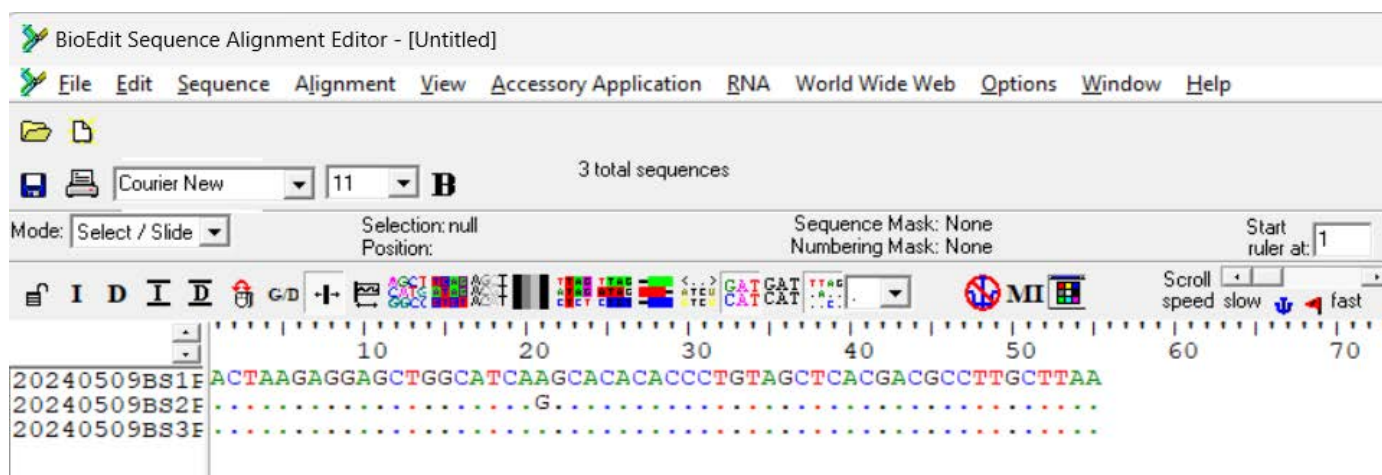
Range 1: 12493 to 12558 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ F

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
122 bits(66)	2e-24	66/66(100%)	0/66(0%)	Plus/Minus
Query 1	TGATTCCGACGCCTTCTCAGCCAATGAATAGCTGGAAGAGGTTGTTTGC	GGTTACAAGGA	60	
Sbjct 12558	TGATTCCGACGCCTTCTCAGCCAATGAATAGCTGGAAGAGGTTGTTTGC	GGTTACAAGGA	12499	
Query 61	TGAGCA	66		
Sbjct 12498	TGAGCA	12493		

Εικόνα 26: Ποσοστό ταυτοποίησης του πρότυπου γονιδιώματος του δείγματος 35 για τον primer 12.535 με το γονιδίωμα αναφοράς.

Επιπλέον, με τη βοήθεια του προγράμματος BioEdit version 7.2.5, συγκρίθηκαν οι πρότυπες αλληλουχίες για κάθε ζεύγος εκκινητών, προκειμένου να ελέγξουμε τα σημεία στα οποία διαφέρουν. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η σύγκριση των τριών πρότυπων δειγμάτων του primer 556.

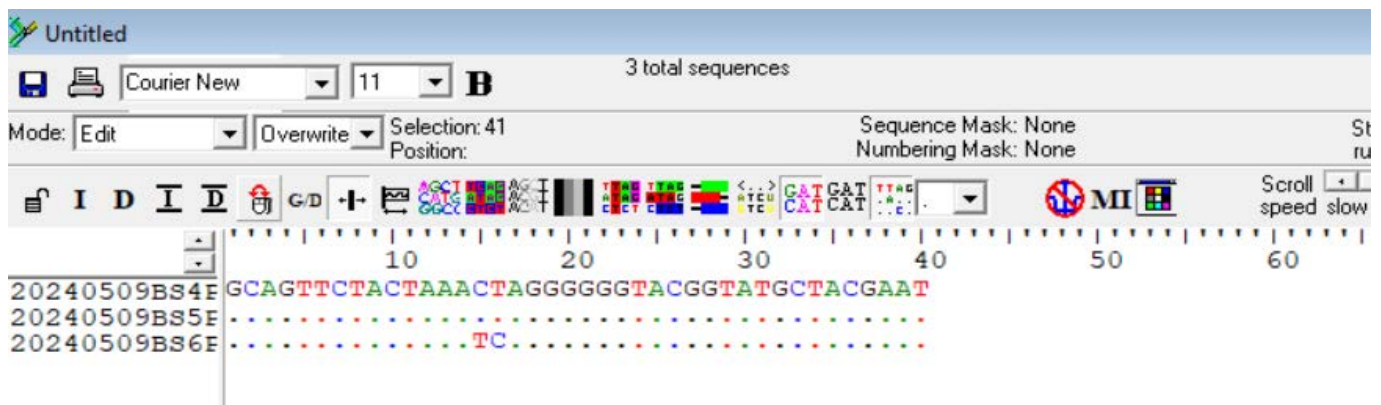


Εικόνα 27: Αποτέλεσμα σύγκρισης πρότυπων αλληλουχιών για τον εκκινητή 556.

Τα αποτελέσματα της σύγκρισης έδειξαν ότι η μόνη διαφορά που παρατηρείται είναι σε μόνο μία νουκλεοτιδική βάση ανάμεσα στις δύο αλληλουχίες. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι στην αλληλούχιση

χρησιμοποιήθηκε μόνο ο ένας εκκινητής του ζεύγους. Άρα, η μετάλλαξη αυτή είναι πιθανό να μην περιλαμβάνεται στην περιοχή ενδιαφέροντος που στοχεύει ο συγκεκριμένος primer. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα πρότυπα δείγματα και των άλλων 2 εκκινητών.

Έτσι, η ανάλυση για τα πρότυπα δείγματα του primer 11.242 έδειξε ότι μεταξύ των τριών πρότυπων αλληλουχιών παρατηρείται διαφορά μόνο ανάμεσα σε 2 νουκλεοτιδικές βάσεις μεταξύ των 2 αλληλουχιών, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 28: Αποτέλεσμα σύγκρισης πρότυπων αλληλουχιών για τον εκκινητή 11.242

Ο λόγος για την ύπαρξη αυτής της διαφοράς είναι πάλι το γεγονός ότι αξιοποιήθηκε μόνο ένας εκκινητής του ζεύγους κατά την αλληλούχιση, καθώς και η περιοχή ενίσχυσης αυτού.

Τέλος, στον εκκινητή 12.535, παρατηρήθηκε επίσης διαφορά σε μόνο μία νουκλεοτιδική βάση μεταξύ των πρότυπων αλληλουχιών.



Εικόνα 29: Αποτέλεσμα σύγκρισης πρότυπων αλληλουχιών για τον εκκινητή 12.535

Συμπερασματικά, και για τους 3 εκκινητές που κρίθηκαν κατάλληλοι το δείγμα 5 έδειξε διαφορετικό γονότυπο σε καθέναν από αυτούς και αποτέλεσε πρότυπο δείγμα, χωρίς ωστόσο να είναι ικανό να δώσει ποσοστό διαφοροποίησης σε σχέση με την αλληλουχία αναφοράς. Το ίδιο ακριβώς συνέβη και με τα υπόλοιπα πρότυπα δείγματα που ήταν διαφορετικά για τα ζεύγη των εκκινητών. Συνεπώς, δε προέκυψε κάποιο αποτέλεσμα για τη γενετική διαφοροποίηση της Βραχυκερατικής φυλής με βάση μεταλλάξεις στο γονιδίωμά της που να αποτελούν δείκτες για την ταυτοποίησή της συγκριτικά με τη φυλή Holstein.

4) Συζήτηση

Η κλιματική αλλαγή αποτελεί ένα από τα πιο καίρια προβλήματα που αντιμετωπίζει ο πλανήτης μας, ενώ η πάροδος του χρόνου αποδεικνύει πως η αλόγιστη ανθρώπινη δραστηριότητα οξύνει τις επιπτώσεις της. Το λιώσιμο των πάγων, η ραγδαία αύξηση της θερμοκρασίας και τα ακραία καιρικά φαινόμενα, αποτελούν τις πιο έκδηλες επιπτώσεις της κατάστασης αυτής. Η υποβάθμιση της βιωσιμότητας του πλανήτη μας επηρεάζει εκτός από τον άνθρωπο και όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, ανάμεσά τους και τα βοοειδή.

Αναλυτικότερα, η κλιματική αλλαγή επιφέρει θερμική καταπόνηση στα βοοειδή γεγονός που επηρεάζει άμεσα την παραγωγικότητα και την υγεία τους. Το θερμικό στρες επιδρά με επιβλαβή τρόπο στις μεταβολικές και φυσιολογικές λειτουργίες των ζώων, με αποτέλεσμα να αλλάζει η συμπεριφορά τους και να καθίστανται επιρρεπή σε ασθένειες, ενώ δρα ανασταλτικά στο αναπαραγωγικό τους σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, το θερμικό στρες οφείλεται για τη μειωμένη γονιμότητα των αγελάδων, προκαλώντας δυσλειτουργία των ωοθηκών και προβλήματα στην ανάπτυξη του εμβρύου. Συνολικά, το θερμικό στρες στο οποίο υποβάλλονται τα βοοειδή οδηγεί σε ένα φαύλο κύκλο όπου οι αγελάδες αδυνατούν να διατηρήσουν σταθερές τις φυσιολογικές τους λειτουργίες, ενώ παράλληλα λόγω του γεγονότος αυτού συμβάλλουν κι αυτές με τη σειρά τους στην επιβάρυνση του πλανήτη παράγοντας υψηλά ποσοστά θερμότητας μέσω της μεταβολικής τους δραστηριότητας (Rojas-Downing et al., 2017).

Στόχος της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας ήταν η γενετική ταυτοποίηση της προστατευόμενης Ελληνικής Βραχυκερατικής φυλής βοοειδών, η οποία σημειώνει εξελικτικό πλεονέκτημα επιβίωσης σε αντίξοες κλιματεδαφικές συνθήκες. Στην πραγματικότητα οι αγελάδες της φυλής αυτής, έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται και να αξιοποιούν το εκάστοτε περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται χωρίς να έχουν ιδιαίτερη ανάγκη από ανθρώπινη φροντίδα. Ωστόσο, παρά τα πλεονεκτήματα που η συγκεκριμένη φυλή παρουσιάζει συγκριτικά με άλλες φυλές αγελάδων της χώρας μας, ο πληθυσμός της δε θεωρείται ιδιαίτερα σημαντικός, καθώς λόγω του μικρού σώματός της δεν παρέχει μεγάλη ποσότητα κρέατος, μιας και αποτελεί φυλή κρεοπαραγωγικής κατεύθυνσης κυρίως, και έτσι οι κτηνοτρόφοι συχνά επιλέγουν τη διασταύρωση των καθαρόαιμων Βραχυκερατικών αγελάδων με αγελάδες άλλων φυλών υψηλής κρεοπαραγωγικής απόδοσης, με αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων μειωμένης διατροφικής αξίας. Εξαιτίας λοιπόν της υψηλής αρμοστικότητας των αγελάδων αυτών και των πλεονεκτημάτων τους για τον κτηνοτροφικό τομέα, τα τελευταία χρόνια σημειώνεται έντονο ενδιαφέρον για τη διατήρησή τους.

Στο πείραμά μας επιλέξαμε να πραγματοποιήσουμε γενετική ταυτοποίηση καθαρόαιμων Βραχυκερατικών αγελάδων με τη χρήση μοριακών δεικτών και συγκεκριμένα μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) μιτοχονδριακού DNA. Το μιτοχονδριακό DNA αποτελεί ένα κοινό δείκτη στα πειράματα πληθυσμιακής γενετικής, λόγω των συγκριτικών του πλεονεκτημάτων αναφορικά με τους άλλους μοριακούς δείκτες και κυρίως λόγω του μεγάλου ποσοστού μεταλλάξεων που συγκεντρώνει. Για το σκοπό αυτό έγινε γονιδιωματική σύγκριση με αγελάδες της φυλής Holstein, μια φυλή μεγάλου εγχώριου πληθυσμού. Ουσιαστικά, η σύγκριση ήταν απαραίτητη ώστε να βρεθούν οι γενετικές διαφορές μεταξύ των δύο φυλών. Έτσι, επιλέξαμε την εφαρμογή της τεχνικής HRM, λόγω των πλεονεκτημάτων της που έχουν ήδη αναφερθεί με στόχο την εύρεση πρότυπων γονοτύπων για τους εκκινητές που επιλέχθηκαν. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι και στα 3 ζεύγη primer (556,11.242 και 12.535) που ελέγχθηκαν όλα τα πρότυπα δείγματα προέρχονταν από αγελάδες της Βραχυκερατικής φυλής, ενώ μόνο ένα από τη φυλή Holstein. Το δείγμα Βραχυκερατικής αγελάδας με την αρίθμηση 5, έδωσε διαφορετικό πρότυπο γονοτύπου και στους 3 εκκινητές, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ενδεχομένως να αποτελεί απλότυπο, δηλαδή να περιέχει γονιδιακή αλληλουχία που κληρονομείται από τον ένα γονέα και συγκεκριμένα από τη μητέρα μιας και αναφερόμαστε σε μιτοχονδριακό DNA, και εκτείνεται σε γονίδια της περιοχής ενδιαφέροντος. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της αλληλούχισης έδειξαν πλήρη ταυτοποίηση των πρότυπων γονοτύπων με το γονότυπο αναφοράς του είδους *Bos taurus*, με μόνο μία μονονουκλεοτιδική μετάλλαξη να σημειώνεται όχι στην περιοχή ενδιαφέροντος, αλλά σε μη κωδικοποιητική περιοχή. Ακόμη, η σύγκριση των πρότυπων γονοτύπων για κάθε εκκινητή, έδειξε ότι οι αλληλουχίες των εκκινητών 556 και 12.535 διαφέρουν σε μία μόνο νουκλεοτιδική θέση, ενώ οι πρότυπες αλληλουχίες του primer 11.242 διέφεραν σε 2 θέσεις, με τα αποτελέσματα να φορούν την περιοχή ενίσχυσης του ενός primer που επιλέχθηκε για αλληλούχιση, όπως αναλύθηκε προηγουμένως. Επιπλέον, σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα αποδείχθηκε ότι τελικά οι εκκινητές που επιλέξαμε, πράγματι ενίσχυαν το γονιδίωμα, ωστόσο με τη χρήση τους δε «στοχεύσαμε» στον μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό που θέλαμε κάθε φορά, αλλά σε περιοχή κοντά στη νουκλεοτιδική του θέση. Το συμπέρασμα μας λοιπόν, ήταν ότι οι δείκτες οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία δεν ήταν οι κατάλληλοι για τη γενετική ταυτοποίηση των δειγμάτων της Βραχυκερατικής φυλής. Οι πιθανοί λόγοι που δικαιολογούν το αποτέλεσμα αυτό, είναι αρχικά ότι η περιοχή που μελετήσαμε μπορεί να είναι αρκετά συντηρημένη και επίσης οι δύο φυλές που συγκρίναμε μπορεί να έχουν διαχωριστεί γενετικά πρόσφατα, όπως ενδεχομένως υποδηλώνει και η φυλογενετική ανάλυση, και άρα να μην έχουν προκύψει σημαντικές διαφορές που να καθιστούν εύκολη τη γενετική τους διαφοροποίηση. Επομένως, καταλήγουμε στο ότι χρειάζεται επιπλέον έρευνα και

συλλογή δεδομένων προκειμένου να μπορέσουμε να επιτύχουμε τη γενετική ταυτοποίηση της υπό μελέτης φυλής σε μελλοντικό χρόνο.

Μία τέτοια προσέγγιση, θα ήταν η συλλογή μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων και από Βραχυκερατικές αγελάδες από κοπάδια άλλων περιοχών και η σύγκρισή τους και με δείγματα άλλων αυτόχθονων και μη φυλών, πάλι με τη μέθοδο HRM που μας επιτρέπει να στοχεύουμε στην περιοχή που μας ενδιαφέρει κάθε φορά. Επιπρόσθετα, στην κατεύθυνση αυτή θα μπορούσε να συμβάλλει και η συλλογή περισσότερων πληροφοριών για το πότε πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός των φυλών, ώστε να διαπιστωθεί με βεβαιότητα το αν πράγματι συνέβη πρόσφατα. Παράλληλα, το ερευνητικό ενδιαφέρον θα μπορούσε να στραφεί και στη μελέτη άλλων μοριακών δεικτών πυρηνικού DNA, ώστε να χρησιμοποιηθούν δείγματα και από αρσενικά και από θηλυκά βοοειδή και να έχουμε μια πιο συλλογική εικόνα για τους πολυμορφισμούς του πυρηνικού DNA. Ακόμη, μία άλλη τεχνική που ενδεχομένως να έδινε αποτέλεσμα γενετικής ταυτοποίησης είναι το DNA barcoding, το οποίο μας δίνει τη δυνατότητα ταυτοποίησης άγνωστης αλληλουχίας είδους σε σύγκριση με γνωστές αλληλουχίες από βιβλιοθήκη αναφοράς. Ουσιαστικά, και αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει την απομόνωση DNA από τα δείγματα, την επιλογή γονιδίων με βάση την αλληλουχία barcode, δηλαδή με βάση την ταυτότητά τους με άλλα λόγια, την ενίσχυσή τους με universal primers και την αλληλούχισή τους επίσης κατά Sanger (Antil et al., 2022).

Σε κάθε περίπτωση, χρειάζεται προσπάθεια για την εύρεση των κατάλληλων δεικτών και μεθόδων που θα οδηγήσουν στο επιθυμητό αποτέλεσμα. Είναι πολύ σημαντικό να ολοκληρωθεί στο μέλλον η γενετική ταυτοποίηση της προστατευόμενης Βραχυκερατικής φυλής, ώστε να υπάρξουν και οι κατάλληλες προϋποθέσεις για την ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων διατήρησής της.

Συνολικά, υπάρχουν αρκετοί μέθοδοι διατήρησης βοοειδών που εφαρμόζονται κυρίως στο εξωτερικό και θα μπορούσαν δυνητικά να συμβάλλουν στη διατήρηση της Ελληνικής Βραχυκερατικής φυλής. Αρχικά, η προσπάθεια διατήρησης γίνεται μέσα στον ίδιο τον πληθυσμό, βελτιώνοντας τις συνθήκες διαβίωσης των ζώων και προσπαθώντας να διατηρηθεί καθαρόαιμη η φυλή. Έπειτα, υπάρχουν τεχνικές όπως η κρυοσυντήρηση σπερματοζωαρίων, ωαρίων και εμβρύων και η δημιουργία μιας «αποθήκης» γονιδίων (gene bank), με στόχο τη διατήρηση γονιδίων των διάφορων φυλών και την ενδεχόμενη αξιοποίηση τους για μελλοντικές γονιμοποιήσεις εάν κριθεί απαραίτητο λόγω μείωσης του πληθυσμού. Τα αποτελέσματα των μεθόδων αυτών, σύμφωνα με την έρευνα των Bolaji et al, έδειξαν ότι η κρυοσυντήρηση σπέρματος αποτελεί ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία, λόγω των λειτουργικών και δομικών τροποποιήσεων που υφίστανται τα σπερματοζωάρια εξαιτίας της ψύξης. Ωστόσο, με την ανάπτυξη της βιομηχανίας τεχνητής νοημοσύνης (AI), τα τελευταία χρόνια γίνεται επιλογή

ταύρων με σημαντικά καλή ποιότητα σπερματοζωαρίων (50-70% κινητικότητα) μετά την απόψυξη. Η πρόοδος της κυοφορίας έπεται από τη χρήση των συγκεκριμένων γαμετών και τα ποσοστά επιτυχίας της είναι τα ίδια με τη φυσιολογική γονιμοποίηση, απλά σε αυτή την περίπτωση απαιτούνται υψηλότερες ποσότητες σπέρματος. Όσο αφορά τα κρυοσυντηρημένα ωάρια, μέχρι σήμερα δεν υπάρχει καμία καθιερωμένη μεθοδολογία κρυοσυντήρησης σε κανένα είδος. Ωστόσο, έχουν παραχθεί απόγονοι με τη γονιμοποίηση τέτοιων ωαρίων σε αγελάδες, πρόβατα και άλογα. Βέβαια, η συγκεκριμένη τεχνική χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση λόγω των βλαβών που προκαλούνται στα ωάρια κατά τη διαδικασία, κάτι το οποίο αναμένεται να είναι δύσκολο. Τέλος, σχετικά με την κρυοσυντήρηση εμβρύων η ίδια έρευνα έδειξε ότι έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στα βοοειδή, με το έτος 2015 να σημειώνεται παρασκευή 700.000 τέτοιων εμβρύων. Η μέθοδος αυτή είναι πολλά υποσχόμενη καθώς απαιτεί και μικρότερο αριθμό σπερματοζωαρίων και η εξέλιξη των τεχνικών της μένει να οδηγήσει στην ανάπτυξη περισσότερο ανθεκτικών στην ψύξη εμβρύων.

Το θετικό σημείο είναι ότι η έρευνα τα τελευταία χρόνια εστιάζει σημαντικά στη διατήρηση των φυλών βοοειδών και την ανάπτυξη της κτηνοτροφίας με διάφορες τεχνικές οι οποίες παρόλο που δεν έχουν τελειοποιηθεί, φαίνεται να υπόσχονται σημαντικά αποτελέσματα. Η δοκιμαστική εφαρμογή τους σε αγελάδες της Βραχυκερατικής φυλής, θα μπορούσε να ανοίξει το δρόμο σε νέες ερευνητικές προοπτικές με στόχο τη μελλοντική αύξηση του πληθυσμού της. Παρόλα αυτά, η χώρα μας ήδη συμμετέχει ενεργά σε προγράμματα διατήρησης της συγκεκριμένης φυλής μέσα από την ίδρυση της Ένωσης Εκτροφών της Ελληνικής Βραχυκερατικής Φυλής που αποσκοπεί στην ενίσχυση των κτηνοτρόφων, καθώς και σε ερευνητικά προγράμματα με χαρακτηριστικό παράδειγμα το BOVISOL PROJECT. Πιο συγκεκριμένα, το πρόγραμμα αυτό αποτελεί συνεργασία τριών χωρών: της Ελλάδας, της Αλγερίας και της Τυνησίας, με στόχο τη διαχείριση των γηγενών φυλών αγελάδων προκειμένου να δοθούν λύσεις για ένα βιώσιμο μέλλον. Ο βασικός σκοπός του προγράμματος αυτού είναι η διατήρηση της γενετικής ποικιλότητας των τοπικών φυλών και η βελτίωση των κτηνοτροφικών συστημάτων. Η Ελλάδα συμμετέχει με αγελάδες των 4 αυτόχθονων φυλών της, δηλαδή της Βραχυκερατικής, της Κατερίνης, της Ελληνικής Κόκκινης και της Συκιάς. Για την πραγματοποίηση του project, το πρώτο βήμα είναι η καταγραφή των πληθυσμών των τοπικών φυλών και στη συνέχεια η ποιοτική αξιολόγηση των προϊόντων κρέατος και γάλατος. Με βάση τα αποτελέσματα τα οποία θα κοινοποιηθούν ενδέχεται η δημιουργία προϊόντων με ετικέτα ποιότητας τροφίμων, καθώς και η πρόταση κτηνοτροφικών και γεωργικών συστημάτων ανθεκτικών στην κλιματική αλλαγή που να παρέχουν οικονομικό όφελος (Boudalia et al., 2020).

Συμπερασματικά, με βάση τα παραπάνω η διατήρηση της Ελληνικής Βραχυκερατικής φυλής κρίνεται απαραίτητη, καθώς ανοίγει το δρόμο για την

εφαρμογή των παραδοσιακών κτηνοτροφικών συστημάτων και αποτελεί κίνητρο για την ανάπτυξη νέων επιστημονικών πεδίων που θα στοχεύουν στην παραγωγή υγιεινών και υψηλής θρεπτικής αξίας προϊόντων. Για την υλοποίηση του παραπάνω στόχου αναγκαία κρίνεται η ενεργή συνεργασία της επιστημονικής κοινότητας με τον γεωργικό και κτηνοτροφικό τομέα για την πρόταση λύσεων και την κατανόηση των τρόπων διαχείρισης και διατήρησης των τοπικών φυλών αγελάδων ενάντια στην κλιματική αλλαγή και των επιπτώσεων της. Η έρευνα αποτελεί μία ανεξάντλητη πηγή γνώσης και συνεχίζοντας τις μελέτες στο μέλλον, η προσπάθεια γενετικής διατήρησης της Βραχυκερατικής φυλής και ανάκαμψης της ελληνικής κτηνοτροφικής δραστηριότητας, φαίνεται να είναι ελπιδοφόρα.

Μελλοντικές κατευθύνσεις έρευνας:

Η συγκεκριμένη ερευνητική προσπάθεια στο μέλλον θα μπορούσε να δώσει τα επιθυμητά αποτελέσματα, υπό δύο νέες προσεγγίσεις:

- 1) Μικροδορυφορικές αναλύσεις, καθώς αποτελούν τα πιο πολυμορφικά τμήματα των γονιδιωμάτων και επιπλέον, λόγω του ουδέτερου τρόπου εξέλιξής τους παρέχουν πληροφορίες για τους πληθυσμούς που διαχωρίστηκαν πρόσφατα.
- 2) Σύγκριση ολόκληρων των γονιδιωμάτων των δύο φυλών (Βραχυκερατική και Holstein), με στόχο την εύρεση γονιδίων που να σχετίζονται με την προσαρμογή.

Βιβλιογραφία

Βραχυκερατική Φυλή - Ένωση Εκτροφέων Ελληνικής Βραχυκερατικής Φυλής Βοοειδών. www.vrachikeratiki.gr

Antil, S., Abraham, J. S., Sripoorna, S., Maurya, S., Dagar, J., Makhija, S., Bhagat, P., Gupta, R., Sood, U., Lal, R., & Toteja, R. (2023). DNA barcoding, an effective tool for species identification: a review. In *Molecular Biology Reports* (Vol. 50, Issue 1, pp. 761–775). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-08015-7>

Antunes, A. M., Stival, J. G. N., Targueta, C. P., de Campos Telles, M. P., & Soares, T. N. (2022a). A Pipeline for the Development of Microsatellite Markers using Next Generation Sequencing Data. *Current Genomics*, 23(3), 175–181. <https://doi.org/10.2174/1389202923666220428101350>

Arif, I. A., Khan, H. A., Bahkali, A. H., al Homaidan, A. A., al Farhan, A. H., al Sadoon, M., & Shobrak, M. (2011). DNA marker technology for wildlife conservation. In *Saudi Journal of Biological Sciences* (Vol. 18, Issue 3, pp. 219–225). <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.03.002>

Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., & Saunders, N. C. (1987). INTRASPECIFIC PHYLOGEOGRAPHY: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18(1), 489–522. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.002421>

Beacon designer, <http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>

Becker, C. A., Collier, R. J., & Stone, A. E. (2020). Invited review: Physiological and behavioral effects of heat stress in dairy cows. In *Journal of Dairy Science* (Vol. 103, Issue 8, pp. 6751–6770). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17929>

Bhaskar, R., & Agnita Sharon, E. (n.d.-b). *Molecular Genetic Approaches in Wildlife Conservation*. www.intechopen.com

Bolaji, U.-F. O., Ajasa, A. A., Ahmed, R. O., Bello, S. F., & Ositanwosu, O. E. (2021). Cattle Conservation in the 21st Century: A Mini Review. *Open Journal of Animal Sciences*, 11(02), 304–332. <https://doi.org/10.4236/ojas.2021.112023>

Boudalia, S., Said, S. ben, Tsiokos, D., Bousbia, A., Gueroui, Y., Mohamed-Brahmi, A., Smeti, S., Anastasiadou, M., & Symeon, G. (2020). Bovisol

project: Breeding and management practices of indigenous bovine breeds: Solutions towards a sustainable future. *Sustainability (Switzerland)*, 12(23), 1–9. <https://doi.org/10.3390/su12239891>

Chaudhary, R., & Maurya, G. K. (2019). Restriction Fragment Length Polymorphism. In *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior* (pp. 1–3). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_175-1

Collier, R. J., Baumgard, L. H., Zimbelman, R. B., & Xiao, Y. (2019). Heat stress: Physiology of acclimation and adaptation. In *Animal Frontiers* (Vol. 9, Issue 1, pp. 12–19). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/af/vfy031>

Conservation of animal genetic resources approaches and. (n.d.).

de Moraes Russo, C. A., & Selvatti, A. P. (2018). Bootstrap and rogue identification tests for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 35(9), 2327–2333. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy118>

Delidow, B. C., Lynch, J. P., Peluso, J. J., & White, B. A. (n.d.). *Polymerase Chain Reaction Basic Protocols*.

Dovolou, E., Giannoulis, T., Nanas, I., & Amiridis, G. S. (2023). Heat Stress: A Serious Disruptor of the Reproductive Physiology of Dairy Cows. In *Animals* (Vol. 13, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ani13111846>

Ensembl, <https://www.ensembl.org/index.html>

Er, T. K., & Chang, J. G. (2012). High-resolution melting: Applications in genetic disorders. In *Clinica Chimica Acta* (Vol. 414, pp. 197–201). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.09.012>

Fonseca, C. R., Paterno, G. B., Guadagnin, D. L., Venticinque, E. M., Overbeck, G. E., Ganade, G., Metzger, J. P., Kollmann, J., Sauer, J., Cardoso, M. Z., Lopes, P. F. M., Oliveira, R. S., Pillar, V. D., & Weisser, W. W. (2021). Conservation biology: four decades of problem- and solution-based research. In *Perspectives in Ecology and Conservation* (Vol. 19, Issue 2, pp. 121–130). Associacao Brasileira de Ciencia Ecologica e Conservacao. <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2021.03.003>

Frankham, R. (2019). Conservation Genetics. In *Encyclopedia of Ecology: Volume 1-4, Second Edition* (Vol. 1, pp. 382–390). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10559-7>

Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., & Hurst, G. D. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: A reappraisal. In *Molecular Ecology* (Vol. 18, Issue 22, pp. 4541–4550). <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04380.x>

Guo, X., Ding, X., Wu, X., Bao, P., Xiong, L., Yan, P., & Pei, J. (2018). Complete mitochondrial genome of Anxi cattle (*Bos taurus*). *Conservation Genetics Resources*, 10(3), 393–395. <https://doi.org/10.1007/s12686-017-0833-y>

Huber, E., Notaro, U. S., Recce, S., Rodríguez, F. M., Ortega, H. H., Salvetti, N. R., & Rey, F. (2020). Fetal programming in dairy cows: Effect of heat stress on progeny fertility and associations with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis functions. In *Animal Reproduction Science* (Vol. 216). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106348>

In silico PCR, <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>

Jalali, M., Zaborowska, J., & Jalali, M. (2017). The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00001-1>

Kim, N., Kwon, J. S., Kang, W. H., & Yeom, S. I. (2023). High-Resolution Melting (HRM) Genotyping. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2638, 337–349. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3024-2_24

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, 62. <https://doi.org/10.3791/3923>

Meridian Bioscience, Sure Clean Up [PCR, qPCR & NGS reagents | Bioline | Meridian Bioscience](#)

Moloney, D. J. F., Collins, C., Holloway, P., & O’Riordan, R. (2023). The Conservationist’s Toolkit: A critical review of the need for a conceptual framework of both in-situ and ex-situ conservation strategies to ensure the success of restoration ecology. In *Biological Conservation* (Vol. 287). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2023.110345>

Nabholz, B., Mauffrey, J. F., Bazin, E., Galtier, N., & Glemin, S. (2008). Determination of mitochondrial genetic diversity in mammals. *Genetics*, 178(1), 351–361. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.073346>

Naranjo-Gómez, J. S., Uribe-García, H. F., Herrera-Sánchez, M. P., Lozano-Villegas, K. J., Rodríguez-Hernández, R., & Rondón-Barragán, I. S. (2021). Heat stress on cattle embryo: gene regulation and adaptation. In *Heliyon* (Vol. 7, Issue 3). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06570>

Papachristou, D., Koutsouli, P., Laliotis, G. P., Kunz, E., Upadhyay, M., Seichter, D., Russ, I., Gjoko, B., Kostaras, N., Bizelis, I., & Medugorac, I. (2020). Genomic diversity and population structure of the indigenous Greek and Cypriot cattle populations. *Genetics Selection Evolution*, 52(1). <https://doi.org/10.1186/s12711-020-00560-8>

Passamonti, M. M., Somenzi, E., Barbato, M., Chillemi, G., Colli, L., Joost, S., Milanesi, M., Negrini, R., Santini, M., Vajana, E., Williams, J. L., & Ajmone-marsan, P. (2021). The quest for genes involved in adaptation to climate change in ruminant livestock. In *Animals* (Vol. 11, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ani11102833>

PCR steps, [PCR Basics | Thermo Fisher Scientific - GR](#)

Primer3, <https://primer3.ut.ee/>

Primer Blast, [Primer designing tool \(nih.gov\)](#)

Type-it ® HRM™ PCR Handbook Sample & Assay Technologies QIAGEN Sample and Assay Technologies. (2009). www.qiagen.com.

Rojas-Downing, M. M., Nejadhashemi, A. P., Harrigan, T., & Woznicki, S. A. (2017). Climate change and livestock: Impacts, adaptation, and mitigation. In *Climate Risk Management* (Vol. 16, pp. 145–163). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.crm.2017.02.001>

Sheeja, T. E., Kumar, I. P. V., Giridhari, A., Minoo, D., Rajesh, M. K., & Babu, K. N. (2021). Amplified Fragment Length Polymorphism: Applications and Recent Developments. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2222, pp. 187–218). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0997-2_12

Stomka, M., Sobalska-Kwapis, M., Wachulec, M., Bartosz, G., & Strapagiel, D. (2017). High resolution melting (HRM) for high-throughput genotyping-limitations and caveats in practical case studies. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18112316>

Sutarno, & Setyawan, A. D. (2015). Review: Genetic diversity of local and exotic cattle and their crossbreeding impact on the quality of Indonesian cattle. In *Biodiversitas* (Vol. 16, Issue 2, pp. 327–354). Society for Indonesian Biodiversity. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d160230>

Timón-Gómez, A., Nývltová, E., Abriata, L. A., Vila, A. J., Hosler, J., & Barrientos, A. (2018). Mitochondrial cytochrome c oxidase biogenesis: Recent developments. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol.

76, pp. 163–178). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.08.055>

Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., & Eggen, A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. In *Genetics Selection Evolution* (Vol. 34, Issue 3, pp. 275–305). EDP Sciences.
<https://doi.org/10.1051/gse:2002009>

Xia, X., Qu, K., Wang, Y., Sinding, M. H. S., Wang, F., Hanif, Q., Ahmed, Z., Lenstra, J. A., Han, J., Lei, C., & Chen, N. (2023). Global dispersal and adaptive evolution of domestic cattle: a genomic perspective. *Stress Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.1007/s44154-023-00085-2>

Zou, Y., Zhang, Z., Zeng, Y., Hu, H., Hao, Y., Huang, S., & Li, B. (2024). Common Methods for Phylogenetic Tree Construction and Their Implementation in R. In *Bioengineering* (Vol. 11, Issue 5). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
<https://doi.org/10.3390/bioengineering11050480>