



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



Συσχέτιση πολυμορφισμών του γονιδίου *ATP1A1* με την εμφάνιση θερμοαντοχής σε εκτρεφόμενες φυλές αγελάδων

Association between *ATP1A1* polymorphisms and thermotolerance in farmed breed of cows

Ζάχου Άγγελος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων καθηγητής

ΖΗΣΗΣ ΜΑΜΟΥΡΗΣ

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών - Πρύτανης Π.Θ.

Μέλος

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΜΟΥΤΟΥ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών

Μέλος

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΣΤΑΜΑΤΗΣ

Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μαμούρη Ζήση, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών και Πρύτανη του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε για την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ την κα Μούτου Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών καθώς και τον κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο, μέλος του εργαστηριακού διδακτικού προσωπικού, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος επιστήμης ζωικής παραγωγής κ. Γιαννούλη Θεμιστοκλή για όλες τις χρήσιμες συμβουλές και την συνεχή βοήθεια και καθοδήγηση του σε όλη τη διάρκεια υλοποίησης της παρούσας εργασίας. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου «Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας» για το κλίμα συνεργασίας και τη φιλική τους διάθεση.

Περίληψη

Η ραγδαία παγκόσμια κλιματική αλλαγή χαρακτηρίζεται από συνεχώς αυξανόμενη περιβαλλοντική θερμοκρασία, η οποία έχει αρνητικό αντίκτυπο στη διαβίωση και στην αναπαραγωγική ικανότητα των παραγωγικών ζώων. Ειδικότερα για τις αγελάδες που είναι το αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας, η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί θερμική καταπόνηση με την εκδήλωση συμπτωμάτων, όπως μειωμένη παραγωγή γάλακτος και υπογονιμότητα, ενώ μπορεί να οδηγήσει ακόμα και στο θάνατο των ζώων σε ακραίες περιπτώσεις. Επομένως, υπάρχει η ανάγκη για εύρεση και μελέτη γονιδίων ή/και μοριακών δεικτών, τα οποία σχετίζονται με την θερμοανθεκτικότητα και θα μπορούσαν να χαρακτηρίσουν τα ζώα παραγωγής ως ανθεκτικά ή ευαίσθητα στην θερμική καταπόνηση. Για τον σκοπό αυτό, επιλέχθηκε για μελέτη το γονίδιο *ATP1A1*, το οποίο κωδικοποιεί την ισομορφία α1 της υπομονάδας α της αντλίας Na^+/K^+ , ενός ενζύμου με κρίσιμο ρόλο στην διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων. Για το γονίδιο *ATP1A1* εντοπίζεται ο πολυμορφισμός G/A στη θέση 14103, στο εξώνιο 14, ο οποίος είχε συσχετιστεί σε προηγούμενη μελέτη με θερμοανθεκτικότητα σε αγελάδες Holstein. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι ο συνδυασμός PCR-SSCP, ενώ ακολούθησε αλληλούχηση των ενισχυμένων με PCR τμημάτων DNA για το γονίδιο. Στην παρούσα μελέτη, τα υπό μελέτη άτομα κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο ομάδες, ως ανθεκτικά και μη ανθεκτικά άτομα του πληθυσμού, ανάλογα με την ικανότητα τους για γονιμοποίηση υπό συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Για το γονίδιο *ATP1A1* οι αλληλομορφικές συχνότητες για το αλληλόμορφο G και A είναι 0,64 και 0,36 για τα ανθεκτικά άτομα, καθώς και 0,61 και 0,39 για τα μη ανθεκτικά άτομα. Σε ότι αφορά τις γονοτυπικές συχνότητες για τους γονότυπους GG, AA, GA είναι 0,59, 0,27, 0,14 για τα ανθεκτικά άτομα και 0,52, 0,29, 0,19 για τα μη ανθεκτικά άτομα, αντιστοίχως. Επομένως, με βάση τα παραπάνω, γίνεται σαφές πως δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις συχνότητες των αλληλομόρφων μεταξύ των δύο ομάδων και πως στον υπό μελέτη πληθυσμό ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δεν φαίνεται να συσχετίζεται με την θερμοανθεκτικότητα.

Λέξεις-κλειδιά : θερμική καταπόνηση, θερμοαντοχή, γονίδιο *ATP1A1*, πολυμορφισμός

Abstract

The rapid global climate change is characterized by ever-increasing ambient temperatures, which have negative impact on living conditions and reproductive capacity of productive animals. Especially for cows, which are the subject of the present study, the temperature rise causes heat stress with the onset of symptoms such as reduced milk production and infertility, while it can also lead even in death in extreme cases. There is a need therefore to find and study genes or/and molecular indicators which associate with thermo-tolerance and could characterize production animals as resistant or sensitive under heat stress. For this purpose, *ATP1A1* gene was selected for study which encodes the $\alpha 1$ isoform of the α subunit of the Na^+/K^+ ATPase, an enzyme which has crucial role in maintaining cell homeostasis. There is a G/A polymorphism localized at nucleotide position 14103 in exon 14 of the gene *ATP1A1* which has been associated with thermo-tolerance in previous studies in Holstein cows. The methods that were applied was PCR-SSCP followed by sequencing of the amplified by PCR fragments of DNA for the gene. In the present study the population of cows was divided into two categories, as resistant and non-resistant individuals, depending on their ability to fertilize under the conditions of heat stress. In the present study the population of cows was categorized into two groups, as resistant and non-resistant individuals, depending on their ability to fertilize under the conditions of heat stress. The allele frequencies for the allele G and A are 0.64 and 0.36, and 0.61 and 0.39 for the resistant and non-resistant individuals, respectively for the polymorphism of the *ATP1A1* gene. As for genotype frequencies for the genotypes GG, AA, GA these are 0,59, 0,27, 0,14 and 0,52, 0,29, 0,19 for the resistant and non-resistant individuals, respectively. Therefore, based on the above, it becomes clear that there are no significant differences in the allele frequencies between the two groups and that in the population of the study, this polymorphism does not seem to be associated with thermo-tolerance.

Key-words : heat stress, thermo-tolerance, *ATP1A1* gene, polymorphism

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή

1.1. <i>Bos taurus</i> (domesticated cattle) - Γενικά χαρακτηριστικά.....	8
1.1.1. Συστηματική κατάταξη της αγελάδας.....	9
1.1.2. Τα οφέλη της κτηνοτροφικής εκμετάλλευσης των βοοειδών.....	10
1.2. Αλλαγή κλίματος και θερμική καταπόνηση - Heat Stress (HS).....	10
1.2.1. Θερμικά ουδέτερη ζώνη (ThermoNeutral Zone – TNZ).....	11
1.2.2. Ορισμός θερμικής καταπόνησης (HS).....	12
1.2.3. Απίες και συνέπειες θερμικής καταπόνησης (HS).....	12
1.2.4. Δείκτης βαθμού θερμικής καταπόνησης.....	13
1.2.5. Επιδράσεις στην φυσιολογία των βοοειδών.....	14
1.2.6. Προβλήματα στην αναπαραγωγή και την γαλακτοπαραγωγή.....	14
1.2.7. Γονίδια συσχετιζόμενα με θερμική καταπόνηση και θερμοανθεκτικότητα.....	15
1.2.8. Το γονίδιο <i>ATP1A1</i>	16
1.2.9. Το ένζυμο Na^+/K^+ - ATPase.....	18
1.3. Μοριακά εργαλεία.....	19
1.3.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – PCR.....	19
1.3.2. Πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformational Polymorphism - SSCP).....	20
1.3.3. Αλληλούχηση και Ανάλυση χρωματογραφημάτων.....	21
1.4. Σκοπός.....	22
2. Υλικά και μέθοδοι.....	22
2.1. Υλικά.....	22
2.2. Μέθοδοι.....	23
2.2.1. Δείγματα.....	23
2.2.2. Απομόνωση DNA.....	23
2.2.3. Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανά δείγμα.....	24
2.2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – (αντίδραση PCR).....	24
2.2.5. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αгарόζης.....	26

2.2.6. Πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformational Polymorphism - SSCP).....	26
2.2.7. Χρώση πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο.....	28
2.2.8. Αλληλούχηση.....	29
3. Αποτελέσματα.....	30
3.1. Απομόνωση DNA.....	30
3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (αντίδραση PCR).....	30
3.3. Πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformational Polymorphism – SSCP).....	31
3.4. Αλληλούχηση.....	32
4. Συζήτηση – Συμπεράσματα.....	34
5. Βιβλιογραφία.....	36

Πίνακας περιεχομένων εικόνων

Εικόνα 1 : Οι διαφορετικές ζώνες θερμοκρασίας κατά την θερμική καταπόνηση.....	11
Εικόνα 2 : Η θέση του γονιδίου <i>ATP1A1</i> στο χρωμόσωμα 3 του <i>B. Taurus</i>	16
Εικόνα 3 : Η λειτουργία της αντλίας Na^+/K^+ και η ροή των ιόντων.....	18
Εικόνα 4 : Χρωματογράφημα από αλληλούχηση DNA.....	21
Εικόνα 5 : Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA.....	30
Εικόνα 6 : Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR (θέσεις 6 και 7) με μάρτυρα μοριακού μεγέθους τμημάτων DNA (100 bp) (θέση 1).....	31
Εικόνα 7 : gel SSCP αποδιατεταγμένων προϊόντων PCR του γονιδίου <i>ATP1A1</i>	31

Πίνακας περιεχόμενων πινάκων

Πίνακας 1 : Η επιστημονική ταξινόμηση της αγελάδας.....	9
Πίνακας 2 : Οι εκκινητές για το γονίδιο <i>ATP1A1</i> για την αντίδραση PCR.....	24
Πίνακας 3 : Σύσταση διαλύματος για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	24
Πίνακας 4 : Σύσταση των συστατικών για την παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης. .27	
Πίνακας 5 : Τα πρότυπα SSCP και ο αριθμός των δειγμάτων που αντιστοιχούν στο καθένα από αυτά.	32

1. Εισαγωγή

Ο οικονομικός κλάδος της κτηνοτροφίας σχετίζεται με την εκμετάλλευση της εκτροφής των παραγωγικών ζώων. Όντας μια από τις παλαιότερες ενασχολήσεις του ανθρώπινου είδους που του εξασφάλιζε τροφή, η κτηνοτροφία άκμαζε και εξελίσσονταν παράλληλα με το μέγεθος του ανθρώπινου πληθυσμού με στόχο την κάλυψη των αυξανόμενων διατροφικών αναγκών. Η διαρκής παραγωγικότητα αυτού του τομέα αύξησε τις κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις ανοίγοντας νέες επαγγελματικές θέσεις στον πρωτογενή τομέα με αποτέλεσμα την ανάπτυξη του εμπορίου των παραγόμενων προϊόντων και άρα συνολικά της οικονομίας. Όλα τα παραπάνω συνετέλεσαν στην ανάδειξη της σημασίας της κτηνοτροφίας όχι μόνο στην οικονομία αλλά και στην διατήρηση του ανθρώπινου κοινωνικού ιστού. Συγχρόνως όμως με την σημασία της γεννούνται προαπαιτούμενα για την βιωσιμότητα της καθώς η παραγωγή των προϊόντων των κτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων απαιτεί τον κατάλληλο συνδυασμό παραγόντων όπως η διατροφή των εκτρεφόμενων ζώων, η σωστή επιλογή του εκτρεφόμενου είδους ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν και γενικά η σωστή διαχείριση του κτηνοτρόφου με σκοπό την μέγιστη απόδοση της κτηνοτροφικής δραστηριότητας.

Ένας από τους σημαντικότερους πληθυσμούς για την διαδικασία της κτηνοτροφίας είναι τα βοοειδή τα οποία εκτρέφονται εδώ και αιώνες όντας πηγή κρέατος, γάλακτος και πολλών γαλακτοκομικών προϊόντων. Για αυτούς τους λόγους είναι διαρκής η αναζήτηση νέων τρόπων βελτίωσης της παραγωγικής διαδικασίας των προϊόντων που προκύπτουν από την κτηνοτροφική τους εκμετάλλευση με τις προσπάθειες να έχουν στραφεί στην σωστή επιλογή των παραμέτρων που επηρεάζουν την εκτροφή των βοοειδών, των οποίων το γονιδίωμα είναι πλήρως χαρτογραφημένο ήδη από το 2009 (USDA Agricultural Research Service).

1.1. *Bos taurus* (domesticated cattle) – Γενικά χαρακτηριστικά

Το είδος αγελάδας *Bos taurus* περιλαμβάνει το σύνολο των εκτρεφόμενων οικόσιπων βοοειδών που είναι διασκορπισμένα σε όλο τον κόσμο, με διαφορές στα χαρακτηριστικά ανάλογα με την προσαρμογή τους στο εκάστοτε περιβάλλον. Στην βόρεια Αφρική, την νότια Ασία και την Ευρώπη υπήρχαν οι άγριοι πρόγονοι τους. (Nowak, 1997).

Είναι ανθεκτικά και μεγαλόσωμα θηλαστικά, με το βάρος τους να πλησιάζει κατά μέσο όρο τα 750 κιλά και το ύψος τους να κυμαίνεται από 124 μέχρι 132 εκατοστά, ενώ η μέση διάρκεια ζωής τους είναι περίπου είκοσι χρόνια. Το τρίχωμα τους είναι κοντό και τα χρώματα τους ποικίλλουν από μαύρο, κοκκινωπό, λευκό μέχρι και καφέ.

Το συγκεκριμένο είδος γεννιέται και εκτρέφεται σε άγονες, χερσαίες περιοχές που δεν καλλιεργούνται είτε ποτίζονται. Είναι απαραίτητο να υπάρχει αρκετός χώρος για την βόσκηση των ζώων.

Τα βοοειδή δημιουργούν τις δικές τους αγέλες καθώς είναι κοινωνικά, ενώ καθοδηγούνται από ένα συγκεκριμένο κυρίαρχο αρσενικό του κοπαδιού (Hinshaw,1993). Οι μήνες που γίνεται κυρίως η αναπαραγωγή είναι κοντά στην άνοιξη όμως μπορεί να πραγματοποιηθεί και όλους του μήνες μέσα στον χρόνο. Η κύηση διαρκεί περίπου εννέα μήνες, ενώ η σεξουαλική ωρίμανση των θηλυκών ολοκληρώνεται περίπου στο ένα έτος ζωής και έπειτα για περίπου δώδεκα έτη μπορεί να συνεχιστεί η ικανότητα τους να ζευγαρώνουν.

Ο άνθρωπος εκμεταλλεύεται τα βοοειδή για το οικονομικό του όφελος το οποίο προέρχεται από τα προϊόντα που παράγουν. Τέτοια προϊόντα είναι τα γαλακτοκομικά που βασίζονται στο γάλα και το τυρί ενώ ως πηγή εσόδων λειτουργεί και το κρέας του ζώου. Με σκοπό την αύξηση της παραγωγής προέκυψαν βοοειδή με βελτιωμένα χαρακτηριστικά μέσω της ανθρώπινης παρέμβασης.

Έχουν αναγνωριστεί παγκοσμίως πάνω από 1.000 φυλές των βοοειδών, κάποιες από τις οποίες εκτρέφονται για συγκεκριμένη χρήση και άλλες έχουν την δυνατότητα να μπορούν να προσαρμοστούν στο εκάστοτε τοπικό κλίμα. Ωστόσο όλες οι φυλές εμπίπτουν σε δυο βασικές κατηγορίες που θεωρούνται είτε δυο στενά συγγενικά είδη είτε δυο υποείδη του ίδιου είδους. Το ένα είδος είναι το *Bos indicus* (*Bos taurus indicus*) επονομαζόμενο και ως zebu. Το κλίμα στο οποίο είναι προσαρμοσμένο είναι το τροπικό και θερμό που επικρατεί σε περιοχές όπως η Ινδία, η Νοτιοανατολική Ασία, η Κίνα και η Αφρική. (Nowak, 1997) Το άλλο είδος είναι το *Bos taurus* (*Bos taurus taurus*) που έχει προσαρμοστεί σε ψυχρότερο κλίμα. Οι περισσότερες φυλές βοοειδών της Μεσογείου, της βόρειας Ασίας και της Ευρώπης ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία.

1.1.1. Συστηματική κατάταξη της αγελάδας

Η ταξινόμηση της αγελάδας *Bos taurus* όπως παρουσιάζεται στον εξής πίνακα (πίνακας 1) :

Πίνακας 1 : Η επιστημονική ταξινόμηση της αγελάδας

Βασίλειο	Ζώα (Animalia)
Φύλο (ή Συνομοταξία)	Χορδωτά (Chordata)
Κλάση (ή Ομοταξία)	Θηλαστικά (Mammalia)
Τάξη	Αρτιοδάκτυλα (Artiodactyla)

Οικογένεια	Βοοειδή (Bovidae)
Υποοικογένεια	Βοοίνες (Bovinae)
Γένος	Βους (Bos)
Είδος	<i>B. taurus</i>

1.1.2. Τα οφέλη της κτηνοτροφικής εκμετάλλευσης των βοοειδών

Η βοοτροφία, ο κλάδος της κτηνοτροφίας που σχετίζεται με την εκτροφή βοοειδών και βουβαλιών, εξασφαλίζει για τον άνθρωπο την κάλυψη διατροφικών και άλλων αναγκών με τα προϊόντα του γάλακτος, του κρέατος και του δέρματος. Επιπλέον παίζει σημαντικό ρόλο για την οικονομία της Ελλάδας αφού η βοοτροφία γαλακτοπαραγωγής αποτελεί το 40,6% της συνολικής παραγωγής γάλακτος με βάση στοιχεία του ΕΛ.Ο.ΓΑ.Κ., ενώ μεγάλο μερίδιο αντιστοιχεί και στην βοοτροφία κρεοπαραγωγής καθώς από το σύνολο των 730.000 εκτρεφόμενων βοοειδών, τα 430.000 προορίζονται για παραγωγή κρέατος. Έτσι, στόχος είναι η βελτίωση της απόδοσης της Ελληνικής παραγωγής με την εξασφάλιση των ιδανικών συνθηκών για την εκτροφή των βοοειδών, παρά τις δυσκολίες λόγω των κλιματικών συνθηκών της χώρας μας. Τέτοιες δυσκολίες οφείλονται στις μακρές περιόδους ξηρασίας και υψηλών θερμοκρασιών που είναι χαρακτηριστικές για το μεσογειακό κλίμα της χώρας μας και θα επεκταθούν σε ένταση και διάρκεια σύμφωνα με στοιχεία του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Περιβάλλοντος (ΕΕΑ) καθορίζοντας και το μελλοντικό πλαίσιο βιωσιμότητας της κτηνοτροφίας.

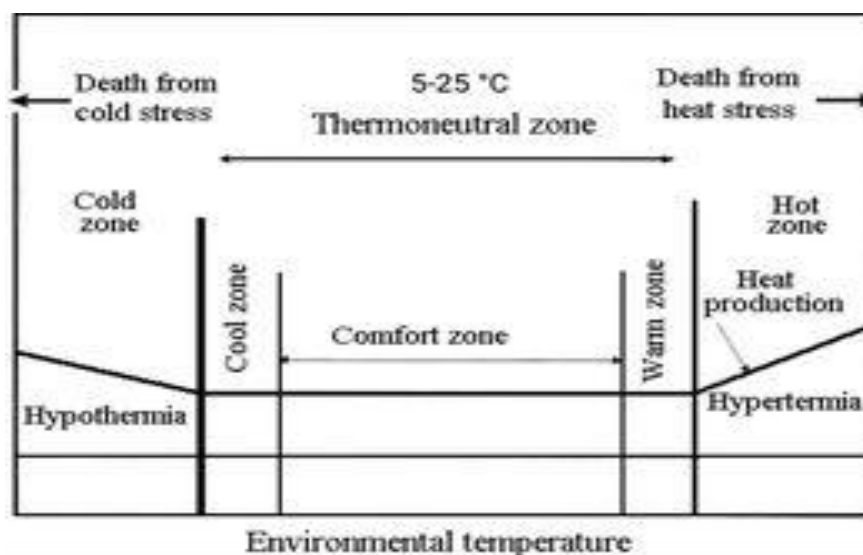
1.2. Αλλαγή κλίματος και θερμική καταπόνηση - Heat Stress (HS)

Με βάση τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η απότομη αύξηση της μέσης θερμοκρασίας της επιφάνειας του πλανήτη τα τελευταία εκατό περίπου χρόνια και η διαρκής αύξηση της έως το 2100 όπως αναμένεται από την Διακυβερνητική Επιτροπή για την Κλιματική Αλλαγή επιδεινώνει δραστικά την βιωσιμότητα των οικοσυστημάτων και του κάθε περιβάλλοντος επιδρώντας ουσιαστικά και στην εκτροφή παραγωγικών ζώων όπως τα βοοειδή (IPCC, 2007). Ο συνδυασμός των στοιχείων της θερμοκρασίας, της υγρασίας, των βροχοπτώσεων, της κίνησης του αέρα, της ακτινοβολίας, της βαρομετρικής πίεσης και του ιονισμού συγκροτεί το λεγόμενο κλίμα, δηλαδή τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν σε μια περιοχή γενικά ή για μεγάλο χρονικό διάστημα (Ramendra Das et al, 2015). Τυχόν αλλαγές στο κλίμα επηρεάζουν το σύστημα ζωικής παραγωγής, καθώς υπό υψηλές θερμοκρασίες και σχετική υγρασία διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ της παραγόμενης μεταβολικής θερμότητας στο εσωτερικό του ζώου και της διασποράς της στο περιβάλλον. Αυτή η ανισορροπία δημιουργεί θερμική καταπόνηση (heat stress) (Atrian & Shahryar, 2012). Καθώς αυξάνεται το Heat Stress αντιστοίχως αυξάνεται και το οξειδωτικό Stress (Bernabucci et al, 2002), με συνέπεια μακροσκοπικές και μικροσκοπικές αλλαγές στην συμπεριφορά και

την φυσιολογία του ζώου και μείωση της παραγωγικότητας και της αναπαραγωγικής ικανότητας των εκτρεφόμενων ζώων. Τέτοια αποτελέσματα συμβαίνουν ειδικότερα σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές με σοβαρές δυσμενείς επιπτώσεις στις τοπικές οικονομίες, εξαιτίας της διαρκώς αυξανόμενης θερμοκρασίας του περιβάλλοντος.

1.2.1. Θερμικά ουδέτερη ζώνη (ThermoNeutral Zone- TNZ)

Ως θερμικά ουδέτερη ζώνη (Thermo Neutral Zone - TNZ) ορίζεται το εύρος της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος στο οποίο ένας οργανισμός δαπανά τα ελάχιστα δυνατά ποσά ενέργειας για να διατηρήσει την ομοιόστασή του και την φυσιολογική θερμοκρασία του σώματός του (Nardone et al., 2006). Συγκεκριμένα για εκτρεφόμενες φυλές αγελάδων το εύρος της TNZ κυμαίνεται από 16-25° C. Σε αυτό το εύρος οι αγελάδες διατηρούν την φυσιολογική θερμοκρασία του σώματος τους περίπου στους 38° C ανάλογα με την ηλικία, την φυλή, την διατροφή και συγκεκριμένα χαρακτηριστικά κάθε ζώου, όπως για παράδειγμα το τρίχωμα και το δέρμα. Σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος εκτός της θερμικά ουδέτερης ζώνης ενεργοποιείται η διαδικασία της θερμορρύθμισης μέσω της οποίας επέρχεται ισορροπία μεταξύ της εσωτερικής παραγωγής θερμότητας και της απώλειας θερμικού φορτίου από το σώμα ώστε να διατηρηθεί σταθερή η φυσιολογική θερμοκρασία του ζώου. Τέτοιο παράδειγμα θερμορρύθμισης αποτελεί η μείωση της πρόσληψης ξηράς τροφής από τα ζώα, που μπορεί να φτάσει μέχρι και 0,85 kg για κάθε αύξηση 1° C πάνω από την θερμικά ουδέτερη ζώνη τους (Rhoades et al., 2009)



Πηγή εικόνας : Προσαρμοσμένη εικόνα από Soumya Dash et al., 2016

Εικόνα 1 : Οι διαφορετικές ζώνες θερμοκρασίας κατά την θερμική καταπόνηση

1.2.2. Ορισμός θερμικής καταπόνησης (HS)

Ως θερμική καταπόνηση ορίζεται το σύνολο των εξωγενών παραγόντων που δρουν σε ένα ζώο και ως αποτελέσματα έχουν την αύξηση της θερμοκρασίας του σώματος του. Προκαλείται έτσι μια φυσιολογική αντίδραση που συνοδεύεται από υπερβολική ροή ενέργειας εσωτερικά του σώματος που οδηγεί σε μείωση των αποθεμάτων ενέργειας που χρησιμοποιείται από το ζώο για την παραγωγή γάλακτος και την ανάπτυξη. Αυτή η μείωση έχει ως συνέπεια την διαταραχή των φυσιολογικών διαδικασιών των ζώων και την σταδιακή απορρύθμιση της ομοιόστασης του σώματος με επιπτώσεις που κυμαίνονται από χαμηλή ποιότητα ζωής και μειωμένη παραγωγικότητα μέχρι και τον θάνατο (Atrian & Shahryar, 2012). Παράγοντες με αυξητική επίδραση στην θερμική καταπόνηση θεωρούνται οι αυξημένες θερμοκρασίες του περιβάλλοντος, η ηλιακή ακτινοβολία, η υγρασία και η ταχύτητα του άνεμου. Αντίθετα, ως εξισορροπητικοί παράγοντες δύναται να λειτουργήσουν μηχανισμοί που επιτρέπουν στους οργανισμούς την προσαρμογή στις υψηλές θερμοκρασίες με την ταυτόχρονη αύξηση της εξωτερικής καθαρής ροής ενέργειας.

1.2.3. Αιτίες και συνέπειες θερμικής καταπόνησης (HS)

Η εμφάνιση της θερμικής καταπόνησης δημιουργείται όταν αυξάνεται η μέση θερμοκρασία του σώματος του ζώου. Τέτοια αύξηση θερμοκρασίας του σώματος προκύπτει όταν διαταράσσεται η ισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή θερμότητας και στην ικανότητα αποδέσμευσης του θερμικού φορτίου. Υψηλή μεταβολική δραστηριότητα προκαλεί υψηλή παραγωγή θερμότητας η οποία σε συνδυασμό με υψηλές θερμοκρασίες στο περιβάλλον μπορεί να οδηγήσουν σε συνθήκες heat stress. Επιπλέον η υγρασία του κλίματος μπορεί να επηρεάσει τον ρυθμό αποδέσμευσης θερμότητας μέσω της αναπνοής και της εφίδρωσης των βοοειδών. Τα εκτρεφόμενα είδη αγελάδων διατηρούν την μέση θερμοκρασία τους περίπου στους $38,8^{\circ}\text{C} \pm 0,5$. Αυτή η θερμοκρασία αυξάνεται όταν οι αγελάδες βιώνουν το αίσθημα της ζέστης σε θερμοκρασίες αέρα άνω των 21°C , υγρασίας άνω του 70%, αυξημένης ηλιακής ακτινοβολίας και χαμηλής κίνησης αέρα (West, 2003).

Συνέπειες της ύπαρξης των παραπάνω συνθηκών ή τυχόν συνδυασμός τους είναι η αύξηση της εφίδρωσης και η αύξηση του ρυθμού της αναπνοής. Στην πρώτη περίπτωση έχουμε σημαντική μείωση του νερού στο σώμα και άρα αύξηση κατανάλωσης του σε τέτοιο βαθμό που να δημιουργεί την αίσθηση κορεσμού μειώνοντας την κατανάλωση τροφής. Στην δεύτερη περίπτωση, αυτή του αυξημένου ρυθμού αναπνοής οδηγούμαστε σε διαταραχή της οξεοβασικής ισορροπίας του σώματος λόγω αυξημένης έκκρισης διοξειδίου του άνθρακα. Ουσιαστικά, το ζώο δαπανά περισσότερη ενέργεια για την διατήρηση της θερμοκρασίας του σώματος του σε σταθερά επίπεδα, μειώνοντας την διαθέσιμη ενέργεια που διαθέτει για παραγωγικές εργασίες, είτε αυτές αφορούν την ικανότητα αναπαραγωγής, είτε την απόδοση της γαλακτοπαραγωγής (Sejan, 2013). Επιπλέον, κατά την εκθεσή τους σε υψηλές θερμοκρασίες, οι αγελάδες έχοντας αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης (Nanas et al., 2021), καταναλώνουν μικρότερες ποσότητες τροφής και παράγουν μικρότερες ποσότητες γάλακτος (Liu et al., 2019)., ενώ η θερμική καταπόνηση επηρεάζει αρνητικά και την πέψη της τροφής, λόγω μείωσης του σάλιου και διατάραξης του pH του προστομάχου των μηρυκαστικών

(Nardone et al., 2010). Εκτός της ποσότητας γάλακτος επηρεάζεται και η ποιότητα του, αφού κάτω από συνθήκες ζεστού και υγρού περιβάλλοντος έχει αναφερθεί μείωση του ποσοστού των λιπαρών, των μη στέρεων λιπαρών και των πρωτεϊνών του γάλακτος κατά 39,7%, 18,9% και 16,9% αντίστοιχα (Kadzere et al., 2002). Περαιτέρω συμπτώματα της θερμικής καταπόνησης αποτελούν ο λήθαργος, η ευερεθιστότητα, η ανάγκη για εύρεση σκίασης, που εντάσσονται στις αλλαγές συμπεριφοράς και η ταχυπαλμία, η μειωμένη ροή αίματος στα όργανα και η μειωμένη μηρυκαστική λειτουργία (Atrian & Shahyar, 2012). Επιπρόσθετες αρνητικές επιρροές εντοπίζονται τόσο στο αναπαραγωγικό σύστημα αρσενικών και θηλυκών ατόμων, με την δεύτερη κατηγορία ατόμων να υφίσταται βλάβη στα ωοθυλάκια όταν η θερμοκρασία του σώματος ξεπεράσει τους 40° C (Roth et al., 2000).

Επίσης, τα ωάρια των αγελάδων που καταπονούνται εξαιτίας της υψηλής θερμοκρασίας χάνουν την ικανότητα τους για γονιμοποίηση και την ανάπτυξη στο στάδιο της βλαστοκύστης, γεγονός που επιδρά στην ωριμανσή τους (Gendelman et al., 2012a & 2012b, Singh et al., 2013). Επιπλέον, προβλήματα στειρότητας σε ταύρους και μείωση ποιότητας του σπέρματος λόγω εποχιακών επιδράσεων έχουν αναφερθεί σε αρκετές μελέτες (Cardozo et al., 2006, Balic et al., 2012), ενώ κατά την θερμική καταπόνηση δημιουργούνται επιβλαβή αποτελέσματα και κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη στα βοοειδή. Το θερμικό στρες παρεμποδίζοντας την σύνθεση πρωτεϊνών δύναται να προκαλέσει μέχρι και θάνατο του εμβρύου (Edwards & Hansen, 1996), αν και συνήθως οι συνέπειες του περιορίζονται σε υποσιτισμό και καθυστέρηση της ανάπτυξης του εμβρύου (Tao & Dahl, 2013).

1.2.4. Δείκτης βαθμού θερμικής καταπόνησης

Ο Δείκτης Θερμοκρασίας-Υγρασίας THI (Temperature Humidity Index) αποτελεί τον βασικό δείκτη εκτίμησης της θερμικής καταπόνησης και χρησιμοποιείται στον τομέα των βοοειδών για την ακριβή περιγραφή του βαθμού του στρες που δέχονται λόγω κλιματικών αλλαγών του περιβάλλοντος τους. Όσο οι τιμές του δείκτη αυξάνονται, τόσο οι επιπτώσεις του θερμικού στρες επιδεινώνονται. Τιμές THI μικρότερες του 72 θεωρούνται φυσιολογικές και δεν έχουν καμία επίδραση στα επίπεδα στρες του ζώου, σε τιμές μεταξύ 72-78 παρατηρείται ήπιο στρες, με τα βοοειδή να αναζητούν σκιερό μέρος και να αυξάνουν σταδιακά τον ρυθμό αναπνοής. Περαιτέρω αύξηση της τιμής σε επίπεδα που κυμαίνονται μεταξύ 79-88 αντιστοιχεί σε μέτριο στρες και έναρξη συμπτωμάτων εκδήλωσης θερμικής καταπόνησης, όπως μείωση πρόσληψης τροφής και αναπαραγωγικών επιδόσεων εξαιτίας της αποσταθεροποίησης της θερμοκρασίας του σώματος. Τα επίπεδα στρες ανεβαίνουν παραπάνω στις τιμές 89-98 με έντονη επιδείνωση των προαναφερθέντων συμπτωμάτων και εμφάνιση σημαντικών δυσκολιών στην αναπαραγωγική διαδικασία. Στην τελευταία κατηγορία τιμών THI ανήκουν όσες τιμές ξεπερνούν το 99, εύρος στο οποίο τα επίπεδα στρες φτάνουν σε σημείο να απειλούν με θάνατο το ζώο (Soumya Dash et al, 2016).

1.2.5. Επιδράσεις στην φυσιολογία των βοοειδών

Η θερμική καταπόνηση επιδρά αρνητικά στην υγεία των βοοειδών προκαλώντας διαταραχές στην φυσιολογία τους, που προκύπτουν εξαιτίας αλλαγών στην πρόσληψη τροφής και νερού, στην οξεοβασική ισορροπία και στα επίπεδα του οξειδωτικού στρες. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η μειωμένη αναπαραγωγική δραστηριότητα και γαλακτοπαραγωγή.

Οι εκτρεφόμενες αγελάδες προσλαμβάνουν μικρότερες ποσότητες τροφής σε θερμοκρασίες άνω των 25 °C με σκοπό την μείωση της θερμοκρασίας του σώματος τους, καθώς η διαδικασία της πρόσληψης τροφής στα μηρυκαστικά αποτελεί σημαντική πηγή θερμότητας (Kadzere et al., 2002). Ταυτόχρονα μειώνεται και το σωματικό τους βάρος.

Κατά την θερμική καταπόνηση οι αγελάδες γαλακτοπαραγωγής αφυδατώνονται ταχύτερα με αποτέλεσμα αντιστάθμισης την αυξημένη πρόσληψη νερού. Το νερό έχει βασικό ρόλο στην διατήρηση της ομοιόστασης και της ομοιοθεμίας όταν αυτές διαταράσσονται κατά την θερμική καταπόνηση (Beede & Collier, 1985), ενώ επίσης το γάλα που παράγουν οι αγελάδες αποτελείται κατά 87% από νερό με υψηλές συγκεντρώσεις ηλεκτρολυτών (Shalit et al., 1991).

Επιπλέον, η θερμική καταπόνηση διαταράσσει και την οξεοβασική ισορροπία καθώς υπό τέτοιες συνθήκες η αύξηση του ρυθμού αναπνοής και η εφίδρωση επιφέρει αύξηση των επιπέδων CO₂ στους πνεύμονες. Ως συνέπεια δημιουργείται η ανάγκη διατήρησης της ομοιόστασης του pH του αίματος με την έκκριση διττανθρακικού στα ούρα για την διατήρηση της αναλογίας ανθρακικό οξύ: διττανθρακικό στο αίμα (Schneider et al., 1984).

Τα βοοειδή υπό συνθήκες θερμικού στρες παράγουν αυξημένα δραστικά είδη οξειδωτικού (ROS) στους διαφορετικούς ιστούς, γεγονός που επιφέρει αντίστοιχη αύξηση του οξειδωτικού στρες επιβαρύνοντας την υγεία των ζώων. Σε αντιδιαστολή με τα ROS διάφοροι ενζυμικοί μηχανισμοί υπάρχουν με σκοπό την διατήρηση της κανονικής φυσιολογίας του ζώου όπως η καταλάση και η υπεροξειδική δισμουτάση που λειτουργούν και ως δείκτες του οξειδωτικού στρες. Τα επίπεδα τέτοιων δεικτών στα βοοειδή ήταν υψηλότερα κατά την διάρκεια της καλοκαιρινής περιόδου σε σχέση με την εαρινή, λόγω των πιο υψηλών θερμοκρασιών (Yatoo et al., 2014)

1.2.6. Προβλήματα στην αναπαραγωγή και την γαλακτοπαραγωγή

Η θερμική καταπόνηση επηρεάζει αρνητικά την παραγωγή και την ποιοτική σύσταση του γάλακτος από εκτρεφόμενες φυλές αγελάδων, ενώ υπό συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας του αέρα και υγρασίας επηρεάζονται οι κυτταρικές λειτουργίες με πιθανές βλάβες στα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος και στα δυο φύλα των βοοειδών (Das et al., 2016). Οι αλλαγές στις περιβαλλοντικές συνθήκες και η ύπαρξη υψηλής θερμοκρασίας ασκούν επιρροή στην γαλακτοπαραγωγή καθώς πυροδοτούν την μειωμένη πρόσληψη τροφής με σκοπό την διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ εισροής και εκροής ενέργειας από το σώμα

των ζώων. Το θερμικό στρες αναγκάζει τις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής να τραφούν με μικρότερες ποσότητες και άρα να μην μπορούν να καλύψουν τις ενεργειακές ανάγκες για γαλακτοπαραγωγή επαρκώς, ενώ υφίστανται προσαρμογές σε σχέση με τον μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών μειώνοντας την ποσότητα του γάλακτος που παράγουν έως και 50% (Baumgard & Rhoads, 2013). Βέβαια, αν και υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την γαλακτοπαραγωγή, όπως η διατροφική διαχείριση και το στάδιο της γαλουχίας των ζώων, παρατηρήθηκε ότι τιμές του δείκτη THI μεταξύ 68-78 μειώνουν την πρόσληψη ξηράς τροφής κατά 9,6 % και την παραγωγή γάλακτος κατά 21%, ενώ σε τιμές THI άνω του 72 κατά την θερινή περίοδο το παραγόμενο γάλα έχει μικρότερη συγκέντρωση σε λιπαρά και πρωτεΐνες (Bouras et al., 2002). Σε ότι αφορά την επίδραση της θερμικής καταπόνησης σε σχέση με το στάδιο της γαλουχίας, αγελάδες που βρίσκονται στο μέσο της γαλουχίας έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία απέναντι στο θερμικό στρες σε σχέση με αυτές που βρίσκονται σε αρχικά ή τελικά στάδια της γαλουχίας, αφού έχει παρατηρηθεί μείωση της παραγωγής του γάλακτος στην πρώιμη γαλουχία κατά 14%, ενώ στην μέση γαλουχία κατά 35% (Bernabucci et al., 2010). Αρνητικές επιδράσεις έχει η θερμική καταπόνηση και στην αναπαραγωγική απόδοση θηλυκών και αρσενικών ατόμων, με την πρώτη κατηγορία εκτρεφόμενων ζώων, αυτή των θηλυκών ατόμων, να έχει μικρότερης διάρκειας και έντασης οίστρο, δηλαδή περίοδο γονιμότητας και σεξουαλικής δεκτικότητας (Singhal et al., 1984). Ανάλογα με τα επίπεδα θερμικού στρες που εμφανίζουν σε υψηλές θερμοκρασίες οδηγούνται σε μειωμένα επίπεδα γονιμότητας που προκύπτουν εξαιτίας της χαμηλής έκκρισης οιστραδιόλης. Επηρεάζεται έτσι αρνητικά ο οίστρος, η παραγωγή γοναδοτροπίνης, η ωορρηξία, η μεταφορά γαμετών και τελικά η ίδια η διαδικασία της γονιμοποίησης (Wolfenson et al., 2000). Επίσης, κατά την θερινή περίοδο εξαλείφεται σχεδόν το μεγαλύτερο μέρος του οίστρου των θηλυκών αγελάδων και με βάση παρατηρήσεις των Chebel et al. (2004) μειώνονται κατά 20-27% τα επίπεδα σύλληψης.

Αντιστοίχως σημαντικό ρόλο παίζει και ο βαθμός γονιμότητας των αρσενικών ατόμων των εκτρεφόμενων φύλων στη σύλληψη και τον σχηματισμό ενός βιώσιμου εμβρύου. Αυτός ο βαθμός επηρεάζεται εξίσου από το θερμικό στρες με τα κυριότερα προβλήματα να εντοπίζονται στο σπέρμα των ταύρων. Η διάφορα θερμοκρασίας στο περιβάλλον αναλόγως της εποχής και του κλίματος επιδρά στην ποιότητα του σπέρματος, στον όγκο και την εσωτερική θερμοκρασία των όρχεων και τελικώς στην αναπαραγωγική απόδοση των ταύρων (Cardozo et al., 2006). Παρόμοια αποτελέσματα μειωμένης αναπαραγωγικής απόδοσης πρόεκυψαν όταν θερμικά στρεσαρισμένα σπερματοζώαρια εμφάνισαν μειωμένα ποσοστά γονιμοποίησης συγκριτικά με φυσιολογικά σπερματοζώαρια εκτός συνθηκών θερμικής καταπόνησης (Rahman et al., 2013).

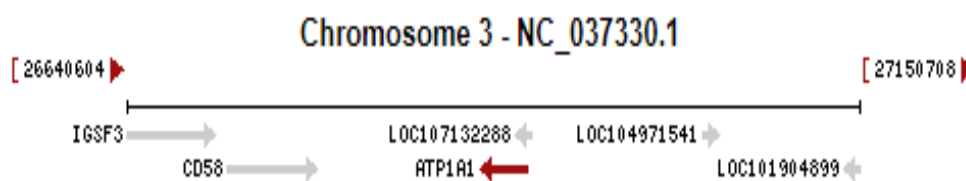
1.2.7. Γονίδια συσχετιζόμενα με θερμική καταπόνηση και θερμοανθεκτικότητα

Με βάση τα ζητήματα που προκύπτουν από τις επιπτώσεις της θερμικής καταπόνησης, εξαιτίας αυξημένων θερμοκρασιών και υγρασίας, γίνεται φανερό ότι δημιουργείται η ανάγκη για περιορισμό των συνεπειών της θερμικής καταπόνησης με γενετική επιλογή συγκεκριμένων ατόμων από τις εκτρεφόμενες φυλές αγελάδων που διαθέτουν το κατάλληλο

γενετικό προφίλ για να τους προσδώσει αντοχή απέναντι στο θερμικό στρες. Η θερμοανθεκτικότητα αποτελεί την ικανότητα προσαρμογής των οργανισμών στις δυσμενείς επιπτώσεις των υψηλών θερμοκρασιών ενός κλίματος με την ανάπτυξη μηχανισμών όπως ο μειωμένος μεταβολικός ρυθμός που έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη ανάπτυξη και παραγωγή γάλακτος στα βοοειδή (Hansen, 2007). Για την επιλογή των κατάλληλων αγελάδων υπάρχει η ανάγκη εντοπισμού εκείνων των γονιδίων με άμεση σχέση με το θερμικό στρες, με απώτερο σκοπό την αύξηση της γαλακτοπαραγωγής κατά τους θερινούς μήνες και την ευκολότερη επιβίωση υπό συνθήκες θερμικής καταπόνησης (Kadzere et al., 2002, Das et al., 2016). Το θερμικό στρες επάγει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες θερμικής καταπόνησης (HSP), οι οποίες έχουν ως βασικό σκοπό την προστασία από την υπερθερμία και την εγκεφαλική ισχαιμία κατά την διάρκεια εγκεφαλικού επεισοδίου (Lee et al., 2006). Οι HSPs έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάκτηση των κύτταρων από στρεσογόνες καταστάσεις, καθώς λειτουργούν ως σήμα κινδύνου για το ανοσοποιητικό σύστημα. Η κύρια πρωτεΐνη HSP, της οποίας η υψηλή συγκέντρωση στα κύτταρα αποτελεί και δείκτη θερμο-αντοχής είναι η HSP70, που επάγεται από υψηλές ή χαμηλές θερμοκρασίες, στέρση νερού, στέρση οξυγόνου ή παρουσία τοξινών στο εσωτερικό του κυττάρου. Άλλα γονίδια των οποίων η έκφραση επάγεται από την θερμική καταπόνηση με στόχο την προσαρμογή του οργανισμού είναι τα γονίδια *ATP1A1*, *ATP1B1*, *ATP1B2* που ανήκουν σε ένα σύνολο περίπου 50 γονιδίων με ξεχωριστές λειτουργίες από τις HSPs (Sonna et al., 2002). Τα παραπάνω γονίδια κωδικοποιούν υπομονάδες του συμπλόκου Na^+/K^+ ATPase και παρατηρήθηκε πως σχετίζονται με την θερμο-αντοχή (Das et al., 2015, Wang et al., 2011).

1.2.8. Το γονίδιο *ATP1A1*

Το γονίδιο *ATP1A1* (GeneID 2821440) χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 3 του *B. taurus*, έχει συνολικό μέγεθος 3746 bp και αποτελείται από 23 εξώνια και 22 ιντρόνια.



Πηγή εικόνας : ncbi (gene) για γονίδιο με GeneID 282144

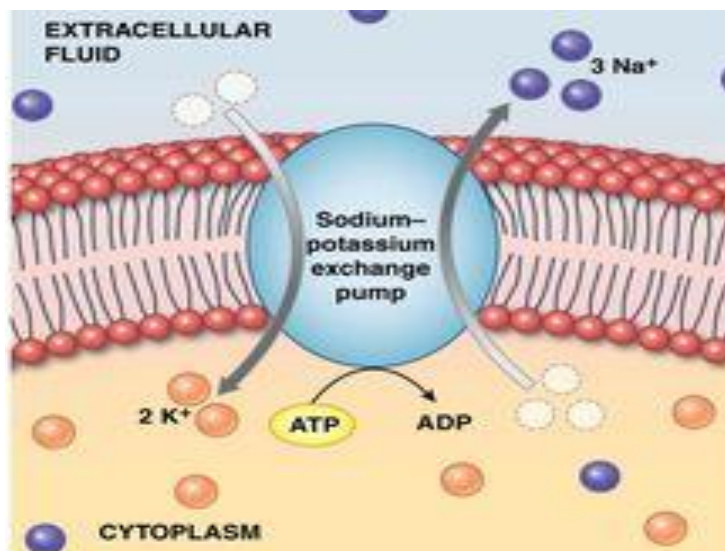
Εικόνα 2 : Η θέση του γονιδίου *ATP1A1* στο χρωμόσωμα 3 του *B. taurus*

Κωδικοποιεί την α1 ισομορφή, την κύρια ισομορφή της α υπομονάδας της αντλίας Na^+/K^+ , η οποία διαπερνά την πλασματική μεμβράνη, αποτελείται από α και β υπομονάδες και έχει κρίσιμο ρόλο στην διατήρηση της ισορροπίας των βαθμιδώσεων συγκέντρωσης των ιόντων

νατρίου και καλίου εντός και εκτός κυττάρων διατηρώντας την ομοιόσταση των τελευταίων. Εξίσου σημαντικό ρόλο έχει και για την ρύθμιση των ενεργειακών αναγκών του κυττάρου, λόγω της δυνατότητας της να μεταφέρει θρεπτικά συστατικά και μεταβολίτες διαμέσω της πλασματικής μεμβράνης (Kashyap et al., 2015). Σε περιπτώσεις θερμικής καταπόνησης μεταβάλλεται η έκφραση κάποιων γονιδίων ως απόκριση στο θερμικό στρες. Ένα από αυτά τα γονίδια έχει αναγνωρισθεί ότι είναι το γονίδιο *ATP1A1* στα βοοειδή (Liu et al., 2010, Das et al., 2015), αφού παρουσιάζει ιδιαίτερη ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες (Morel et al., 1998), το οποίο επάγεται υπό συνθήκες θερμικής καταπόνησης (Bernabucci et al., 2002) και διαταράσσει την ομοιόσταση (Kaushik et al., 2019). Τυχόν αλλαγές στην έκφραση του γονιδίου *ATP1A1* που οφείλονται σε υψηλές θερμοκρασίες του περιβάλλοντος έχει ως αποτέλεσμα μεταβολές στην βαθμίδωση συγκέντρωσης των ιόντων νατρίου και καλίου στα άκρα της πλασματικής μεμβράνης, καθώς έχει παρατηρηθεί σε αρκετές μελέτες μείωση της έκφρασης του γονιδίου σε αγελάδες σε καταστάσεις θερμικής καταπόνησης (Liu et al., 2019, Das et al., 2015, Kashyap et al., 2015, Pires et al., 2021). Τα κύτταρα πρέπει να ελέγχουν την ενδοκυτταρική συγκέντρωση ιόντων για να μπορούν να παρεμποδίζουν δυσμενείς για αυτά επιδράσεις και να διευκολύνουν εξειδικευμένες λειτουργίες. Τα περισσότερα κύτταρα των θηλαστικών περιέχουν υψηλή συγκέντρωση K^+ και χαμηλή συγκέντρωση Na^+ σε σχέση με το εξωκυτταρικό μέσο, η οποία επιτυγχάνεται από την ύπαρξη ενός συστήματος μεταφοράς, το οποίο είναι ένα ενζυμο με την ονομασία αντλία Na^+/K^+ ή αλλιώς Na^+/K^+ ATPase. Αυτή η ονομασία οφείλεται στο ότι η υδρόλυση ATP παρέχει την απαραίτητη ενέργεια στην αντλία για την ενεργό μεταφορά του Na^+ εκτός του κυττάρου και του K^+ στο εσωτερικό του κυττάρου, λειτουργία που εξασφαλίζει τις κατάλληλες βαθμιδώσεις συγκέντρωσης των συγκεκριμένων ιόντων. Για την υδρόλυση ATP είναι πρώτα απαραίτητη η δέσμευση Na^+ και K^+ , ενώ η αντλία λειτουργεί με κατεύθυνση ανοδική από χαμηλή συγκέντρωση ιόντων προς υψηλή. Έχοντας τόσο κρίσιμο ρόλο η αντλία Na^+/K^+ στις βαθμιδώσεις συγκέντρωσης της μεμβράνης στα κύτταρα ανώτερων οργανισμών, ελέγχει τον όγκο του κυττάρου, καθοδηγεί την ενεργό μεταφορά σακχάρων και αμινοξέων και καθιστά συγκεκριμένα είδη κυττάρων (νευρικά και μυϊκά) ηλεκτρικά διεγέρσιμα. Μάλιστα, είναι τέτοια η σημασία της αντλίας Na^+/K^+ ATPase στον βασικό μεταβολισμό, που σε κατάσταση ηρεμίας στα κύτταρα των θηλαστικών καταναλώνει το 19-28% της συνολικής παραγωγής ATP (Xu, 2005). Έτσι, όσα γονίδια εμπλέκονται στην κωδικοποίηση του ενζύμου και ειδικότερα το γονίδιο *ATP1A1*, το οποίο κωδικοποιεί την υπομονάδα α της αντλίας, έχει κρίσιμο ρόλο σε σχέση με την θερμό-ανθεκτικότητα και σε προηγούμενες μελέτες (Liu et al., 2010, Kashyap et al., 2015) εντοπίστηκαν δύο σημειακοί πολυμορφισμοί που χαρτογραφούνται στο εξώνιο 14 και στο εξώνιο 17 του γονιδίου. Στην πρώτη περίπτωση, για το εξώνιο 14, εντοπίστηκε αντικατάσταση γουανίνης με αλανίνη στη νουκλεοτιδική θέση 14103 με αποτέλεσμα συνώνυμη μετάλλαξη και στην δεύτερη περίπτωση, για το εξώνιο 17, εντοπίστηκε αντικατάσταση κυτοσίνης με αδενίνη στη νουκλεοτιδική θέση 2789 του γονιδίου με αποτέλεσμα συνώνυμη μετάλλαξη (Liu et al., 2010). Έχοντας επισημάνει την σημασία του γονιδίου *ATP1A1*, στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε για ανάλυση το τμήμα DNA του εξωνίου 14 του γονιδίου *ATP1A1*.

1.2.9. Το ένζυμο Na^+/K^+ - ATPase

Το ένζυμο Na^+/K^+ ATPase έχει ως βασική λειτουργία την διατήρηση των βαθμιδώσεων συγκέντρωσης ιόντων νατρίου και καλίου μεταξύ της μεμβράνης του κυττάρου. Είναι μία ετεροδιμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από τις υπομονάδες-α και τις υπομονάδες-β σε ίσες μοριακά ποσότητες. Η υπομονάδα α διαθέτει 6-10 διαμεμβρανικές περιοχές, εξωκυτταρικές και κυτταροπλασματικές περιοχές, όπου υπάρχουν θέσεις εξωκυτταρικής σύνδεσης ιόντων K^+ , θέσεις σύνδεσης ιόντων Na^+ και ATP ενδοκυτταρικά και θέση φωσφορυλίωσης, η οποία αποτελεί και κέντρο ρύθμισης της λειτουργίας της ATPάσης. Επιπλέον, η υπομονάδα α διαθέτει και το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Με μοριακό βάρος 112 kDa και υδρόφοβο χαρακτήρα η υπομονάδα α είναι υπεύθυνη για την καταλυτική δραστηριότητα και την άμεση ρύθμιση της συνολικής δράσης του ενζύμου μέσω των αντιδράσεων της φωσφορυλίωσης και της αποφωσφορυλίωσης. Η υπομονάδα β διαθέτει 1-4 διαμεμβρανικές περιοχές, εξωκυτταρικές περιοχές που αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό της υπομονάδας και κυτταροπλασματικές περιοχές με υδρόφιλο χαρακτήρα και αμινοτελική περιοχή. Η συγκεκριμένη υπομονάδα έχει κρίσιμο ρόλο στον τελικό σχηματισμό του ετεροδιμερούς α/β και στην μεταφορά του συμπλόκου στην πλασματική μεμβράνη.



Πηγή εικόνας : 2015 Pearson Education, Inc.

Εικόνα 3 : Η λειτουργία της αντλίας Na^+/K^+ και η ροή των ιόντων

Τα στάδια λειτουργίας του ενζύμου είναι διαδοχικά και συγκεκριμένα, ενώ αν παρεμποδιστεί κάποιο στάδιο αναστέλλεται ολόκληρη η δράση του, αυξάνοντας ενδοκυτταρικά την συγκέντρωση ιόντων νατρίου. Κύρια λειτουργία του είναι η ενεργός μεταφορά, με υδρόλυση ATP, τριών ιόντων Na^+ στο εξωτερικό του κυττάρου και δύο ιόντων K^+ στο εσωτερικό του κυττάρου. Αρχικά γίνεται η δέσμευση του ATP στην υπομονάδα α, στο ενδοκυτταρικό τμήμα του ενζύμου. Έπεται η σύνδεση των ιόντων νατρίου και η υδρόλυση του ATP, με σκοπό την φωσφορυλίωση του ενζύμου. Αλλάζει έτσι η διαμόρφωση της αντλίας και κλείνει η εσωτερική

οπή καθιστώντας μη δυνατή την περαιτέρω σύνδεση ιόντων νατρίου. Η διαμόρφωση του ενζύμου που προκύπτει μετά την φωσφορυλίωση έχει χαμηλή συγγένεια με τα ιόντα νατρίου, τα οποία απελευθερώνονται προς το εξωτερικό του κυττάρου. Στην συνέχεια δημιουργούνται θέσεις πρόσδεσης των ιόντων καλίου εξωκυτταρικά και ακολουθεί αποφωσφορυλίωση που αντίστοιχα μεταβάλλει την διαμόρφωση της αντλίας στην αρχική της κατάσταση απελευθερώνοντας τα ιόντα καλίου στο εσωτερικό του κυττάρου. Αντίστοιχα η διαμόρφωση της αντλίας που προκύπτει μετά την αποφωσφορυλίωση έχει χαμηλή συγγένεια με τα ιόντα καλίου.

1.3. Μοριακά εργαλεία

1.3.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - PCR

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR έχει κεντρικό ρόλο στην μοριακή βιολογία και χρησιμοποιείται για την στοχευμένη ενίσχυση ενός ή μερικών αντιγράφων ενός τμήματος DNA. Έτσι προκύπτουν σε μικρό χρονικό διάστημα χιλιάδες έως εκατομμύρια αντίγραφα της ενισχυμένης αλληλουχίας DNA. Αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές εξαιτίας της αξιοπιστίας της στον πολλαπλασιασμό ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA. Η PCR ενισχύει μια συγκεκριμένη περιοχή ενός κλώνου του DNA-στόχου με την ενίσχυση στις περισσότερες μεθόδους PCR να στοχεύει τμήματα DNA μεταξύ 0,1 και 10 kbp, αν και μερικές τεχνικές επιτρέπουν την ενίσχυση τμημάτων μεγέθους έως 40 kbp. Η ποσότητα του προϊόντος που ενισχύθηκε, προσδιορίζεται από τα διαθέσιμα υποστρώματα στην αντίδραση, που σταδιακά περιορίζονται καθώς εξελίσσεται η αντίδραση.

Το είδος των συστατικών και των αντιδραστηρίων που απαιτεί κάθε αντίδραση PCR είναι τα εξής :

- Ένα πρότυπο DNA το οποίο περιέχει την περιοχή στόχο για ενίσχυση.
- Το ένζυμο DNA πολυμεράση.
- Δυο εκκινητές DNA οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί προς τα 3' άκρα καθενός από τους κλώνους sense και anti-sense του DNA στόχου.
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια ή dNTPs, που αποτελούν τα δομικά στοιχεία που χρησιμοποιεί η DNA πολυμεράση για να συνθέσει την νέα αλυσίδα DNA.
- Ένα ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχει κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη βέλτιστη δραστηριότητα και σταθερότητα της DNA πολυμεράσης.
- Δισθενή κατιόντα μαγνησίου (Mg).
- ddH₂O

Η αντίδραση συνήθως διεξάγεται σε τελικό όγκο 50 μl σε μικρούς σωλήνες αντίδρασης και πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά ως εξής :

Στάδιο 1

Αποδιάταξη: Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95° C για περίπου 30 sec έως 1 min.

Στάδιο 2

Υβριδισμός εκκινητών: Οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA σε θερμοκρασία 55-65° C για περίπου 30 sec έως 1 min

Στάδιο 3

Επιμήκυνση: Η πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) με βάση την αρχή της συμπληρωματικότητας σε σχέση με τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA που λειτουργεί ως εκμαγείο. Για να συνθέσει τη νέα αλυσίδα η Taq πολυμεράση αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72° C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της.

Γίνεται διαδοχική επανάληψη των παραπάνω σταδίων από 25 έως 35 φορές. Η συσκευή η οποία εκτελεί την PCR ονομάζεται θερμικός κυκλοποιητής (Thermal cycler) και διαθέτει θερμαινόμενη πλάκα που δύναται να εναλλάσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια.

1.3.2. Πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformational Polymorphism - SSCP)

Η αρχή στην οποία στηρίζεται η τεχνική SSCP είναι ότι το δίκλωνο DNA όταν αποδιατάσσεται, παίρνει μια ειδική διαμόρφωση, που εξαρτάται από την αρχική αλληλουχία των νουκλεοτιδίων, Αυτή η αρχική αλληλουχία είναι υπεύθυνη για τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις στο εσωτερικό του μορίου.

Η κινητικότητα των μονόκλωνων προϊόντων PCR στην ανάλυση SSCP, εξαρτάται από την δευτεροταγή δομή τους. Έτσι τα προϊόντα PCR με διαφορές στην αλληλουχία, ή ακόμα και με προσθήκες ή απαλοιφές, θα έχουν διαφορετική κινητικότητα στην πηκτή πολυακρυλαμίδης, το τελικό προϊόν της διαδικασίας της τεχνικής SSCP, σε σχέση με την

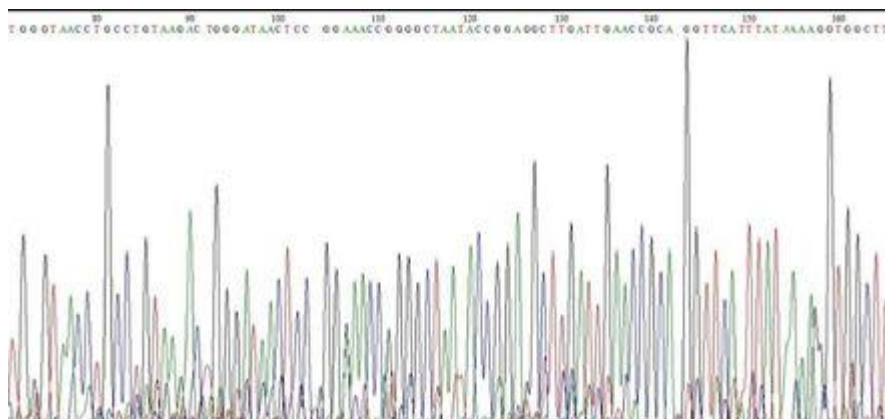
αρχική αλληλουχία, εξαιτίας της διαφοροποιημένης αναδιπλωμένης δομής της, ακόμα και αν οι διαφορές στην αλληλουχία περιορίζονται σε μόνο μία βάση. Για αυτόν τον λόγο θεωρείται τεχνική με υψηλή διακριτική ικανότητα (Kenshi Hayashi, 1991).

Η τεχνική SSCP χρησιμοποιείται τόσο για τον εντοπισμό άγνωστων μεταλλάξεων, όσο για την μελέτη των παραλλαγών μιας αλληλουχίας. Σε ότι αφορά την μελέτη παραλλαγών η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων γίνεται με τη σύγκριση με κάποια πρότυπα, έτσι ώστε να υπάρχει ταύτιση των γονοτύπων με βάση τα χαρακτηριστικά πρότυπα των ζωνώσεων, και όχι των μεταλλάξεων (Kakavas et al, 2008). Έτσι, μέσω των διαφορετικών προτύπων ζωνώσεων που προκύπτουν από το πήκτωμα ακρυλαμίδης και την ομαδοποίηση των δειγμάτων με ταυτόσημο πρότυπο υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσης της ύπαρξης πολυμορφισμών (SNPs) εντός ενός γονιδίου, ώστε σε επόμενο στάδιο να επιλεγθούν αντιπροσωπευτικά δείγματα που θα σταλούν για αλληλούχηση.

1.3.3. Αλληλούχηση και ανάλυση χρωματογραφημάτων

Η αλληλούχηση προβάλλεται με τη μορφή χρωματογραφημάτων, των οποίων γίνεται επεξεργασία με κατάλληλα προγράμματα (πχ. BioEdit) για την εξαγωγή των πληροφοριών της αλληλούχησης.

Το χρωματογράφημα αποτελείται από 4 καμπύλες διαφορετικού χρώματος, κάθε μια από τις οποίες αντιστοιχεί σε διαφορετικό νουκλεοτίδιο.



Εικόνα 4 : Χρωματογράφημα από αλληλούχηση DNA

Οι καμπύλες με κόκκινο και μαύρο χρώμα αντιπροσωπεύουν νουκλεοτίδια θυμίνης (T) και γουανίνης (G), αντίστοιχα, ενώ καμπύλες με πράσινο και μπλε χρώμα αντιστοιχούν σε νουκλεοτίδια αδενίνης (A) και κυτοσίνης (C). Η διαδοχική σειρά των νουκλεοτιδίων της υπό

μελέτης αλληλουχίας εντοπίζεται με την παρατήρηση των χρωμάτων των διαδοχικών καμπυλών του χρωματογραφήματος.

Η αλληλούχηση γίνεται και για τις δύο αλυσίδες που προήλθαν από την αντίδραση PCR με την χρήση του ζεύγους εκκινητών. Έτσι, στο επόμενο στάδιο διενεργείται ομοπαράθεση των δύο αλληλουχιών που προέκυψαν από τα χρωματογραφήματα, με την βοήθεια του προγράμματος βιοπληροφορικής ClustalX, για τυχόν εντοπισμό λαθών κατά την διάρκεια της διαδικασίας. Με την ολοκλήρωση των παραπάνω σταδίων είναι πλέον διαθέσιμη η πλήρης αλληλουχία του τμήματος του υπό μελέτη γονιδίου.

1.4. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η συσχέτισή του πολυμορφισμού στο γονίδιο *ATP1A1* με την εμφάνιση θερμο-ανθεκτικότητας στα άτομα του υπό μελέτη πληθυσμού εκτρεφόμενων αγελάδων της φυλής Holstein από Ελληνικές φάρμες.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Υλικά

Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία :

Acetic Acid

Acrylamide

Agarose

Bis-Acrylamide

Ammonium persulfate

NaCl
dNTPs
EDTA
EtOH
Proteinase K
NaOH
Formaldehyde
MgCl₂
NaBH₄
Potassium Acetate
TEMED
AgNO₃
100bp Ladder

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Δείγματα

Έγινε μελέτη σε 55 δείγματα αίματος, που συγκεντρώθηκαν την χρονική περίοδο Αυγούστου-Σεπτεμβρίου 2018 από διάφορες κτηνοτροφικές μονάδες της περιφέρειας Θεσσαλίας από αγελάδες στις οποίες έγινε τεχνητή σπερματέγχυση. Τα άτομα του πληθυσμού των αγελάδων διαχωρίστηκαν ανάλογα με το αν κατέστησαν έγκυα, στο διάστημα στο οποίο έγινε η λήψη των δειγμάτων. Σχηματίστηκαν, έτσι, δύο κατηγορίες ατόμων. Η μία κατηγορία περιλαμβάνει 14 άτομα του πληθυσμού που κατάφεραν να γονιμοποιηθούν και ορίζονται ως ανθεκτικά άτομα απέναντι στην θερμική καταπόνηση, ενώ η άλλη 41 άτομα που δεν κατέστησαν έγκυα και αποτελούν τα μη ανθεκτικά άτομα.

2.2.2 Απομόνωση DNA

Μετά την συγκέντρωση των δειγμάτων αίματος από τις αγελάδες ακολουθεί η απομόνωση γενετικού υλικού. Για την απομόνωση του DNA έγινε χρήση του PureLink™ Genomic DNA Mini kit από την εταιρία Invitrogen σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.2.3 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανά δείγμα

Μετά το αρχικό βήμα της απομόνωσης γίνεται ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος της διαδικασίας είτε με φωτομέτρηση των δειγμάτων είτε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1% w/v. Για την φωτομέτρηση θα πρέπει να έχει γίνει αρχικά αραίωση 2 μl διαλύματος του απομονωμένου DNA σε 98 μl ddH₂O. Έπειτα μετράται η απορρόφηση στα 260 nm και στα 280 nm και υπολογίζεται ο λόγος των δύο απορροφήσεων A_{260nm}/A_{280nm}. Για να χαρακτηριστεί ένα διάλυμα νουκλεϊκών οξέων καθαρό πρέπει η τιμή του λόγου των δύο απορροφήσεων να είναι 1,8. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτική αгарόζης περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.5.

2.2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (αντίδραση PCR)

Πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση του υπό μελέτη γονιδίου (*ATP1A1*) και έγινε χρήση των εξής εκκινητών (πίνακας 2) :

Πίνακας 2 : Οι εκκινητές για το γονίδιο *ATP1A1* για την αντίδραση PCR

Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή
ATP1A1EX14-F	5'-TGA-GCA-ACC-AAC-GCA-ACA-CT-'3
ATP1A1EX14-R	5'-TGG-AAC-TGC-AAT-CAC-TGA-GGT-C-'3

Οι αλληλουχίες των εκκινητών για το γονίδιο *ATP1A1* σχεδιάστηκαν για να την ενίσχυση ειδικών τμημάτων του γονιδίου. Συγκεκριμένα, οι εκκινητές ATP1A1EX14-F/R σχεδιάστηκαν με το λογισμικό Oligo 6.12, βασιζόμενο στην αλληλουχία του γονιδίου *ATP1A1* (GenBank accession No.NC_007301.3) για την ενίσχυση ενός τμήματος 330 bp που περιλαμβάνει τμήμα του εξωνίου 14 (Liu et al, 2010).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η σύσταση του διαλύματος της αντίδρασης PCR (πίνακας 3) :

Πίνακας 3 : Σύσταση διαλύματος για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητες per PCR tube (50μl)
Buffer Kappa Taq	10x	1x	5 μl
MgCl ₂	50mM	2mM	1 μl
Εκκινητής Forward	50pM	1pM	1 μl

Εκκινητής Reverse	50pM	1pM	1 μ l
DNA πολυμεράση (Kappa Taq)	5 U/ μ L	1 U	0,2 μ l
dNTPs	10mM	0,2mM	1 μ l
DNA εκμαγείο	100 ng		
ddH ₂ O	μέχρι τα 50 μ l		

Οι συνθήκες για την ενίσχυση των τμημάτων του γονιδίου ATP1A1 είναι οι εξής:

Στάδιο 1

Αρχική αναδιάταξη : 95°C για 5 min

Στάδιο 2

Βήμα 1 - Αποδιάταξη : 95°C για 40 sec

Βήμα 2 - Υβριδοποίηση : 57°C (ATP1A1EX14) για 40 sec

Βήμα 3 - Επιμήκυνση : 72°C για 40 sec

Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται για 35 κύκλους

Στάδιο 3

Βήμα 1 - Τελική επιμήκυνση : 72°C για 10 min

Βήμα 2 - Συντήρηση των δειγμάτων : 4°C

Στη συνέχεια τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v, με σκοπό την επιβεβαίωση της επιτυχημένης ολοκλήρωσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

2.2.5. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτική αγαρόζη

Για τον διαχωρισμό των τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους διενεργείται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης . Πραγματοποιείται η παρασκευή του πηκτώματος της αγαρόζης με χρήση διαλύματος 1x TAE, στο οποίο διαλύεται ποσότητα αγαρόζης ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που πρέπει να διαχωριστούν, καθώς αντιστοιχεί συγκεκριμένη περιεκτικότητα σε αγαρόζη στο εκάστοτε μέγεθος. Το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδικό καλούπι για να πολυμεριστεί.

Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης το οποίο χρησιμοποιείται με στόχο την οπτικοποίηση του DNA μετά από την απομόνωση του διαλύονται 0,5 gr και 1 gr αγαρόζης σε 50ml και 100ml 1x TAE Electrophoresis Buffer αντίστοιχα.

Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης το οποίο χρησιμοποιείται για ηλεκτροφόρηση των ενισχυμένων τμημάτων DNA για τον έλεγχο επιτυχίας της αντίδρασης PCR, διαλύονται 0,8gr και 1,6gr αγαρόζης σε 50ml και 100ml 1x TAE Electrophoresis Buffer αντίστοιχα.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, με σκοπό τον έλεγχο της επιτυχίας είτε της απομόνωσης του DNA είτε της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, προστίθενται 3 μl loading buffer σε κάθε μία από τις δύο περιπτώσεις. Απο το απομονωμένο DNA χρησιμοποιούνται 3 μl για την ηλεκτροφόρηση του, ενώ από το ενισχυμένο DNA μετά την αντίδραση PCR χρησιμοποιούνται 6 μl. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ειδική συσκευή, με ηλεκτρική τάση στα 100-150 Volts και ακολουθεί παρατήρηση του πηκτώματος σε λάμπα υπεριώδους φωτός.

2.2.6. Πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformational Polymorphism - SSCP)

Η αρχή στην οποία βασίζεται η τεχνική SSCP είναι ότι η κινητικότητα των μονόκλωνων προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης εξαρτάται από την δευτεροταγή δομή τους, και συνεπώς από την αρχική αλληλουχία των νουκλεοτιδίων.

Σε πρώτο στάδιο παρασκευάζεται η πηκτική πολυακρυλαμίδης, η οποία επιλέχθηκε να είναι 10% διότι τα προϊόντα PCR έχουν μεγέθη 330 bp. Για την παρασκευή της πηκτικής πολυακρυλαμίδης 10%, στην οποία ηλεκτροφορούνται τα δείγματα προς μελέτη, χρησιμοποιούνται τα συστατικά όπως φαίνεται παρακάτω (πίνακας 4) με την εξής σύσταση :

Πίνακας 4 : Σύσταση των συστατικών για την παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης.

Ακρυλαμίδη	6,25 gr
Bis-ακρυλαμίδη (N,N-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο)	0,16 gr
Glycerol 50%	6,25 ml
10x TBE Buffer	3,2 ml
TEMED	62,5 μl
APS 20% w/v	375 μl
ddH ₂ O	Έως 62,5 ml

Η bis-ακρυλαμίδη, έχει κρίσιμο ρολο στην δημιουργία γεφυρών μεταξύ των αλυσίδων των πολυμερών του ακρυλαμίδιου και άρα στον βαθμό πολυμερισμού. Έτσι συντελεί στην σύνταξη ενός τρισδιάστατου πολυμερούς πλέγματος, το οποίο διαθέτει πόρους το μέγεθος των οποίων είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης των μονομερών του ακρυλαμίδιου. Ο ρόλος της γλυκερόλης είναι η αποτροπή της διάχυση του δείγματος στην πηκτή. Το υπερθειικό αμμώνιο (APS) εκκινεί την αντίδραση του πολυμερισμού και καταλύει την δημιουργία των ελεύθερων ριζών, ενώ ο φωτοχημικός καταλύτης, N,N, τετραμεθυλοεθυλενοδιαμίνη (TEMED), επιταχύνει τον πολυμερισμό αποσυνθέτοντας το υπερθειικό ιόν.

Στην αρχή της διαδικασίας ζυγίζεται σε ηλεκτρονικό ζυγό η ακρυλαμίδη και η bis-ακρυλαμίδη, και τοποθετούνται σε ένα ποτήρι ζέσεως. Προστίθεται το 10x TBE buffer και ένα μέρος από το συνολικό όγκο του ddH₂O και ακολουθεί η ανάδευση τους με τη βοήθεια ενός μαγνήτη. Έπειτα γίνεται διήθηση του διαλύματος σε ογκομετρικό κύλινδρο με τη χρήση διηθητικού χαρτιού και συμπληρώνεται ο υπόλοιπος όγκος ddH₂O μέχρι τα 62,5ml. Τελικώς, προστίθενται το TEMED και το APS 20%w/v στην κατάλληλη ποσότητα, σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, τα οποία θα επιταχύνουν τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης. Μετά από ήπια ανάδευση το διάλυμα ακρυλαμίδης τοποθετείται σε ειδική κατασκευή για κάθετη ηλεκτροφόρηση για να πολυμεριστεί, σε περίπου 30 λεπτά. Η συσκευή αυτή διαθέτει δύο γυάλινες πλάκες (τζάμια) που ευθυγραμίζονται στην κάτω επιφάνεια της συσκευής και διαχωρίζονται μεταξύ τους από ειδικά τμήματα (spacers) που δημιουργούν ενδιάμεσα κενά όπου θα τοποθετηθεί το διάλυμα ακρυλαμίδης.

Στη συνέχεια τοποθετείται η πηκτή στην συγκεκριμένη συσκευή κατακόρυφης ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθενται το ρυθμιστικό διάλυμα των ηλεκτροδίων, 0,5x TBE buffer. Για κάθε δείγμα που πρόκειται να φορτωθεί στην πηκτή προστίθενται 10 μl loading

buffer καθώς και 10 μl από το PCR προϊόν και ακολουθεί αποδιάταξη σταδιακά με εναλλαγές θερμοκρασιών για συγκεκριμένες περιόδους, όπως φαίνεται παρακάτω :

Στάδιο 1

Αποδιάταξη στους 95 °C για 2'

Στάδιο 2

Αποδιάταξη στους 97 °C για 2'

Στάδιο 3

Αποδιάταξη στους 99 °C για 9'

Σε επόμενη φάση τα δείγματα παραμένουν στον πάγο μέχρι την τοποθέτηση στην πηκτή, όταν και ξεκινά η ηλεκτροφόρηση στα 220 volts σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 ώρες.

2.2.7. Χρώση πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο

Μετά την ηλεκτροφόρηση της πηκτής πολυακρυλαμίδης, η οποία διαρκεί 20 ώρες ακολουθεί η χρώση της για την οπτικοποίηση του αποτελέσματος. Για τη χρώση των πηκτών παρασκευάζονται με συγκεκριμένα βήματα 3 διαφορετικά διαλύματα, με την εξής σύσταση :

2.2.7.1. Διαλύματα για χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδης

Διάλυμα 1

Ογκομετρούνται 400ml ddH₂O (2 x 200ml), προστίθενται σε δοχείο μαζί με 500μl οξικού οξέος (acetic acid) και αναδεύονται.

Διάλυμα 2

Προστίθενται σε έναν ογκομετρικό σωλήνα 200ml ddH₂O και 0,3gr νιτρικού αργύρου (AgNO₃) μαζί με μαγνήτη για να εξασφαλιστεί συνεχής ανάδευση του διαλύματος μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση του νιτρικού αργύρου.

Διάλυμα 3

Προστίθενται σε ένα ποτήρι ζέσεως 200ml ddH₂O, 3gr υδροξειδίου του Νατρίου (NaOH), 1ml φορμαλδεύδη και 0,01gr βοροϋδρίδιο του Νατρίου (NaBH₄), του οποίου η προσθήκη γίνεται τελευταία καθώς έχει διαβρωτικές ιδιότητες.

2.2.7.2. Στάδια χρώσης της πηκτής

Αρχικώς γίνεται προσεκτικός διαχωρισμός της πηκτής από τα τζάμια που συνετέλεσαν προηγουμένως στην κατασκευή της και η πηκτική τοποθετείται σε ειδικό δοχείο για να ακολουθήσει η χρώση της.

Στάδιο 1

Στο ειδικό δοχείο προστίθενται 200ml από το διάλυμα 1 και μαζί με την πηκτική αναδεύονται για 2 λεπτά. Το διάλυμα 1 απορρίπτεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται.

Στάδιο 2

Προστίθεται το διάλυμα 2 με τον νιτρικό άργυρο (AgNO_3) και τοποθετείται για συνεχή ανάδευση για 15 λεπτά.

Στάδιο 3

Ακολουθούν 2 διαδοχικές πλύσεις της πηκτής με ddH_2O για 2 λεπτά η κάθε μια.

Στάδιο 4

Προστίθεται το διάλυμα 3 και γίνεται ανάδευση έως την εμφάνιση των κλασμάτων της ηλεκτροφόρησης (ζωνώσεις) στην επιφάνεια της πηκτής.

Στάδιο 5

Πραγματοποιείται μία τελευταία πλύση της πηκτής με ddH_2O , και αυτή αποθηκεύεται σε μεμβράνη για να είναι εφικτή η παρατήρηση της και η σύγκριση των πρότυπων ζωνώσεων.

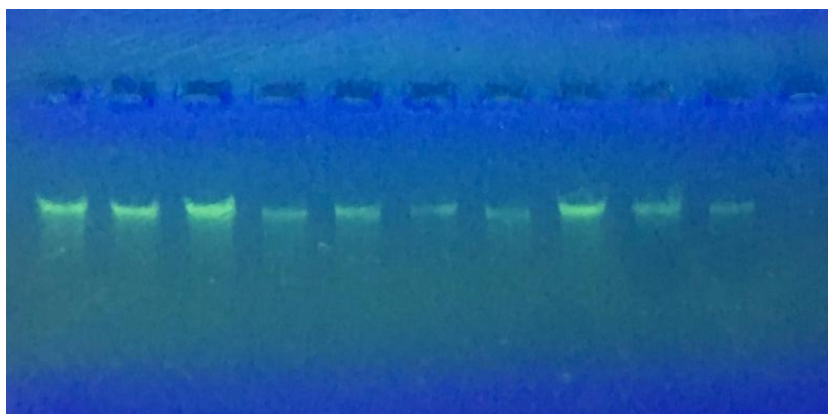
2.2.8. Αλληλούχηση

Τελικώς, παρατηρούνται οι πηκτές της SSCP, με στόχο τον εντοπισμό των πιθανών προτύπων και τα προϊόντα PCR των επιλεγόμενων δειγμάτων αποστέλλονται για αλληλούχηση σε κάποια εταιρεία για να ολοκληρωθεί απόλυτα η διαδικασία. Πριν την αποστολή, τα δείγματα υφίστανται καθαρισμό, ο οποίος γίνεται με τη χρήση του kit SureClean για να απομακρυνθούν εκκινητές, υπολειπόμενα συστατικά της αντίδρασης PCR, καθώς και παραπροϊόντα. Έπειτα η εταιρεία αποστέλλει τα αποτελέσματα υπό τη μορφή χρωματογραφήματος, μέσω του οποίου και με τη χρήση των κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής είναι δυνατή η εξαγωγή της επιθυμητής αλληλουχίας.

3. Αποτελέσματα

3.1. Απομόνωση DNA

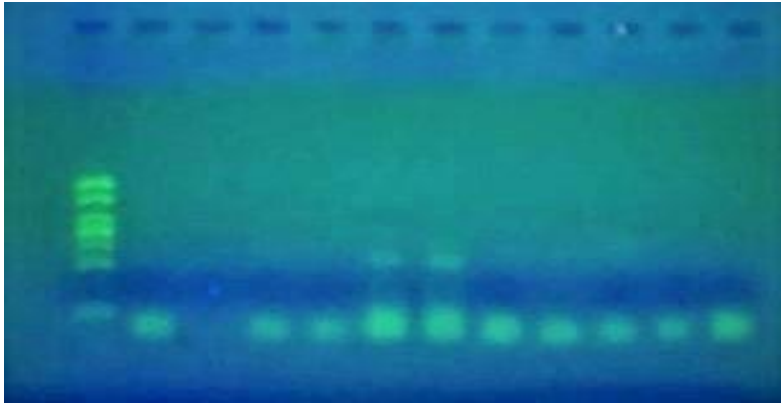
Η απομόνωση γενετικού υλικού από τα δείγματα αίματος που συλλέχθηκαν από τα άτομα των πληθυσμών των αγελάδων αξιολογήθηκε ποιοτικά και ποσοτικά με φωτομέτρηση μετά από αραίωση των δειγμάτων και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v. Από την ηλεκτροφόρηση του DNA προέκυψαν διακριτές έντονες ζώνες απομονωμένου γενετικού υλικού όπως ενδεικτικά φαίνεται παρακάτω στην εικόνα 5 :



Εικόνα 5 : Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA

3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (αντίδραση PCR)

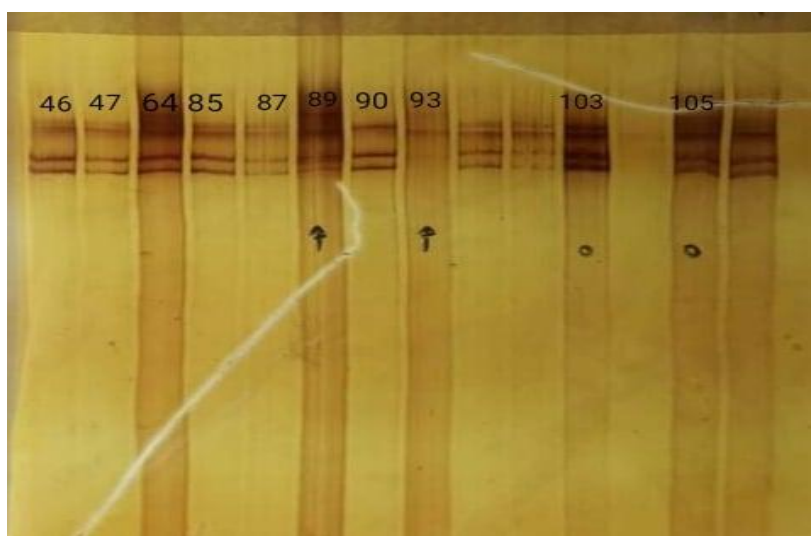
Με την χρήση του κατάλληλου ζεύγους εκκινητών έγινε εφικτή η ενίσχυση του τμήματος του εξωνίου 14 του γονιδίου *ATP1A1* με την μέθοδο της PCR, όπως περιγράφηκε στην πειραματική διαδικασία. Η επιβεβαίωση της επιτυχούς ενίσχυσης έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR που προέκυψαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v. Από τα 107 δείγματα απομονωμένου DNA ενισχύθηκαν τα 55. Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR με μάρτυρα μοριακού μεγέθους τμημάτων DNA (100bp ladder), όπως ενδεικτικά φαίνεται παρακάτω στην εικόνα 6 :



Εικόνα 6 : Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR (θέσεις 6 και 7) με μάρτυρα μοριακού μεγέθους τμημάτων DNA (100 bp) (θέση 1).

3.3. Πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformational Polymorphism - SSCP)

Μετά την ενίσχυση του εξωνίου 14 του γονιδίου *ATP1A1*, ακολούθησε αποδιάταξη των προϊόντων PCR και κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10% σε θερμοκρασία δωματίου στα 220 volts για περίπου 20 ώρες σύμφωνα με την μέθοδο SSCP, όπως περιγράφηκε στην πειραματική διαδικασία. Μετα την ηλεκτροφόρηση και την χρώση των πηκτών με νιτρικό άργυρο ακολούθησε παρατήρηση του κάθε gel που προέκυψε για την διαπίστωση της παρουσίας διαφορετικών προτύπων ζωνώσεων με στόχο την ομαδοποίηση των δειγμάτων και την αποστολή αντιπροσωπευτικών για αλληλούχιση. Τα διαφορετικά πρότυπα ζωνώσεων, αν και έχουν αρκετές ομοιότητες, ξεχωρίζουν όπως φαίνεται στην εικόνα 7 :



Εικόνα 7 : gel SSCP αποδιατεταγμένων προϊόντων PCR του γονιδίου *ATP1A1*

Στο παράδειγμα της εικόνας 7, όπου παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποια δείγματα σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, διακρίνουμε για τις δυάδες δειγμάτων 89, 93 και 103, 105, διαφορετικές ζώνες σε σχέση με τις αντίστοιχες ζώνες των υπόλοιπων δειγμάτων, γεγονός που μπορεί να προϋποθέτει την ύπαρξη ενός πολυμορφισμού. Στις ενδιάμεσες θέσεις μεταξύ των δειγμάτων 93, 103 και 105 δεν μπορεί να γίνει σωστή αξιολόγηση των ζωνώσεων εξαιτίας ελλιπούς χρώσης του gel με νιτρικό άργυρο. Με την ίδια λογική επιλέχθηκαν και τα υπόλοιπα δείγματα που ομαδοποιήθηκαν σε 5 πρότυπα (πίνακας 5) και αντιπροσωπευτικό δείγμα των προτύπων στάλθηκε για αλληλούχιση.

Πίνακας 5 : Τα πρότυπα SSCP και ο αριθμός των δειγμάτων που αντιστοιχούν στο καθένα από αυτά.

Πρότυπα	Αριθμός δειγμάτων
πρότυπο 1	4
πρότυπο 2	27
πρότυπο 3	14
πρότυπο 4	6
πρότυπο 5	4

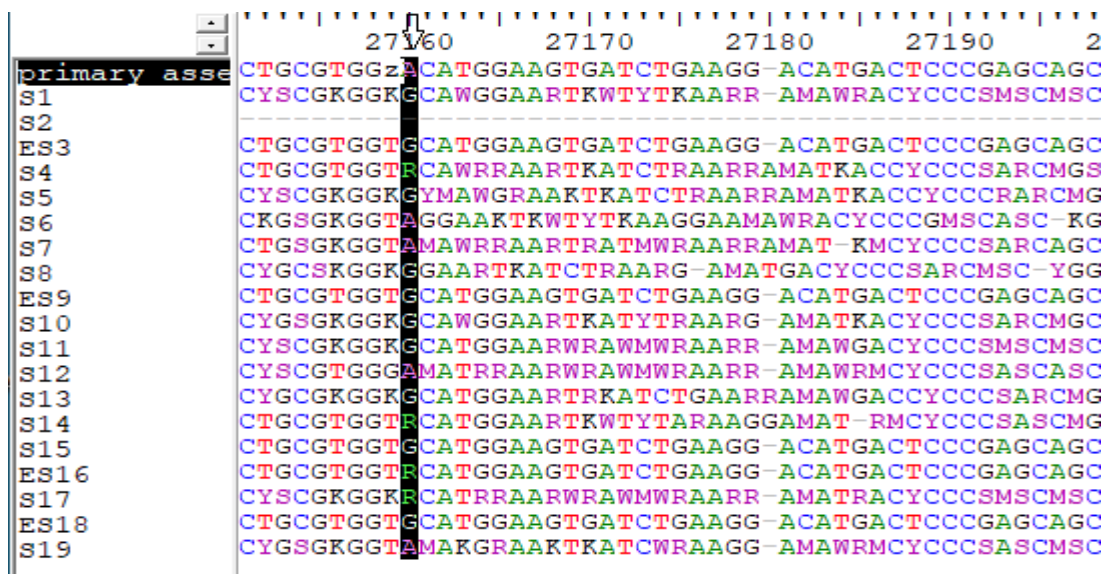
Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί πως η μέθοδος SSCP δεν παρέχει την ακριβή θέση του πολυμορφισμού, αλλά μια αρχική εκτίμηση για την ύπαρξη ενός πολυμορφισμού στην υπό μελέτη αλληλουχία. Για αυτόν τον λόγο είναι απαραίτητη η αλληλούχιση των προϊόντων PCR.

3.4. Αλληλούχιση

Αντιπροσωπευτικά δείγματα των ομάδων δειγμάτων που δημιουργήθηκαν μετά την μέθοδο SSCP στάλθηκαν σε εταιρία για την διενέργεια αλληλούχισης σε ειδικό αναλυτή με χρήση εκκινητών για το εξώνιο 14 του γονιδίου *ATP1A1*. Για μεγαλύτερη αξιοπιστία οι αλληλουχίες διαβάστηκαν και προς τις δυο κατευθύνσεις (forward και reverse), ενώ τα αποτελέσματα λήφθηκαν με την μορφή χρωματογραφημάτων, τα οποία επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα βιοπληροφορικής BioEdit για ανίχνευση πιθανών λαθών. Έπειτα, ακολούθησε ομοπαράθεση των δύο αλληλουχιών με το πρόγραμμα ClustalW για να προκύψει τελικά μία αλληλουχία για κάθε δείγμα. Οι διαφορετικές αλληλουχίες στοιχίζονται για την εύρεση διαφορετικών βάσεων σε συγκεκριμένες θέσεις. Οι αλληλουχίες που μελετήθηκαν χαρτογραφούνται στο τμήμα του εξωνίου 14 του γονιδίου *ATP1A1* και έχουν μήκος 330

ζεύγη βάσεων. Τελικώς, έγινε σύγκριση των αλληλουχιών αυτών με την πρότυπη αλληλουχία του εξωνίου 14 του γονιδίου *ATP1A1* για το είδος *B. taurus*. Στην ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία υπάρχουν σημειακοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) για το υπό μελέτη τμήμα DNA. Συγκεκριμένα στη θέση 14103 στο εξώνιο 14 του γονιδίου *ATP1A1* (Liu et al., 2010). Για το SNP αυτό υπολογίστηκαν τόσο ο αριθμός των ανθεκτικών και μη ατόμων, όσο και οι συχνότητες εμφάνισης του στον πληθυσμό. Αξίζει να επαναληφθεί πως η διάκριση των ατόμων σε ανθεκτικά και μη ανθεκτικά εξαρτάται από το αν γονιμοποιήθηκαν ή όχι μετά την σπερματέγχυση κατά την διάρκεια του καλοκαιριού, διάστημα στο οποίο έγινε η λήψη των δειγμάτων. Έτσι, είχαμε τα εξής αποτελέσματα :

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν για το SNP στη νουκλεοτιδική θέση 14103, η οποία σημειώνεται με βέλος όπως φαίνονται παρακατω (εικόνα 8) :



Οι γονότυποι (GG,AA,GA) σε αριθμό ατόμων, ανθεκτικών και μη ανθεκτικών, σε σύνολο 55 δειγμάτων, όπως φαίνεται παρακάτω :

Γονότυπος	Ανθεκτικά άτομα	Μη ανθεκτικά άτομα
GG	8	21
AA	4	12
GA	2	8

Οι γονοτυπικές συχνότητες που υπολογίστηκαν :

Γονότυπος	Ανθεκτικά άτομα	Μη ανθεκτικά άτομα
GG	0,59	0,52
AA	0,27	0,29
GA	0,14	0,19

Οι αλληλομορφικές συχνότητες για τα αλληλόμορφα (G, A) που υπολογίστηκαν :

Αλληλόμορφο	Ανθεκτικά άτομα	Μη ανθεκτικά άτομα
G	0,64	0,61
A	0,36	0,39

4. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Η θερμική καταπόνηση αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα που επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό διάφορες πτυχές της βιωσιμότητας και της παραγωγής των ζώων και πιο συγκεκριμένα των αγελάδων που αφορούν την παρούσα εργασία. Συμβαίνει όταν οποιοσδήποτε συνδυασμός περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως η υψηλή θερμοκρασία του αέρα, η σχετική υγρασία και η ηλιακή ακτινοβολία μεταβάλλει την θερμοκρασία του περιβάλλοντος σε επίπεδα ψηλότερα από αυτά που δύναται να ανεχθούν οι οργανισμοί (θερμικά ουδέτερη ζώνη). Ως απάντηση σε αυτές τις συνθήκες, τα ζώα προσαρμόζουν μερικές παραμέτρους της φυσιολογίας τους όπως είναι για παράδειγμα η αύξηση του αναπνευστικού ρυθμού και των καρδιακών παλμών. Ακόμα όμως και μετά τις προσαρμογές για να μετριάσουν τα αποτελέσματα της θερμικής καταπόνησης, αυτά επηρεάζουν ένα σύνολο παραγωγικών και φυσιολογικών λειτουργιών των ζώων με αρνητικές συνέπειες στην γαλακτοπαραγωγή, στην ανάπτυξη, στην αναπαραγωγική απόδοση και συνολικά στην διαβίωση (Das et al., 2016). Αυτές οι

συνέπειες μεταφράζονται σε τεράστιο κίνδυνο για την βοοτροφία και συνολικά την κτηνοτροφία στην Ελλάδα με οτιδήποτε αυτό συνεπάγεται στον πρωτογενή τομέα παραγωγής και στην οικονομία.

Για τον περιορισμό των αρνητικών συνεπειών της θερμικής καταπόνησης στα βοοειδή, ο άνθρωπος έχει καταφύγει σε αρκετές μεθόδους, όπως σε τροποποιήσεις του περιβάλλοντος διαβίωσης και της διατροφής των ζώων, που σε οικονομικό επίπεδο δεν είναι συμφέρουσες, αλλά ούτε και αρκετά αποτελεσματικές. Με βάση αυτά τα δεδομένα κρίνεται αναγκαία η ύπαρξη μιας μακροπρόθεσμης και επιτυχημένης λύσης. Μια τέτοια λύση η γενετική επιλογή και ανάπτυξη γενετικά ανθεκτικών αγελάδων ενάντια στην θερμική καταπόνηση (Kadzere et al., 2002). Έχουν εντοπιστεί αρκετά γονίδια των οποίων η έκφραση σχετίζεται με την θερμορύθμιση και την ανοχή σε υψηλές θερμοκρασίες του περιβάλλοντος, όπως γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες θερμικής καταπόνησης (HSPs) και γονίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες του ενζύμου Na^+/K^+ ATPase (*ATP1A1*, *ATP1B2*).

Για να κατανοηθεί πλήρως ο μοριακός μηχανισμός της απόκρισης του ενζύμου Na^+/K^+ ATPase στη θερμική καταπόνηση, στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε το γονίδιο *ATP1A1* που κωδικοποιεί την υπομονάδα α1, καθώς παρουσιάζει ιδιαίτερη ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες (Morel et al, 1998). Σε μια προηγούμενη μελέτη, στην οποία αναλύθηκε τμήμα του εξωνίου 14 του συγκεκριμένου γονιδίου, και συγκεκριμένα μια σημειακή μετάλλαξη γουανίνης σε αδενίνη στη νουκλεοτιδική θέση 14103 το γονίδιο *ATP1A1* συσχετίσθηκε με θερμο-ανθεκτικότητα στις φυλές αγελάδων (Liu et al, 2010). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες εκκινητών από εκείνη την μελέτη (Liu et al., 2010) για να στοχεύσουμε στο ίδιο τμήμα του γονιδίου *ATP1A1* και συγκεκριμένα αυτό που περιλαμβάνει το εξώνιο 14. Το ενισχυμένο προϊόν PCR έχει μέγεθος 330 bp.

Επισημαίνεται ότι στην παρούσα μελέτη, τα άτομα του πληθυσμού των αγελάδων διαχωρίστηκαν σε δυο κατηγορίες, σε θερμο-άντοχα και μη θερμο-άντοχα άτομα, ανάλογα με το αν γονιμοποιήθηκαν ή όχι, αντίστοιχα, κατά την διάρκεια του καλοκαιριού, διάστημα στο οποίο έγινε η λήψη των δειγμάτων. Στα αποτελέσματα που προέκυψαν οι γονοτυπικές συχνότητες GG, AA, GA για τα ανθεκτικά και μη ανθεκτικά άτομα είναι 0,59, 0,27, 0,14 και 0,52, 0,29, 0,19 αντίστοιχα. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζεται μεγάλη διαφορά στις γονοτυπικές συχνότητες των ανθεκτικών και μη ανθεκτικών ατόμων. Όπως είναι φανερό το ίδιο ισχύει και για τις αλληλομορφικές συχνότητες G και A που είναι 0,64 και 0,36 για τα ανθεκτικά άτομα και 0,61 και 0,39 για τα μη ανθεκτικά άτομα του πληθυσμού.

Το συμπέρασμα που προκύπτει από την παρούσα μελέτη για τον πολυμορφισμό G/A που εντοπίζεται στη νουκλεοτιδική θέση 14103 στο εξώνιο 14 του γονιδίου *ATP1A1*, είναι ότι οι αλληλομορφικές συχνότητες G και A μεταξύ των δύο διακριτών ομάδων, ανθεκτικών και μη ανθεκτικών ατόμων, δεν παρουσιάζουν μεγάλη διαφορά. Επίσης, παρατηρώντας τις γονοτυπικές συχνότητες μεταξύ των δύο ομάδων προκύπτει ότι τα αποτελέσματα της

παρούσας εργασίας διαφέρουν με τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης, η οποία συσχετίζει τον πολυμορφισμό G/A με θερμοανθεκτικότητα.

Σε συνέχεια της παρούσας εργασίας προτείνεται να μελετηθεί μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων καθώς και να γίνει έλεγχος επιπλέον γονιδίων που έχουν συσχετιστεί με θερμική καταπόνηση. Απώτερος σκοπός είναι η ανάπτυξη νέων εργαλείων για την αποτελεσματική γενετική επιλογή των θερμοανθεκτικών ατόμων ενός πληθυσμού για την δημιουργία πληθυσμών ζώων με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, ώστε να διατηρηθεί και αν είναι δυνατόν να αυξηθεί η παραγωγικότητα τους.

4. Βιβλιογραφία

- Atrian, P. and Shahryar, H.A. (2012) Heat stress in dairy cows. *Res. Zool.*, 2(4): 31-37.
- Balic, I.M., Milinkovic-Tur, S., Samardzija, M. and Vince, S. (2012) Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in Simmental bulls. *Theriogenology*, 78(2): 423-431.
- Baumgard, L.H. and Rhoads, R.P. (2013) Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetics. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, 1: 311-337.
- Beede, D.K., Collier, R.J., Wilcox, C.J., Thatcher, W.W., 1985. Effects of warm climates on milk yield and composition (short-term effects). In: Smith, A.J. (Ed.), *Milk Production in Developing Countries*. University of Edinburgh, Scotland, pp. 322–347.
- Bernabucci, U., Lacetera, N., Baumgard, L.H., Rhoads, R.P., Ronchi, B. and Nardone, A. (2010) Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *J. Anim. Sci.*, 4(7): 1167-1183.
- Bouraoui, R., Lahmar, M., Majdoub, A., Djemali, M. and Belyea, R. (2002) The relationship of temperature-humidity index with milk production of dairy cows in a Mediterranean climate. *Anim. Res.*, 51(6): 479-491.
- Cardozo, J., Fernández-Juan, M., Forcada, F., Abecia, A., Muiño-Blanco, T. and Cebrián-Pérez, J.A. (2006) Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology*, 66(4): 841-850.
- Chebel, R.C., Santos, J.E.P., Reynolds, J.P., Cerri, R.L.A., Juchem, S.O. and Overton, M. (2004) Factor affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Anim. Rep. Sci.*, 84(3-4): 239-255.

Dash, Soumya & Chakravarty, A. & Singh, Avtar & Upadhyay, Arpan & Singh, Manvendra & Yousuf, Saleem. (2016). Effect of heat stress on reproductive performances of dairy cattle and buffaloes: A review. *Veterinary World*. 9. 235-244. 10.14202/vetworld.2016.235-244.

Das, R., Gupta, I.D., Verma, A., Singh, A., Chaudhari, M.V., Sailo, L., Upadhyay, R.C. and Goswami, J. (2015) Genetic polymorphisms of ATP1A1 gene and their association with heat tolerance in Jersey crossbred cows. *Indian J. Dairy Sci.*, 68(1): 50-54.

Das, R., Sailo, L., Verma, N., Bharti, P., Saikia, J., Imtiwati, & Kumar, R. (2016). Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Veterinary World*, 9(3), 260–268.

Edwards, J.L. and Hansen, P.J. (1996) Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. *Biol. Reprod.*, 55(2): 340-346.

Gendelman, M., and Roth, Z. (2012a) Seasonal effect on germinal vesicle-stage bovine oocytes is further expressed by alterations in transcript levels in the developing embryos associated with reduced developmental competence. *Biol. Reprod.*, 86(1): 1-9.

Gendelman, M. and Roth, Z. (2012b) In vivo vs. In vitro models for studying the effects of elevated temperature on the GV-stage oocyte, subsequent developmental competence and gene expression. *Anim. Reprod. Sci.*, 134(3-4): 125-134.

Hansen, P. J. (2007). Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology*, 68(SUPPL. 1), 242–249.

Hayashi, Kenshi. (1991). PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR methods and applications*. 1. 34-8. 10.1101/gr.1.1.34.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). (2007) Climate Change: Synthesis Report. Available from: http://www.ipcc.ch/pdf/assessment_report/ar4/syr/ar4_syr_sym.pdt.

J. Xu, Z. Guo, L. Su, T.L. Nedambale, J. Zhang, J. Schenk, J.F. Moreno, A. Dinnyés, W. Ji, X.C. Tian, X. Yang, F. Du, Developmental Potential of Vitrified Holstein Cattle Embryos Fertilized In Vitro with Sex-Sorted Sperm, *Journal of Dairy Science*, Volume 89, Issue 7, 2006, Pages 2510-2518, ISSN 0022-0302

Kadzere C.T., Murphy M.R., Silanikove N., Maltz E. (2002). Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livestock Production Science* 77, 59–91.

Kakavas V. Konstantinos, Plageras Panagiotis E., Vlachos T. Antonios Papaioannou, Agelos Noulas, V. Argiris, (2008). PCR–SSCP: A Method for the Molecular Analysis of Genetic Diseases, *Mol Biotechnol*.

Kashyap, N., Kumar, P., Deshmukh, B., Bhat, S., Kumar, A., Chauhan, A., ... Sharma, D. (2015). Association of ATP1A1 gene polymorphism with thermotolerance in Tharparkar and Vrindavani cattle. *Veterinary World*, 8(7), 892–897.

Lee WC, Wen HC, Chang CP, Chen MY, Lin M-T (2006) Heat shock protein 72 overexpression protects against hyperthermia, circulatory shock, and cerebral ischemia during heatstroke. *J Appl Physiol* 100: 2073–2082.

Li Q, Han J, Du F, Ju Z, Huang J, Wang J, Li R, Wang C, Zhong J (2011). Novel SNPs in HSP70A1A gene and the association of polymorphisms with thermo tolerance traits and tissue specific expression in Chinese Holstein cattle. *Mol Biol Rep* 38:2657–2663.

Liu Y, Li D, Li H, Zhou X, Wang G (2011). A novel SNP of the ATP1A1 gene is associated with heat tolerance traits in dairy cows. *Mol Biol Rep* 38:83–88.

Nanas, I, Chouzouris, T-M, Dadouli, K, et al. A study on stress response and fertility parameters in phenotypically thermotolerant and thermosensitive dairy cows during summer heat stress. *Reprod Dom Anim*. 2020; 55: 1774– 1783.

Nardone, A., Ronchi, B., Lacetera, N. and Bernabucci, U. 2006. Climatic effects on productive traits in livestock. *Veterinary Research Communications* 30: 75-81.

Nardone, A., Ronchi, B., Lacetera, N., Ranieri, M.S. and Bernabucci, U. (2010) Effect of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. *Livest. Sci.*, 130(1-3): 57-69.

Nowak, M., Boerlijst, M., Cooke, J. *et al.* Evolution of genetic redundancy. *Nature* 388, 167–171 (1997).

Rahman, M.B., Kamal, M.M., Rijsselaere, T., Vandaele, L., Shamsuddin, M. and Soom, A.V. (2013) Altered chromatin condensation of heat stressed spermatozoa perturbs the dynamics of DNA methylation reprogramming in the paternal genome after in vitro fertilisation in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.*, 26(8): 1107-1116.

Rhoads, R.P., Baumgard, L.H., Suagee, J.K. and Sanders, S.R. (2013) Nutritional interventions to alleviate the negative consequences of heat stress. *Adv. Nutr.*, 4(3): 267-276.

Roth, Z., Meidan, R., Braw-Tal, R. and Wolfenson, D. (2000) Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *J. Reprod. Infertil.*, 120(1): 83-90.

Schneider, P.L., Beede, D.K., Wilcox, C.J. and Collier, R.J. (1984) Influence of dietary sodium and potassium bicarbonate and total potassium on heat-stressed lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 67(11): 2546-2553.

Sejian V. (2013) Climate Change: Impact on production and reproduction, adaptations mechanisms and mitigation strategies in small ruminants: a review. *The Indian Journal of Small Ruminants*, 19(1): 1-21.

Sejian, V., Indu, S. and Naqvi, S.M.K. (2013) Impact of short term exposure to different environmental temperature on the blood biochemical and endocrine responses of Malpura ewes under semi-arid tropical environment. *Indian J. Anim. Sci.*, 83(11): 1155-1160.

Shalit, O., Maltz, E., Silanikove, N., Berman, A., 1991. Water, Na, K, and Cl metabolism of dairy cows at onset of lactation in hot weather. *J. Dairy Sci.* 74, 1874–1883.

Singhal, S.P., Dhanda, O.P. and Razdan, M.N. (1984) Some managemental and therapeutic approaches in the treatment of physiological infertility of water buffaloes (*Bubalus bubalis*). In: *Proceedings of 10th International Congress Animal Reproduction and Artificial Insemination*. Vol. 3. p471.

Singh, M., Chaudhari, B.K., Singh, J.K., Singh, A.K. and Maurya, P.K. (2013) Effects of thermal load on buffalo reproductive performance during summer season. *J. Biol. Sci.*, 1(1): 1-8.

Sonna LA, Fujita J, Gaffin SL, Lilly CM. Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J Appl Physiol* (1985). 2002 Apr;92(4):1725-42. doi: 10.1152/jappphysiol.01143.2001. PMID: 11896043.

Tao, S. and Dahl, G.E. (2013) Heat stress effects during late gestation on dry cows and their calves. *J. Dairy Sci.*, 96(7): 4079-4093.

Wang, Z., Wang, G., Huang, J., Li, Q., Wang, C. and Zhong, J. (2011) Novel SNPs in the ATP1B2 gene and their associations with milk yield, milk composition and heat-resistance traits in Chinese Holstein cows. *Mol. Biol. Rep.*, 38: 1749-1755.

West, J.W. (2003) Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 86(6): 2131-2144.

Wolfenson, D., Roth, Z. and Meidan, R. (2000) Impaired reproduction in heat stressed cattle aspects. *Anim. Rep. Sci.*, 60-61: 535-547.

Yatoo, M.I., Dimri, M. and Sharma, M.C. (2014) Seasonal changes in certain blood antioxidants in cattle and buffaloes. *Indian J. Anim. Sci.*, 84(2): 173-176.