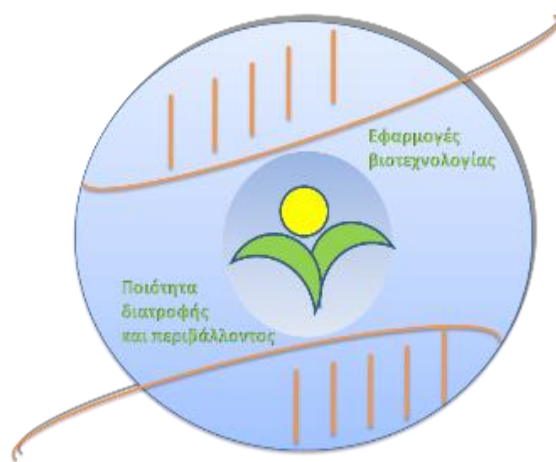




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ –
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**



ΣΤΑΜΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ – ΜΑΡΙΑ

«Συσχέτιση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) με
θερμοανθεκτικότητα σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής»

ΛΑΡΙΣΑ, 2022

Συσχέτιση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) με θερμοανθεκτικότητα σε αγελάδες
γαλακτοπαραγωγής

Association between Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) and heat-stress resistance at
dairy cows.

Τριμελής επιτροπή

Γιαννούλης Θεμιστοκλής, Επίκουρος Καθηγητής Γονιδιωματικής, Εξέλιξης και
Βιοποικιλότητας, Π.Θ

Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Πληθυσμών – Πρύτανης Π.Θ.

Μούτου Αικατερίνη, Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, Π.Θ

Ευχαριστίες

Θα ήθελα, αρχικά, να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Γιαννούλη Θεμιστοκλή, Επίκουρο Καθηγητή Γονιδιωματικής, Εξέλιξης και Βιοποικιλότητας, για τη δυνατότητα που μου έδωσε για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου διατριβής στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά του. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω την κα. Μούτου Αικατερίνη, Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, και τον κ. Μαμούρη Ζήση, Καθηγητή Γενετικής Πληθυσμών και Πρύτανη του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Διδάκτορα Καλεμκερίδου Μαρία για όλες τις συμβουλές, τη βοήθεια και την υποστήριξή της σε όλη τη διάρκεια υλοποίησης της εργασίας μου. Ευχαριστώ, επίσης, και όλα τα μέλη του εργαστηρίου «Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας» για τη συνεργασία τους στο εργαστήριο. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και στους φίλους μου για την υποστήριξη και την υπομονή τους.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	7
Abstract	8
1. Εισαγωγή.....	9
1.1. <i>Bos taurus</i> (domesticated cattle).....	9
1.1.1. Ρόλος στο οικοσύστημα.....	10
1.1.2. Οικονομική σημασία για τον άνθρωπο	10
1.2. Θερμική καταπόνηση	10
1.2.1. Θερμική καταπόνηση στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής.....	11
1.2.2. Μέθοδοι περιγραφής θερμικής καταπόνησης.....	12
1.2.3. Εγκλιματισμός	15
1.2.4. Επιπτώσεις θερμικής καταπόνησης στα βοοειδή.....	15
1.2.5. Αντιμετώπιση θερμικής καταπόνησης βοοειδών.....	17
1.3. Μοριακή μελέτη της θερμοανθεκτικότητας.....	18
1.4. Μοριακά εργαλεία.....	19
1.4.1. High Resolution Melting Analysis (HRM)	19
1.4.2. Σχεδιασμός κατάλληλων εκκινητών για την HRM.....	21
1.4.3. Ανάλυση αποτελεσμάτων με SNPStats.....	22
1.5. Σκοπός	23
2. Υλικά και μέθοδοι.....	24
2.1. Υπό μελέτη περιοχές	24
2.2. Απομόνωση DNA.....	24
2.3. Ποιοτική αξιολόγηση των δειγμάτων	25
2.3.1. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.....	25
2.4. Ποσοτική αξιολόγηση.....	26
2.4.1. Quawell.....	26
2.4.2. Qubit	26
2.5. Σχεδιασμός εκκινητών.....	26
2.6. High Resolution Melting Analysis (HRM)	27
2.6.1. Κανονικοποίηση των δειγμάτων.....	27
2.6.2. High Resolution Melting Analysis.....	27
2.6.3. Αλληλούχιση αμπλικονίων.....	29
3. Αποτελέσματα.....	30
3.1. Απομόνωση DNA.....	30
3.1.1. Ποιοτική αξιολόγηση: Πήκτωμα αгарόζης.....	30
3.1.2. Ποσοτική αξιολόγηση: επιλογή Quawell – Qubit	30
3.2 Έλεγχος εκκινητών.....	31

3.2.1. Δοκιμαστική PCR για εκκινητές.....	31
3.2.2. Δοκιμαστική HRM για εκκινητές.....	32
3.3. High Resolution Melting Analysis (HRM).....	33
3.3.1. Primer A.....	33
3.3.2. Primer B.....	34
3.4. Αλληλούχηση.....	35
3.4.1. Primer A.....	35
3.4.2. Primer B.....	36
3.5. Ανάλυση αποτελεσμάτων με SNPStats.....	37
3.5.1. Primer A.....	37
3.5.2. Primer B.....	40
4. Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	43
Βιβλιογραφία.....	46

Περίληψη

Η συνεχώς αυξανόμενη θερμοκρασία του πλανήτη, λόγω της κλιματικής αλλαγής, αποτελεί μεγάλη απειλή για την ευημερία ανθρώπων και ζώων. Μία από τις σημαντικότερες επιπτώσεις είναι το θερμικό στρες (heat stress) ή θερμική καταπόνηση. Η θερμική καταπόνηση ορίζεται ως η φυσιολογική απόκριση του ζώου σε περιβάλλον υψηλής θερμοκρασίας, όπου παράγει περισσότερη θερμότητα από όση μπορεί να διαχέει. Αυτό μπορεί να έχει διάφορες δυσμενείς επιπτώσεις στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, όπως η δυσκολία στην τεχνητή γονιμοποίηση και η μείωση παραγωγής γάλακτος.

Γενικά, έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των ατόμων όσον αφορά τη θερμοανθεκτικότητα, καθώς συγκεκριμένα ζώα σε κάθε πληθυσμό δεν φαίνεται να επηρεάζονται κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. Στην παρούσα διπλωματική, μελετήθηκαν δύο περιοχές του γονιδιώματος των βοοειδών *Bos taurus*, στις οποίες έχουν χαρτογραφηθεί πολυμορφισμοί που σχετίζονται με την θερμοανθεκτικότητα. Η μία περιοχή, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10 και αφορά το γονίδιο *HERCI* και η δεύτερη στο χρωμόσωμα 20 και αφορά το γονίδιο *CPLANE1*. Η ανάλυση έγινε με τη χρήση της High Resolution Melting Analysis (HRM) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Για το γονίδιο *HERCI* εντοπίστηκαν τέσσερα SNPs και για το γονίδιο *CPLANE1* εντοπίστηκαν τρία SNPs. Η στατιστική ανάλυση έδειξε, ότι οι πολυμορφισμοί αυτοί δεν εμφάνισαν συσχέτιση με την εμφάνιση θερμοανθεκτικότητας στους πληθυσμούς υπό μελέτη.

Λέξεις κλειδιά: Θερμοανοχή, θερμική καταπόνηση, πολυμορφισμός, γονίδιο *HERCI*, γονίδιο *CPLANE1*, γονιμότητα βοοειδών, γαλακτοπαραγωγή

Abstract

The continuous temperature increase due to climate change, is a huge threat to the well-being of both humans and animals. Heat stress is considered one of the most detrimental consequences of temperature increase. It describes the animal's physiological response to a high-temperature environment, in which case the animal produces more heat than it can dissipate. This can have various adverse effects on dairy cows, such as difficulties in artificial insemination and reduced milk production.

Generally, genetic variation has been observed among individuals in terms of heat tolerance, as individuals within a population seem not to be affected by increased temperatures during summer months. In this thesis, two regions of the *Bos taurus* cattle genome were studied, in which polymorphisms related to heat tolerance have been mapped. One region is located on chromosome 10 at the *HERC1* gene and the second one is on chromosome 20 at the *CPLANE1* gene. High Resolution Melting Analysis (HRM) was used for the gene analysis followed by a statistical analysis of the results.

Four SNPs were identified on the *HERC1* gene and three on the *CPLANE1* gene. The statistical analysis indicated no significant association between these polymorphisms and the heat resistance in the studied populations.

Key words: Thermotolerance, heat stress, polymorphism, *HERC1* gene, *CPLANE1* gene, cattle fertility, milk production

1. Εισαγωγή

1.1. *Bos taurus* (domesticated cattle)

Τα βοοειδή είναι μεγαλόσωμα ζώα, των οποίων το βάρος μπορεί να ποικίλει από περίπου 150 κιλά έως περίπου 1400 κιλά και το ύψος τους να φτάνει περίπου 1.20-1.30 μέτρα. Τα εξημερωμένα βοοειδή συνήθως έχουν κοντό τρίχωμα που χρωματικά ποικίλει από μαύρο έως λευκό, καφέ και κοκκινωπό. Έχουν δύο κοίλα κέρατα και οι σιαγόνες τους είναι σχεδιασμένες για την κυκλική κίνηση λείανσης που χρησιμοποιείται για τη συντριβή της χοντρής βλάστησης. Οι οικόσιτες αγελάδες είναι μηρυκαστικά και τρέφονται με χόρτα, μίσχους και άλλα ποώδη φυτικά υλικά. Ως μηρυκαστικά έχουν ένα ειδικό σύστημα πέψης που επιτρέπει τη διάσπαση του σχετικά δύσπεπτου φυτικού υλικού που καταναλώνουν. Η διαδικασία της πέψης διαρκεί 70-100 ώρες, ένας από τους πιο αργούς ρυθμούς πέψης μεταξύ των ζώων. Αυτή η μέθοδος πέψης επιτρέπει στα μηρυκαστικά να λαμβάνουν όσο το δυνατόν περισσότερα θρεπτικά συστατικά από αυτά τα φυτικά υλικά (Animal Diversity Web, n.d.). Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι η φυσιολογική θερμοκρασία του σώματός τους είναι 38.5°C με 39.5°C στα μοσχάρια, 38.0°C με 39.5°C στις δαμαλίδες και 38.0°C to 39.0°C στις ενήλικες αγελάδες (Liu Y.X., 2010).

Οι άγριοι πρόγονοι των αγελάδων βρίσκονταν κυρίως στη Βόρεια Αφρική, στην Ευρώπη και στην Νότια Ασία. Όπως και τα περισσότερα οικόσιτα ζώα, έτσι τα βοοειδή *Bos taurus*, βρίσκονται παντού στον κόσμο και κυρίως σε περιοχές με λιβάδια, τα οποία περιέχουν επαρκείς εκτάσεις για βοσκή (Animal Diversity Web, n.d.).

Γενικά τα βοοειδή είναι κοινωνικά ζώα και ζουν σε ομάδες που ονομάζονται «κοπάδια». Κάθε κοπάδι έχει ένα κυρίαρχο αρσενικό, το οποίο είναι το μόνο που θα ζευγαρώσει με τα θηλυκά του κοπαδιού (πολυγυνικός τρόπος αναπαραγωγής). Η αναπαραγωγή είναι εφικτή ολόκληρο το χρόνο, όμως τα περισσότερα μοσχάρια γεννιούνται κατά τους μήνες της άνοιξης. Κατά μέσο όρο γεννιέται ένα μοσχάρι μετά από 9 μήνες κύησης. Τα νεαρά βοοειδή μαθαίνουν να αναγνωρίζουν τη μητέρα τους και μπορούν να σταθούν και να περπατήσουν αμέσως μετά τη γέννα. Τα θηλυκά φτάνουν σε ηλικία αναπαραγωγής από τον πρώτο χρόνο της ζωής τους και μπορούν να συνεχίσουν να αναπαράγονται για περίπου 12 χρόνια (Animal Diversity Web, n.d.).

1.1.1. Ρόλος στο οικοσύστημα

Οι αγελάδες τροποποιούν το περιβάλλον μέσω της βοσκής. Σε περιοχές όπου ο πληθυσμός τους αυξάνεται τεχνητά από τον άνθρωπο, μπορούν να επηρεάσουν σοβαρά τα φυσικά συστήματα, προκαλώντας διάβρωση, εισαγωγή μη ιθαγενών χόρτων και ποωδών φυτών, καταστροφή παραποτάμιων οικοτόπων και υπερβόσκηση (Animal Diversity Web, n.d.).

1.1.2. Οικονομική σημασία για τον άνθρωπο

Η βοοτροφία είναι κλάδος της ζωοτεχνίας που ασχολείται με τις μεθόδους εκμετάλλευσης των βοοειδών και στοχεύει στην αύξηση της παραγωγικότητάς τους. Οι αγελάδες εκτρέφονται κυρίως για γαλακτοκομικά προϊόντα (γάλα, τυρί κ.λπ.) και κρέας. Εκτός από αυτά, βρίσκουν και άλλες εφαρμογές οι οποίες αφορούν το δέρμα τους, τα ζωικά έλαια, κ.α. (Animal Diversity Web, n.d.). Στην κτηνοτροφία της Ευρώπης, τα βοοειδή έχουν σημαντικό ρόλο. Η Ε.Ε. με περίπου 78 εκατομμύρια βοοειδή, είναι ένας από τους σημαντικότερους παραγωγούς βόειου κρέατος (European Commission, 2022), ενώ παράλληλα η συνολική παραγωγή γάλακτος εκτιμάται ότι είναι περίπου 155 εκατομμύρια τόνοι ετησίως. Οι κύριοι παραγωγοί είναι η Γερμανία, η Γαλλία, η Πολωνία, η Ολλανδία, η Ιταλία και η Ιρλανδία. Μαζί αντιπροσωπεύουν σχεδόν το 70% της παραγωγής γάλακτος στην Ε.Ε. (European Commission, 2022). Όσον αφορά την Ελλάδα, για το 2021 παρήγαγε 659.92 χιλιάδες τόνους γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων (Eurostat, 2022) καθώς και 33.04 χιλιάδες τόνους βόειου κρέατος (Eurostat, 2022). Γενικά, είναι ένας κλάδος με ιδιαίτερη οικονομική σημασία στην Ευρώπη και για το λόγο αυτό γίνεται μια συνεχής προσπάθεια στήριξης από την Ε.Ε. τόσο της αγοράς όσο και των εκτροφών βοοειδών (European Commission, 2022).

1.2. Θερμική καταπόνηση

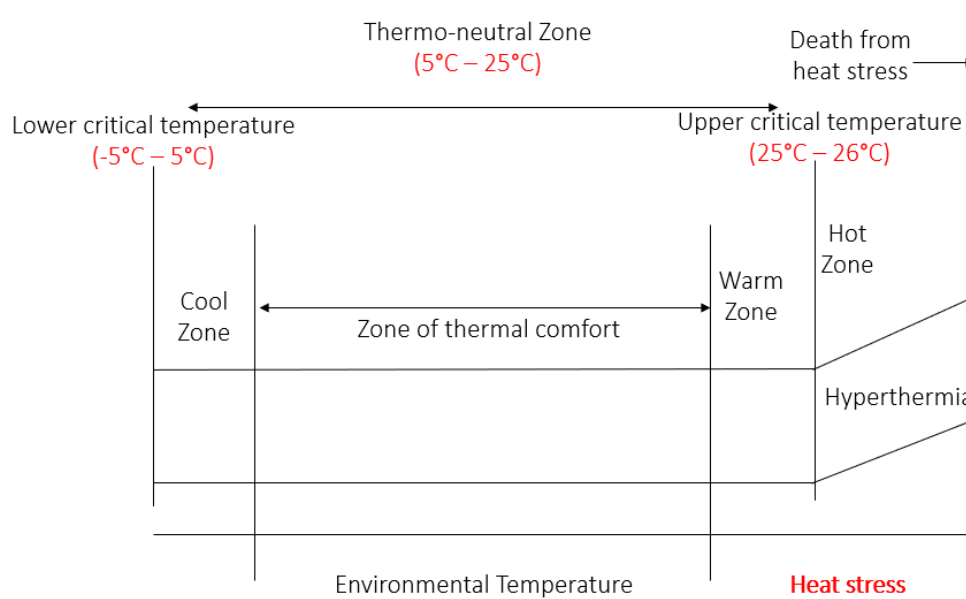
Η κλιματική αλλαγή είναι μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις των τελευταίων χρόνων, καθώς επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό η υγεία και η ευημερία των ανθρώπων και των ζώων. Το κύριο πρόβλημα που απορρέει από την υπερθέρμανση του πλανήτη είναι η θερμική καταπόνηση, το οποίο είναι ένα θέμα αυξανόμενης σημασίας στις τροπικές και εύκρατες ζώνες. Μάλιστα, σύμφωνα με την Διακυβερνητική Επιτροπή για την Κλιματική Αλλαγή (IPCC), η επιφανειακή θερμοκρασία του αέρα κατά 21ο αιώνα θα κυμαίνεται από 1.1 έως 2.9°C, ως σενάριο με την χαμηλότερη θερμοκρασία και από 2.4 έως 6.4 °C ως σενάριο με την υψηλότερη θερμοκρασία (IPCC, 2022).

Φυσικά, αυτό έχει αντίκτυπο και στην κτηνοτροφία, καθώς οι ετήσιες τιμές θερμοκρασίας και υγρασίας έχουν αυξηθεί πάνω από τα φυσιολογικά όρια σε πολλές περιοχές, όπως η Αυστραλία, οι ΗΠΑ, ο Καναδάς και πολλές περιοχές της Ευρώπης, καθιστώντας τη θερμική καταπόνηση ως μείζον οικονομικό ζήτημα στην κτηνοτροφική βιομηχανία θέτοντας σε κίνδυνο την παραγωγή και τη βιωσιμότητα των εκμεταλλεύσεων (Cheruiyot E., 2021). Γενικά, η υπερθέρμανση του πλανήτη, είναι πιθανό να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό την υγεία των ζώων εκτροφής, τόσο άμεσα όσο και έμμεσα. Οι άμεσες επιπτώσεις αφορούν ασθένειες αλλά και θνητότητα που σχετίζονται με τη θερμοκρασία, καθώς και τη νοσηρότητα των ζώων κατά τη διάρκεια ακραίων καιρικών φαινομένων. Οι έμμεσες επιπτώσεις αφορούν πιο περίπλοκα μονοπάτια. Πρόκειται για επιπτώσεις που μπορεί να προκύψουν λόγω της προσπάθειας των ζώων για προσαρμογή στα θερμότερα περιβάλλοντα, από την επίδραση του κλίματος στους μικροβιακούς πληθυσμούς, την αντίσταση του ξενιστή σε μολυσματικούς παράγοντες ακόμη και την έλλειψη τροφής και νερού (Nardone A., 2010).

1.2.1. Θερμική καταπόνηση στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής

Η θερμική καταπόνηση επηρεάζει προφανώς και την βοοτροφία. Οι κύριοι περιβαλλοντικοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τα βοοειδή γαλακτοπαραγωγής είναι η θερμοκρασία, η σχετική υγρασία, η ηλιακή ακτινοβολία, η ατμοσφαιρική πίεση και η ταχύτητα του ανέμου. Οι παράγοντες αυτοί μπορούν να προκαλέσουν θερμική καταπόνηση, η οποία ορίζεται ως οποιοσδήποτε συνδυασμός περιβαλλοντικών μεταβλητών που παράγει συνθήκες που είναι υψηλότερες από το εύρος θερμοκρασίας της θερμοουδέτερης ζώνης του ζώου (Thermoneutral Zone, TNZ) (Dash S, 2016).

Η θερμοουδέτερη ζώνη (TNZ) αφορά τη σχέση μεταξύ του ζώου και του περιβάλλοντος και ορίζεται ως το εύρος εντός του οποίου ο μεταβολικός ρυθμός είναι ελάχιστος και ένα υγιές ζώο μπορεί να προσαρμοστεί για να διατηρήσει τη φυσιολογική θερμοκρασία του σώματός του με ελάχιστη αλλαγή στη μεταβολική δραστηριότητα. Γενικά, η TNZ χαρακτηρίζεται από χαμηλότερη και υψηλότερη κρίσιμη θερμοκρασία. Η ανώτερη κρίσιμη θερμοκρασία έχει οριστεί στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής ως 25-26°C (Dash S, 2016).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της θερμο-ουδέτερης ζώνης στα βοοειδή (Dash S, 2016).

Κυρίως κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού η υπερβολική άνοδος της θερμοκρασίας μπορεί να διαταράσσει αρκετές αναπαραγωγικές διαδικασίες, με αποτέλεσμα την έντονη μείωση του ποσοστού σύλληψης στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής παγκοσμίως (Wolfenson D., 2019). Αυτή η διαταραχή προκαλείται λόγω της ανόδου της εσωτερικής θερμοκρασίας του σώματος των βοοειδών. Για να μπορέσει να διατηρηθεί η φυσιολογική θερμοκρασία του σώματος σταθερή, πρέπει να διατηρείται μια ισορροπία μεταξύ της ενδογενούς θερμοκρασίας και της θερμότητας που χάνεται από το σώμα προς το περιβάλλον. Όταν η παραγωγή θερμότητας υπερβαίνει την απώλεια θερμότητας, η θερμοκρασία του σώματος αυξάνεται. Έχει βρεθεί πως η θερμοκρασία σώματος σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής αρχίζει να αυξάνεται εκθετικά σε θερμοκρασίες 26-27°C. Έτσι, ακόμη και μια μικρή άνοδος της θερμοκρασίας του αέρα, της τάξης των 1-2°C, είναι δυνατόν να τους προκαλέσει σοβαρή υπερθερμία (Wolfenson D., 2019).

1.2.2. Μέθοδοι περιγραφής θερμικής καταπόνησης

Η ανάπτυξη μεθόδων για την περιγραφή της ανοχής στην υψηλή θερμοκρασία στα βοοειδή είναι ένας ενεργός ερευνητικός τομέας εδώ και πολλά χρόνια. Η μέτρηση των αλλαγών στη θερμοκρασία του σώματος, όπως για παράδειγμα η θερμοκρασία του ορθού και του κόλπου, αλλά και η μέτρηση θερμικών δεικτών, όπως ο δείκτης θερμοκρασίας – υγρασίας (THI), είναι μερικοί από τους τρόπους αξιολόγησης των θερμικών προσαρμογών και της απόδοσης στα ζώα (Cheruiyot E., 2021).

Πιο συγκεκριμένα, η αρνητική επίδραση της θερμικής καταπόνησης στα χαρακτηριστικά αναπαραγωγής των βοοειδών μπορεί να ποσοτικοποιηθεί μέσω του δείκτη θερμοκρασίας – υγρασίας (Temperature Humidity Index, THI). Ο δείκτης αυτός ορίζεται ως μια τιμή που περιλαμβάνει τόσο τη θερμοκρασία του αέρα όσο και τη σχετική υγρασία (Dash S, 2016) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εξακριβωθεί εάν τα ζώα βρίσκονται σε κατάσταση θερμικής καταπόνησης και να εξακριβωθεί και ο βαθμός αυτής (Liu Y.X., 2010). Ένας ακόμη δείκτης που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του επιπέδου θερμικής καταπόνησης στα βοοειδή είναι ο δείκτης θερμικού φορτίου (Heat Load Index HLI) (Dash S, 2016).

Αναλυτικότερα για τον δείκτη THI, όταν υπερβαίνει μια φυσιολογική τιμή σημαίνει ότι τα ζώα βιώνουν δυσμενείς επιπτώσεις θερμικής καταπόνησης. Το ποσοστό σύλληψης σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής μειώνεται όταν ο δείκτης THI είναι 72-73. Όταν ο δείκτης ξεπερνάει την τιμή 72, παρατηρείται σημαντική μείωση στο ποσοστό εγκυμοσύνης (Dash S, 2016).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζουν οι τιμές του δείκτη THI και το επίπεδο θερμικής καταπόνησης στο οποίο αντιστοιχεί η κάθε μία, καθώς και τα συμπτώματα που εμφανίζονται στα βοοειδή στις αντίστοιχες περιπτώσεις (Armstrong, 1994).

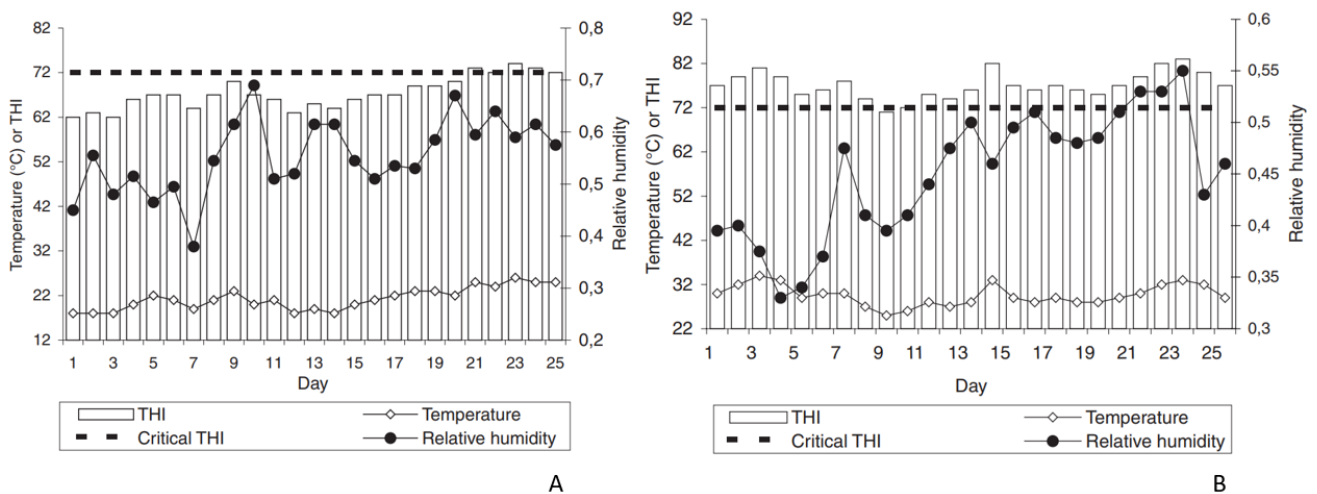
Πίνακας 1: Τιμές δείκτη THI σε αντιστοιχία με το επίπεδο θερμικής καταπόνησης και τα συμπτώματα που εμφανίζονται, ως συνέπεια, στα βοοειδή.

THI	Επίπεδο θερμικής καταπόνησης	Συμπτώματα στα βοοειδή
< 72	Κανένα	Βέλτιστη παραγωγική και αναπαραγωγική ικανότητα
72 – 78	Ήπιο	Αναζήτηση σκιάς, αύξηση ρυθμού αναπνοής, διαστολή αιμοφόρων αγγείων
79 – 88	Μέτριο	Αύξηση του ρυθμού αναπνοής και της έκκρισης σάλιου. Μείωση της πρόσληψης τροφής και αύξηση της κατανάλωσης νερού. Η θερμοκρασία του σώματος αυξάνεται και οι αναπαραγωγικές επιδόσεις επηρεάζονται σοβαρά
89 – 98	Σοβαρό	Ταχεία αύξηση της αναπνοής και υπερβολική παραγωγή σάλιου Οι αναπαραγωγικές επιδόσεις μειώνονται σημαντικά
> 98	Επικίνδυνο	Πιθανότητα θανάτου



Εικόνα 2: Αλλαγή στη συμπεριφορά βοοειδών λόγω θερμικής καταπόνησης: (Α) αναζήτηση σκιάς (Β) στάση σε νερό και αυξημένη πρόσληψη νερού.

Σε μελέτη που έγινε προσομοιάζοντας το μεσογειακό κλίμα, έγινε σύγκριση των τιμών του δείκτη THI την άνοιξη και το καλοκαίρι. Η καλοκαιρινή περίοδος χαρακτηρίζεται από συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Ο μέσος όρος της θερμοκρασίας υπερβαίνει τους 25°C που είναι η μέγιστη κρίσιμη θερμοκρασία, η σχετική υγρασία μπορεί να φτάσει 73% και ο δείκτης THI υπερέβη την κρίσιμη τιμή 72. Παρακάτω φαίνεται διαγραμματικά η σύγκριση για τις δύο αυτές εποχές (Bournaoui R, 2002).



Εικόνα 3: Μέσος όρος ημερήσιας θερμοκρασίας, σχετικής υγρασία και δείκτη THI κατά την περίοδο (Α) της άνοιξης και (Β) του καλοκαιριού. Εικόνα από Barnaoui et al.

1.2.3. Εγκλιματισμός

Ο εγκλιματισμός είναι μια απόκριση που αναπτύσσεται από το ζώο σε μια μεμονωμένη πηγή άγχους στο περιβάλλον (Fregley M.J., 1996). Ο εγκλιματισμός σε υψηλές περιβαλλοντικές θερμοκρασίες περιλαμβάνει αποκρίσεις που οδηγούν στη μείωση του θερμικού φορτίου. Οι άμεσες αποκρίσεις είναι η μείωση της πρόσληψης τροφής, η αύξηση του ρυθμού αναπνοής και της πρόσληψης νερού καθώς και αλλαγές στα ορμονικά σήματα που επηρεάζουν την ανταπόκριση του ιστού-στόχου στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Η μείωση της ενεργειακής πρόσληψης λόγω μειωμένης πρόσληψης τροφής, έχει ως αποτέλεσμα αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο (NEB) και εξηγεί εν μέρει γιατί οι αγελάδες χάνουν σημαντικά ποσά σωματικού βάρους και βαθμολογίας σώματος όταν υποβάλλονται σε θερμική καταπόνηση (Nardone A., 2010).

1.2.4. Επιπτώσεις θερμικής καταπόνησης στα βοοειδή

Στα βοοειδή έχει παρατηρηθεί μείωση της αναπαραγωγής τους κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί μείωση στα ποσοστά σύλληψης κατά 20% - 27%, καθώς επίσης και ποσοστό επιτυχίας στην τεχνητή γονιμοποίηση μόνο 10% - 20% (Wolfenson D., 2019). Κύρια αιτία αυτής της μείωσης θεωρείται η θερμική καταπόνηση, η οποία αποτελεί την κύρια πρόκληση για τις γαλακτοπαραγωγικές αγελάδες σε θερμά, κυρίως, κλίματα (West, 2003).

Μια μεγάλη ποσότητα θερμότητας παράγεται από την πέψη χονδροειδών ζωοτροφών (πχ χλωρή φυτική ύλη), η οποία αυξάνει τη θερμοκρασία του σώματος των αγελάδων. Καθώς, παράλληλα, αυξάνεται και η θερμοκρασία περιβάλλοντος κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, οι αγελάδες μειώνουν την πρόσληψη τροφής για να μετριάσουν τη θερμική καταπόνηση (Nardone A., 2010). Έχει μάλιστα αναφερθεί ότι η πρόσληψη τροφής αρχίζει να μειώνεται όταν η θερμοκρασία περιβάλλοντος φτάσει τους 25°C και μειώνεται απότομα όταν η θερμοκρασία ξεπεράσει τους 40°C. Σε αυτή την περίπτωση, η πρόσληψη τροφής είναι περίπου 20% έως 40% χαμηλότερη από τη φυσιολογική (Nardone A., 2010). Καθώς μειώνεται η πρόσληψη της τροφής, επηρεάζεται αρνητικά και το ενεργειακό ισοζύγιο (Fabio De Rensis, 2003) και αυτό αντανακλάται στην απόδοση παραγωγής γάλακτος και στα συστατικά του γάλακτος, δηλαδή στην περιεκτικότητα σε λίπος και πρωτεΐνες (Nardone A., 2010).

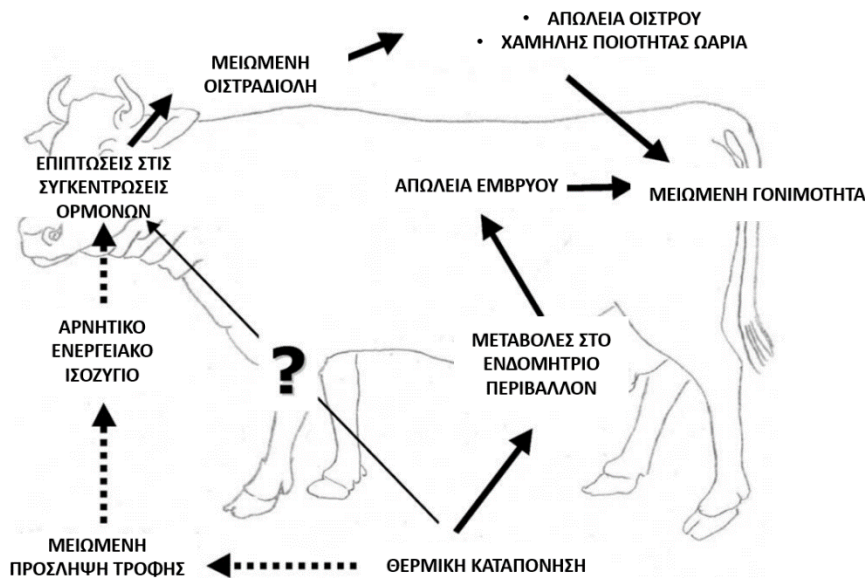
Επιπλέον, η θερμική καταπόνηση μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία των ιστών και των οργάνων των βοοειδών και να εμποδίσει τη σύνθεση ορισμένων πρωτεϊνών και ορμονών. Η παρεμπόδιση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλή γονιμότητα. Η θερμική καταπόνηση έχει

αποδειχθεί ότι ασκεί άμεση επίδραση στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων, καθώς επίσης και στον οίστρο (Nardone A., 2010).

Πιο συγκεκριμένα, η θερμική καταπόνηση λόγω της επίπτωσής της στο ενεργειακό ισοζύγιο οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα ινσουλίνης, γλυκόζης και IGF-I (insulin-like growth factor) και σε αυξημένες συγκεντρώσεις αυξητικής ορμόνης (growth hormone, GH) και μη εστεροποιημένου λιπαρού οξέος (non-esterified fatty acid, NEFA) στο πλάσμα. Οι μεταβολές αυτές μπορούν να επηρεάσουν την αναπαραγωγή. Αναλυτικότερα, η ινσουλίνη είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και συμμετέχει στην καλύτερη ποιότητα των ωαρίων. Ο παράγοντας IGF-I και η γλυκόζη δρουν θετικά στην ανάπτυξη και εμφύτευση ωοθυλακίων, ενώ, παράλληλα, η γλυκόζη αποτελεί το κύριο καύσιμο των ωοθηκών. Η γλυκόζη εμπλέκεται άμεσα στην ρύθμιση της έκκρισης της ωχρινοτρόπου ορμόνης (luteinizing hormone, LH), η οποία σε περίπτωση αναστολής της φυσιολογικής της έκκρισης επηρεάζει την έκκριση οιστραδιόλης μπορεί να οδηγήσει σε αποτροπή της ωορρηξίας. Μια άλλη ορμόνη που μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά λόγω θερμικής καταπόνησης είναι η προλακτίνη, η οποία μπορεί να προκαλέσει αναστολή της ανάπτυξης των ωοθυλακίων (Fabio De Rensis, 2003).

Λόγω υψηλής θερμοκρασίας περιβάλλοντος επηρεάζεται και το ενδομήτριο περιβάλλον. Αυξάνεται η θερμοκρασία και παρατηρείται μείωση της ροής του αίματος στο εσωτερικό της μήτρας. Ως αποτέλεσμα αυτών των μεταβολών, αναστέλλεται η εμβρυική ανάπτυξη, αυξάνεται η πρόιμη εμβρυική απώλεια και μειώνεται το ποσοστό των επιτυχών γονιμοποιήσεων (Fabio De Rensis, 2003).

Συμπερασματικά, τα δεδομένα δείχνουν ότι η θερμική καταπόνηση έχει σημαντική επίπτωση στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, καθώς οδηγεί σε μειωμένη γονιμότητα και, κατά συνέπεια, μειωμένη παραγωγή γάλακτος. Η όρεξη και η πρόσληψη ξηρής ύλης μειώνονται οδηγώντας σε αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο. Οι ενδοκρινικές μεταβολές που προκαλούνται λόγω αυτού, μειώνουν τη δραστηριότητα των ωοθυλακίων και μεταβάλλουν τον μηχανισμό της ωορρηξίας, οδηγώντας σε μείωση της ποιότητας των ωαρίων και των εμβρύων. Το περιβάλλον της μήτρας τροποποιείται, μειώνοντας την πιθανότητα εμφύτευσης εμβρύου.



Εικόνα 4: Μεταφρασμένη εικόνα από Fabio De Rensis et al. Σύντομη σχηματική απεικόνιση των επιπτώσεων της θερμικής καταπόνησης σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής.

1.2.5. Αντιμετώπιση θερμικής καταπόνησης βοοειδών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι θηλάζουσες αγελάδες γαλακτοπαραγωγής που εκτίθενται σε υψηλή θερμοκρασία περιβάλλοντος, συχνά σε συνδυασμό με υψηλή σχετική υγρασία ή ενέργεια ακτινοβολίας (άμεσο ηλιακό φως), ανταποκρίνονται συνήθως με μειωμένη απόδοση γάλακτος και μειωμένη γονιμότητα. Ως αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος, οι μελέτες επικεντρώθηκαν στην ανάπτυξη τεχνολογιών και τεχνικών για τη διαχείριση της θερμικής καταπόνησης και την αύξηση της ψύξης. Αυτές οι τεχνικές μπορούν να μειώσουν τον αρνητικό αντίκτυπο των περιβαλλόντων με υψηλή θερμοκρασία και υγρασία στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής και να προωθήσουν την αύξηση της ποιότητας και της αποτελεσματικότητας της παραγωγής γάλακτος στη γαλακτοβιομηχανία (West, 2003). Έτσι, πολλές σύγχρονες φάρμες είναι πλέον εξοπλισμένες με εξελιγμένα συστήματα ψύξης που παρέχουν καλύτερες συνθήκες διαβίωσης για τις θηλάζουσες αγελάδες (Flamenbaum I., 2010). Η περισσότερο χρησιμοποιούμενη τεχνική αφορά τα συστήματα «δροσίματος», τα οποία δροσιάζουν τις αγελάδες με ψεκασμό νερού και παρέχοντας καλύτερη θερμοκρασία περιβάλλοντος (Fabio De Rensis, 2003). Ωστόσο, κατά τους ζεστούς καλοκαιρινούς μήνες, η γονιμότητα παραμένει χαμηλή ακόμη και για τις αγελάδες που ψύχονται εντατικά (Flamenbaum I., 2010). Επομένως, είναι σημαντικό να μελετηθεί και η μοριακή βάση της θερμικής καταπόνησης στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής για να μπορέσει να δοθεί μια περισσότερο αποδοτική λύση στο πρόβλημα της θερμικής καταπόνησης, μέσω προγραμμάτων γενετικής επιλογής.

1.3. Μοριακή μελέτη της θερμοανθεκτικότητας

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η κλιματική αλλαγή αποτελεί απειλή για την ευημερία τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων. Παρόλα αυτά, τα γενετικά και βιολογικά χαρακτηριστικά που συσχετίζονται με τη θερμοανθεκτικότητα στα ζώα δεν είναι ακόμη πλήρως χαρακτηρισμένα. Γενικά, υπάρχει γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών όσον αφορά τη θερμοανθεκτικότητα. Το ίδιο έχει βρεθεί πως συμβαίνει και με τα διάφορα είδη και φυλές βοοειδών. Για παράδειγμα, φυλές που εντοπίζονται σε τροπικά κλίματα, όπως τα Zebu (*Bos indicus*), εμφανίζουν περισσότερη ανοχή σε υψηλές θερμοκρασίες σε σύγκριση με αυτές στις εύκρατες ζώνες, όπως οι αγελάδες Holstein (*Bos taurus*) (Cheruiyot E., 2021).

Το ερώτημα του γιατί τα ζώα διαφέρουν ως προς τη θερμοανθεκτικότητα δεν έχει ακόμη απαντηθεί μοριακά με σαφήνεια, αλλά υπάρχουν διάφορες υποθέσεις που εν μέρη απαντούν σε αυτό. Αυτές οι υποθέσεις αφορούν κυρίως βιολογικούς μηχανισμούς και χαρακτηριστικά, σε επίπεδο κυτταρικό, μορφολογικό (πχ χρώμα / μήκος τριχώματος κ.α.), συμπεριφοράς (π.χ. πρόσληψη τροφής και νερού, χρόνος ορθοστασίας και κατάκλισης) αλλά ακόμη και χαρακτηριστικά νευρο-ενδοκρινικών συστημάτων (Cheruiyot E., 2021).

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές έρευνες τα τελευταία χρόνια με σκοπό να αναλυθεί η μοριακή βάση της θερμοαντοχής στα βοοειδή και ως συνέπεια αυτού, να βρεθούν λύσεις σχετικά με την αναπαραγωγή και την εκτροφή βοοειδών. Το να βρεθούν και να αναγνωριστούν συγκεκριμένες γενετικές παραλλαγές που σχετίζονται με τη θερμοαντοχή θα μπορούσε ως ένα βαθμό να βοηθήσει στη βελτίωση προγραμμάτων που σχετίζονται με εκτροφή γαλακτοπαραγωγικών βοοειδών (Cheruiyot E., 2021).

Έρευνα που έγινε με στόχο να βρεθούν τέτοιες περιοχές του γονιδιώματος των βοοειδών, μελέτησε 29107 Holstein και κατάφερε να εντοπίσει SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) που σχετίζονται με θερμοανθεκτικότητα. Οι στόχοι της συγκεκριμένης μελέτης ήταν τόσο το να εντοπιστούν παραλλαγές που έχουν να κάνουν με τη θερμοαντοχή και τη σχέση της με την παραγωγή γάλακτος, αλλά παράλληλα να αποσαφηνιστούν και οι βιολογικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με αυτές. Τα αποτελέσματα της μελέτης οδήγησαν στην εύρεση νέων γενετικών τόπων που σχετίζονται με θερμοαντοχή, αλλά και με την παραγωγή γάλακτος. Για παράδειγμα, ορισμένα SNPs που συσχετίστηκαν με την παραγωγή γάλακτος βρέθηκαν κοντά ή ακόμη και εντός γενετικού τόπου που έχει προηγουμένως αναφερθεί ότι επιδρούν πλειοτροπικά στα χαρακτηριστικά παραγωγής βόειου γάλακτος, όπως τα *DGAT1*, *MGST1* και *DHR*. Επίσης, βρέθηκε ότι κάποιες από αυτές τις παραλλαγές σχετίζονται με το νευρικό σύστημα (χαρτογραφούνται στα γονίδια *ITPR1*, *ITPR2* και *GRIA4*)

και τις λειτουργίες αλληλεπίδρασης μεταξύ του νευροϋποδοχέα και του συνδέτη (ligand – receptor) για θερμοανοχή (*NPFFR2*, *CALCR* και *GHR*) (Cheruiyot E., 2021).

Συμπερασματικά, φαίνεται πως η θερμοανθεκτικότητα να έχει μια πολυγονιδιακή φύση, καθώς διαφορετικά γονίδια και μονοπάτια, εν μέρει, ρυθμίζουν τα διαφορετικά χαρακτηριστικά παραγωγής γάλακτος σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής που έχουν υποστεί θερμική καταπόνηση. Επομένως, είναι σημαντική η μελλοντική έρευνα σε αυτόν τον τομέα με σκοπό την κατανόηση και τη διαχείριση της θερμικής καταπόνησης στα θερμά, κυρίως, κλίματα και ιδιαίτερα εν όψει της αναμενόμενης αύξησης της παγκόσμιας θερμοκρασίας (Cheruiyot E., 2021).

1.4. Μοριακά εργαλεία

Για να μπορέσει να γίνει μοριακή μελέτη με σκοπό τη γονοτύπηση πολυμορφισμών σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων, είναι απαραίτητη η χρήση των κατάλληλων μοριακών μεθόδων. Οι μέθοδοι αυτές είναι σημαντικό να δίνουν αρκετά ακριβή αποτελέσματα για τον όγκο των δειγμάτων, αλλά παράλληλα να είναι και οικονομικές.

1.4.1. High Resolution Melting Analysis (HRM)

Η High Resolution Melting Analysis (HRM) είναι μία μέθοδος ανάλυσης που χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό γενετικών διαφορών στις αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων (Applied Biosystems, 2009). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ικανότητα διαχωρισμού των αλυσίδων τους, καθώς μετατρέπονται από δίκλιωνα μόρια DNA (dsDNA) σε μονόκλιωνα (ssDNA) με αύξηση της θερμοκρασίας.

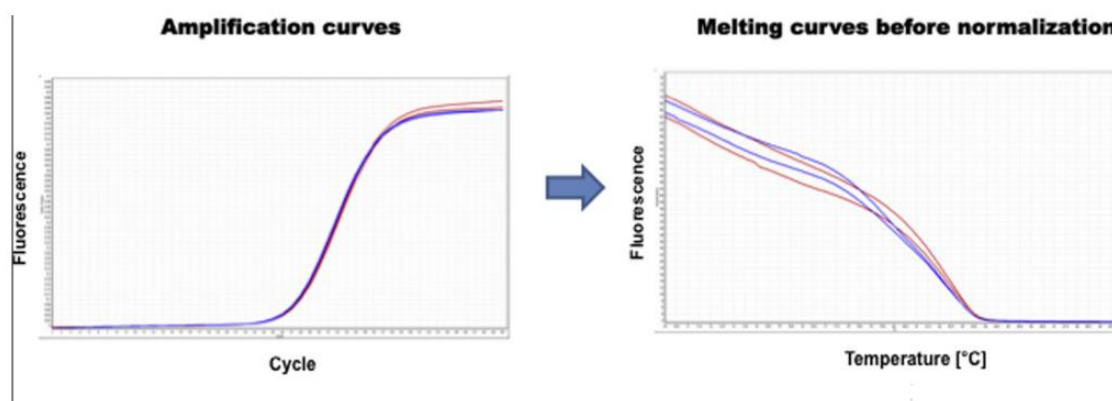
Συνήθως μετά από την αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real time PCR), πραγματοποιείται ανάλυση της καμπύλης τήξης (melting curve analysis), με σκοπό την περαιτέρω ανάλυση των προϊόντων της PCR (amplicons). Η ανάλυση αυτή επιτυγχάνεται με την παρουσία μιας χρωστικής (SYBR Green) που δεσμεύεται στο dsDNA. Στη μη δεσμευμένη μορφή της η χρωστική δίνει χαμηλό σήμα φθορισμού, ενώ όσο είναι συνδεδεμένη με το δίκλινο DNA, δίνει υψηλό σήμα φθορισμού. Η ανάλυση της καμπύλης τήξης βασίζεται στη σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας και στη διαφορά του σήματος φθορισμού λόγω αυτής. Πιο συγκεκριμένα, στην αρχή λαμβάνεται πολύ υψηλό σήμα φθορισμού λόγω του μεγάλου αριθμού δίκλωνων μορίων DNA στα οποία είναι συνδεδεμένη η

χρωστική. Όταν σταδιακά αυξάνεται η θερμοκρασία, τα dsDNA αρχίζουν να διασπώνται και η χρωστική να απελευθερώνεται. Αυτό οδηγεί σε μείωση του φθορισμού (Druml B., 2014).

Στην ίδια αρχή βασίζεται και η HRM. Στην αρχή πραγματοποιείται μια αντίδραση αντίστοιχη της real time PCR. Στην περίπτωση της HRM, χρησιμοποιούνται χρωστικές που δίνουν πιο έντονο σήμα φθορισμού και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (πχ EvaGreen® Dye) σε συνδυασμό με περισσότερο εξελιγμένο λογισμικό (Applied Biosystems, 2009). Κατά τη διάρκεια της διάσπασης του dsDNA, όσο η χρωστική είναι συνδεδεμένη με αυτό, ο φθορισμός ανιχνεύεται συνεχώς από ένα οπτικό σύστημα. Όταν το dsDNA μετατραπεί σε ssDNA, η χρωστική απελευθερώνεται, αλλάζει διαμόρφωση και ο φθορισμός μειώνεται έως και 1000 φορές.

Ο ρυθμός μείωσης του φθορισμού είναι γενικά μεγαλύτερος κοντά στη θερμοκρασία τήξης (T_m) του PCR προϊόντος. Ως θερμοκρασία τήξης (melting temperature, T_m) ορίζεται ως το σημείο στην καμπύλη τήξης, όπου το 50% του DNA είναι δίκλωνο και το 50% είναι μονόκλωνο (Applied Biosystems, 2009). Ισούται με τη θερμοκρασία στην οποία ο φθορισμός είναι 50% και μπορεί να υπολογιστεί από το αρνητικό παράγωγο του φθορισμού (F) σε θερμοκρασία (T) (dF/dT) έναντι της θερμοκρασίας (T) (Druml B., 2014). Η θερμοκρασία τήξης εξαρτάται από την αλληλουχία του δίκλωνου τμήματος DNA, το ποσοστό C-G και το μήκος του (Reed G., 2007).

Το αποτέλεσμα μιας αντίδρασης HRM είναι ένα προφίλ καμπύλης τήξης χαρακτηριστικό του εκάστοτε αμπλικονίου, καθώς μπορεί να διακρίνει τις αλληλουχίες DNA με βάση τη σύνθεση, το μήκος, το περιεχόμενο GC ή τη συμπληρωματικότητα των κλώνων (Applied Biosystems, 2009). Τα προφίλ που προκύπτουν μπορούν να παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με μεταλλάξεις, πολυμορφισμούς, γονότυπο (ετεροζυγωτία, ομοζυγωτία), μεθυλίωση και άλλες ερευνητικές εφαρμογές (Applied Biosystems, 2009).



Εικόνα 5: Καμπύλη ενίσχυσης (φθορισμός – κύκλος) και καμπύλη τήξης (φθορισμός – θερμοκρασία) Εικόνα από Druml et al.

1.4.2. Σχεδιασμός κατάλληλων εκκινητών για την HRM

Οι εκκινητές (primers) είναι τμήματα μονόκλωνου DNA, μικρού μεγέθους, οι οποίοι σχεδιάζονται έτσι ώστε να πλαισιώνουν την περιοχή στόχο. Καθώς μια αντίδραση HRM είναι αρκετά ευαίσθητη, απαιτείται σωστός σχεδιασμός των εκκινητών έτσι ώστε να δοθεί σωστό αποτέλεσμα. Επομένως, υπάρχουν και αρκετές παράμετροι, οι οποίες αφορούν τη θερμοκρασία αποδιάταξής τους, το μέγεθος και την αλληλουχία του.

Πιο συγκεκριμένα, η θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών παίζει σημαντικό ρόλο. Όπως είναι γνωστό, με την αύξηση της θερμοκρασίας, οι δύο κλώνοι του DNA αρχίζουν να διασπώνται έως τον πλήρη διαχωρισμό τους. Η θερμοκρασία στην οποία το 50% του DNA είναι μονόκλωνο ονομάζεται θερμοκρασία τήξης (melting temperature, T_m). Η T_m εξαρτάται τόσο από το μήκος του τμήματος του DNA, όσο και από την περιεκτικότητά του σε G-C. Η γουανίνη και η κυτοσίνη συνδέονται μεταξύ τους με τρεις δεσμούς υδρογόνου, ενώ η αδενίνη με τη θυμίνη συνδέονται με δύο δεσμούς υδρογόνου. Αυτό καθιστά το ζεύγος G-C περισσότερο σταθερό, με αποτέλεσμα οι αλληλουχίες DNA με μεγαλύτερο αριθμό ζευγών G-C να έχουν και υψηλότερη T_m από αυτές που περιέχουν μικρό αριθμό ζευγών βάσεων G-C (Druml B., 2014). Οι εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν σε μια αντίδραση HRM συνίσταται να έχουν T_m τουλάχιστον 56°C και εάν είναι δυνατό να έχουν κοντινές T_m . Η T_m των εκκινητών δίνεται από τον τύπο: $T_m = 2^\circ C \times (\text{αριθμός } [A+T]) + 4^\circ C \times (\text{αριθμός } [C+G])$. (QIAGEN®, 2009).

Στη βιβλιογραφία, έχουν προταθεί ορισμένες βασικές παράμετροι για το σχεδιασμό των κατάλληλων εκκινητών. Όσον αφορά το μέγεθός τους το μήκος των εκκινητών για μια αντίδραση HRM πρέπει να είναι 18-30 νουκλεοτίδια. Σχετικά με την αλληλουχία τους, κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών είναι καλό να αποφευχθεί η ύπαρξη συμπληρωματικών βάσεων στα 3' άκρα του ζεύγους εκκινητών για να μειωθεί η πιθανότητα σχηματισμού διμερών, καθώς και οι συμπληρωματικές βάσεις εντός της αλληλουχίας των εκκινητών, για να αποφευχθεί η δημιουργία δομών φουρκέτας. Τέλος, δε συστήνεται η ύπαρξη πολλών C ή/και G στο 3' άκρο των εκκινητών, όμως είναι σημαντικό να έχουν στο μήκος τους περιεκτικότητα σε G-C 40-60% (QIAGEN®, 2009).

1.4.3. Ανάλυση αποτελεσμάτων με SNPStats

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, ως εργαλείο χρησιμοποιήθηκε το SNPStats (SNPStats, n.d.), με το οποίο πραγματοποιήθηκε περιγραφική ανάλυση και ανάλυση απλοτύπων.

Πιο συγκεκριμένα, η στατιστική ανάλυση ενός πολυμορφισμού βασίζεται στην εκτίμηση του επιπολασμού του κάθε αλληλομόρφου. Έτσι, μπορούν να εκτιμηθούν οι συχνότητες των πιθανών γοντύπων και οι συχνότητες των αλληλομόρφων.

Για να εκτιμηθούν οι συχνότητες των γονοτύπων (F_1) χρησιμοποιείται ο τύπος:

$$F_1 = \frac{\text{Number of given genotype}}{N}$$

όπου N , το μέγεθος του δείγματος.

Για να υπολογιστούν οι συχνότητες των αλληλομόρφων (F_2), διπλασιάζεται ο αριθμός των χρωμοσωμάτων και υπολογίζεται από τον τύπο:

$$F_2 = \frac{\text{Number of given allele}}{2N}$$

όπου N , το μέγεθος του δείγματος.

Όσον αφορά την ανάλυση απλοτύπων, γενικά, υπάρχουν πολλές μέθοδοι για την εκτίμηση της συχνότητας του απλοτύπου. Μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες είναι μια επαναληπτική μέθοδος δύο σταδίων που ονομάζεται αλγόριθμος EM (Algorithm Maximization Expectation). Αρχικά, δίνονται οι αρχικές τιμές για τις συχνότητες των απλοτύπων. Σε πρώτο στάδιο, γίνεται επανυπολογισμός της αναμενόμενης συχνότητας γονοτύπων για τους γονοτύπους που έχουν απλοτύπους αβεβαιότητας. Σε δεύτερο στάδιο, αφού έχουν επανυπολογιστεί προηγουμένως οι συχνότητες των γονοτύπων, υπολογίζεται η συχνότητα για κάθε απλότυπο. Τέλος, ο αλγόριθμος συγκλίνει τις επιθυμητές απλοτυπικές συχνότητες.

Ως αποτέλεσμα, η ανάλυση αυτή εμφανίζει έναν πίνακα που περιέχει τους απλότυπους, τη συχνότητά τους στο σύνολο των δειγμάτων, τη συχνότητά τους σε κάθε επιμέρους σύνολο που μελετάται καθώς και την αθροιστική συχνότητα. Η αθροιστική συχνότητα ορίζεται ως το σύνολο μιας συχνότητας και όλων των συχνοτήτων σε μια κατανομή συχνότητας μέχρι ένα ορισμένο διάστημα κλάσης. Στην ουσία, η συχνότητα του διαστήματος της πρώτης κατηγορίας (εδώ, του πρώτου απλοτύπου) προστίθεται στη συχνότητα της δεύτερης κατηγορίας (εδώ, του δεύτερου απλοτύπου) και αυτό το άθροισμα προστίθεται στην τρίτη κατηγορία και ούτω καθεξής. Οι συχνότητες που λαμβάνονται με αυτόν τον τρόπο είναι γνωστές ως αθροιστική συχνότητα (c.f.).

Πραγματοποιείται, επίσης, συσχέτιση μεταξύ του απλότυπου και του υπομελέτη φαινότυπου (θερμοανθεκτικά άτομα). Η ανάλυση αυτή γίνεται μέσω ενός μοντέλου λογιστικής παλινδρόμησης. Στη στατιστική, το λογιστικό μοντέλο είναι ένα στατιστικό μοντέλο που μοντελοποιεί την πιθανότητα να λάβει χώρα ένα γεγονός, έχοντας τις πιθανότητες καταγραφής για το γεγονός να είναι ένας γραμμικός συνδυασμός μιας ή περισσότερων ανεξάρτητων μεταβλητών. Στην ανάλυση παλινδρόμησης, η λογιστική παλινδρόμηση είναι η εκτίμηση των παραμέτρων ενός λογιστικού μοντέλου (οι συντελεστές στον γραμμικό συνδυασμό).

Τα αποτελέσματα της συσχέτισης αυτής, λαμβάνονται ως ένας πίνακας που περιέχει τον κάθε απλότυπο και τη συχνότητά τους, το Odds Ration (OR) και το p – value. Το Odds Ration χρησιμοποιείται για τη σύγκριση των σχετικών πιθανοτήτων εμφάνισης του υπό μελέτη αποτελέσματος (θερμοανθεκτικότητα – θερμοευαισθησία), δεδομένης της έκθεσης σε κάποια μεταβλητή (υψηλή θερμοκρασία) (Szumilas, 2010). Το p – value υποδεικνύει το κατά πόσο είναι στατιστικά σημαντικό ή όχι το αποτέλεσμα.

1.5. Σκοπός

Όπως ήδη αναφέρθηκε, υπάρχουν γονίδια και πολυμορφισμοί σε αυτά που σχετίζονται με την εμφάνιση θερμοανθεκτικότητας σε βοοειδή. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας, είναι ο εντοπισμός νέων πολυμορφισμών και η συσχέτισή τους με το θερμοανθεκτικό φαινότυπο βοοειδών σε έναν πληθυσμό.

2. Υλικά και μέθοδοι

Στην παρούσα διατριβή, εξετάστηκαν συνολικά 346 δείγματα αίματος αγελάδων γαλακτοπαραγωγής από διαφορετικές εκτροφές στην περιφέρεια της Θεσσαλίας. Στις αγελάδες αυτές, έγινε τεχνητή σπερματέγχυση, κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, με τιμή του δείκτη THI μεγαλύτερη από 72. Τα ζώα στα οποία επιτεύχθηκε εγκυμοσύνη μετά από την πρώτη σπερματέγχυση χαρακτηρίστηκαν ως θερμο-ανθεκτικά ζώα (thermotolerant), ενώ αυτά στα οποία πραγματοποιήθηκαν 2 συνεχόμενες ανεπιτυχείς σπερματεγχύσεις, χαρακτηρίστηκαν ως θερμο-ευαίσθητα (thermosensitive). Συγκεκριμένα, 121 ζώα χαρακτηρίστηκαν ως θερμοανθεκτικά, ενώ 153 χαρακτηρίστηκαν ως θερμοευαίσθητα. Τα δείγματα αυτά εξετάστηκαν για γενετικούς τόπους σε δύο διαφορετικά χρωμοσώματα.

2.1. Υπό μελέτη περιοχές

Επιλέχθηκαν δύο γονιδιακές περιοχές ως προς μελέτη για την παρούσα διπλωματική εργασία. Η μία χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 10 των βοοειδών *Bos taurus* και εντοπίζεται στο γονίδιο *HERC1* (HECT And RLD Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase Family Member 1), το οποίο κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη. Η δεύτερη, χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 20 και το γονίδιο είναι το *CPLANE1* (Ciliogenesis And Planar Polarity Effector Complex Subunit 1) (Cattle Gene Atlas, 2022).

2.2. Απομόνωση DNA

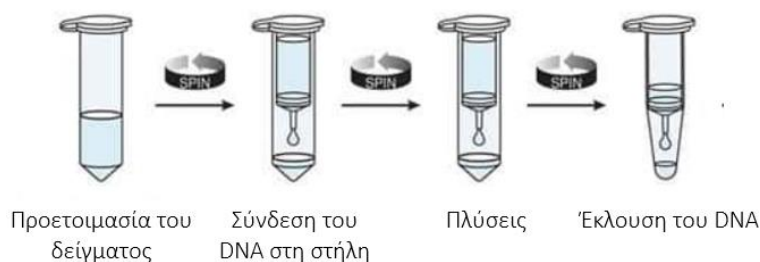
Το πρώτο στάδιο για την εξέταση των δειγμάτων αίματος για την ύπαρξη συγκεκριμένων πολυμορφισμών, είναι η απομόνωση του DNA.

Η απομόνωση DNA από αίμα αγελάδων πραγματοποιήθηκε με το PureLink™ Genomic DNA Mini Kit. Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Προσθήκη 20μL Proteinase K και 20μL RNAase σε 200μL αίματος από κάθε δείγμα
- Ανάδευση με vortex και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
- Προσθήκη 200μL Lysis/Binding buffer
- Ανάδευση με vortex και επώαση των δειγμάτων στους 55°C για 20-30 λεπτά.
- Μετά την επώαση, προσθήκη αιθανόλης (100%)
- Μεταφορά δειγμάτων σε στήλη και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 10.000 rpm.

- Απόρριψη του collection tube
- Έκπλυση με 500μL Wash Buffer I
- Φυγοκέντρηση για 1' σε θερμοκρασία δωματίου
- Απόρριψη του collection tube
- Έκπλυση με 500μL Wash Buffer II
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 12.000 rpm
- Απόρριψη του collection tube
- Χρήση αποστειρωμένων tubes για την έκλυση του DNA
- Προσθήκη 60μL Elution Buffer ή Water for injections
- Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 12.000 rpm.

Εναλλακτικά, για καλύτερο καθαρισμό του δείγματος, μετά την προσθήκη του Wash Buffer 2, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 12.000 rpm και ακολουθεί και δεύτερη φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 14.000 rpm.



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της απομόνωσης DNA με στήλη (ThermoFisher Scientific, 2022)

Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C . Με την ολοκλήρωση της απομόνωσης, ακολουθεί ποιοτική και ποσοτική αξιολόγηση των δειγμάτων.

2.3. Ποιοτική αξιολόγηση των δειγμάτων

Μετά την απομόνωση του DNA ακολουθεί η ποιοτική και η ποσοτική αξιολόγηση του δείγματος.

2.3.1. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ποιοτική αξιολόγηση της διαδικασίας της απομόνωσης DNA, πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης. Χρησιμοποιείται πηκτή αγαρόζης 1X, η οποία περιέχει

0,5gr αγαρόζης σε 50ml διαλύματος TBE 0,5X. Στο διάλυμα προστίθεται 4μl από τη χρωστική Xpert Green.

Για την ηλεκτροφόρηση, η πηκτή αγαρόζης τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει διάλυμα TBE 0,5X. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με ηλεκτρική τάση 100-150 V για 15-25 λεπτά. Τέλος, πραγματοποιείται οπτικοποίηση σε λάμπα UV.

2.4. Ποσοτική αξιολόγηση

Η ποσοτική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους: μέτρηση με το Quawell και μέτρηση με το Qubit.

2.4.1. Quawell

Το Quawell είναι ένα UV-Vis φασματοφωτόμετρο ικανό να μετράει νουκλεϊκά οξέα σε μικρο-όγκους δειγμάτων. Σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσεις του μηχανήματος, η μέτρηση γίνεται με τη χρήση 2μL δείγματος. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων λαμβάνονται σε αρχείο excel (Quawell Technology, 2017).

2.4.2. Qubit

Το Qubit είναι μια συσκευή που μετράει φθορισμό (Fluorometer) και είναι ικανό για ποσοτική μέτρηση DNA, RNA και πρωτεϊνών. Σε αυτή την περίπτωση στα δείγματα απαιτείται να πραγματοποιηθεί μια προεπεξεργασία πριν από τη μέτρησή τους. Το Kit περιλαμβάνει συμπυκνωμένο διάλυμα DMSO ως κύριο αντιδραστήριο, ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης καθώς και δύο πρότυπα αραιωμένου DNA. Απαιτούνται 2μL δείγματος, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Απαιτούνται επίσης ειδικά tubes των 500μL για κατευθείαν εισαγωγή τους στη συσκευή Qubit και μέτρηση (Thermo Fisher Scientific, 2015).

2.5. Σχεδιασμός εκκινήτων

Σχεδιάστηκαν δύο ζεύγη εκκινήτων, το ένα για μια περιοχή του χρωμοσώματος 10 και το άλλο για μια περιοχή του χρωμοσώματος 20. Συγκεκριμένα, το ζεύγος A στοχεύει στη θέση chr10: 46.378.087-16.378.194 και το ζεύγος B, στη θέση chr20: 37.085.414-37.085.537.

Οι αλληλουχίες των περιοχών αυτών είναι διαθέσιμες μέσω της ιστοσελίδας της Ensembl (Ensembl, n.d.). Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με χρήση της ιστοσελίδας Primer3 (Primer3web, n.d.) και της Beacon Designer (Beacon Designer, n.d.), χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες παραμέτρους.

Σχεδιάστηκαν οι εξής εκκινητές:

- Εκκινητής A

	Αλληλουχία	T _m
Forward Primer	5' – GTGTGGGCTTTTGGAGATGG – 3'	62.8°C
Reverse Primer	5' – TGGTGTCTGCATCCCTAGAT – 3'	58.1°C

- Εκκινητής B

	Αλληλουχία	T _m
Forward Primer	5' – TCCTGCTTTGTTGTTGCTCC – 3'	62.8°C
Reverse Primer	5' – TGACTTCATTTCAGAGGGTTCT – 3'	58.1°C

2.6. High Resolution Melting Analysis (HRM)

2.6.1. Κανονικοποίηση των δειγμάτων

Καθώς η HRM είναι ευαίσθητη ως προς την αρχική ποσότητα DNA των δειγμάτων, απαραίτητο βήμα πριν την εφαρμογή της μεθόδου είναι η κανονικοποίηση των δειγμάτων. Έγινε αραίωση όλων των DNA δειγμάτων, βάση της μέτρησης της ποσότητας του DNA με τη συσκευή Quawell, με τελική συγκέντρωση DNA 20ng/μL.

2.6.2. High Resolution Melting Analysis

Το kit της HRM περιλαμβάνει 2x HRM PCR Master Mix και RNAase free HRM water. Το Master Mix περιλαμβάνει HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase, Type-it HRM PCR Buffer, Q-Solution και dNTPs. Η HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase δεν είναι ενζυμικά ενεργή αρχικά με σκοπό την αποφυγή δημιουργίας λάθους προϊόντων και διμερών κατά την εκκίνηση της διαδικασίας. Το ένζυμο ενεργοποιείται στην αρχή της αντίδρασης στους 95°C, σε ένα βήμα που διαρκεί 5 λεπτά.

Η χρωστική που χρησιμοποιείται είναι η EvaGreen, η οποία προσδένεται επιλεκτικά στο dsDNA. Έχει μέγιστη απορρόφηση στα 500 nm (συνδεδεμένη με DNA) και μέγιστη εκπομπή στα 530 nm. Επιπλέον, η EvaGreen συνδέεται το ίδιο και σε περιοχές πλούσιες σε G/C, αλλά και σε περιοχές πλούσιες σε A/T.

Το κάθε δείγμα προετοιμάζεται ώστε να έχει τελικό όγκο 25μL. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η σύσταση του διαλύματος για την HRM.

	Συγκέντρωση	Όγκος ανά 25μL αντίδρασης
2x HRM PCR Master Mix	–	12,5 μL
Forward primer	10 μM	1,75 μL
Reverse primer	10 μM	1,75 μL
RNAase-free water	–	7 μL
DNA	20 ng/μL	2 μL

Η HRM αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια, όπως περιγράφονται παρακάτω.

Στάδιο 1

Το αρχικό στάδιο της αντίδρασης HRM πραγματοποιείται στους 95°C και διαρκεί 5 λεπτά. Είναι το στάδιο στο οποίο γίνεται ενζυμική ενεργοποίηση της HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase.

Στάδιο 2

Στη συνέχεια ακολουθεί ένα κυκλικό στάδιο τριών βημάτων. Το πρώτο βήμα είναι η αποδιάταξη του DNA (denaturation, 10 δευτερόλεπτα, 95°C), το δεύτερο βήμα είναι η υβριδοποίηση (annealing, 30 δευτερόλεπτα, 55°C) και τέλος η επιμήκυνση (extension, 10 δευτερόλεπτα, 72°C). Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται για 40 κύκλους.

Στάδιο 3

Τελικό στάδιο αποτελεί η ανάλυση HRM. Το στάδιο αυτό καλύπτει ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (65-95°C) ώστε να μπορεί να καλύψει και τις ποικίλες T_m που εντάσσονται στο εύρος αυτό. Η ανάλυση αυτή διαρκεί περίπου 2 δευτερόλεπτα.

Ολόκληρη η αντίδραση διαρκεί 155 λεπτά.

2.6.3. Αλληλούχιση αμπλικονίων

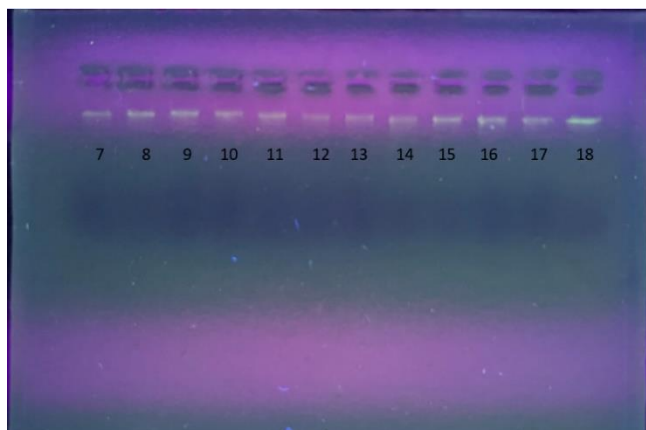
Αφού πραγματοποιηθούν αρκετές αντιδράσεις HRM, παρατηρούνται ορισμένα πρότυπα με τα οποία μπορεί να δημιουργηθεί κατηγοριοποίηση των δειγμάτων. Γίνεται ενίσχυση με PCR των επιθυμητών δειγμάτων – προτύπων. Στη συνέχεια, τα δείγματα αυτά υφίστανται καθαρισμό με το kit SureClean®, ώστε να απομακρυνθούν οι εκκινητές και τα διάφορα μη επιθυμητά συστατικά της PCR ή παραπροϊόντα και να σταλούν για αλληλούχιση. Ο καθαρισμός γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του kit και στο τέλος υπάρχει το DNA του εκάστοτε δείγματος διαλυμένο σε νερό (water for injections). Μαζί με τα δείγματα, αποστέλλονται και οι αντίστοιχοι εκκινητές με συγκεκριμένη αραίωση.

3. Αποτελέσματα

3.1. Απομόνωση DNA

3.1.1. Ποιοτική αξιολόγηση: Πήκτωμα αγαρόζης

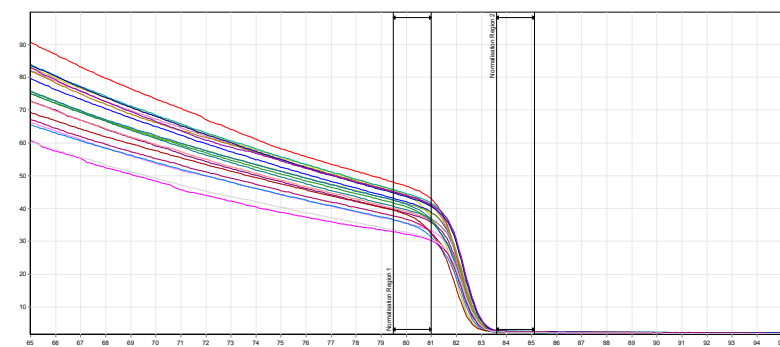
Μετά την απομόνωση του DNA, πραγματοποιήθηκε οπτικοποίηση σε λάμπα UV, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα.

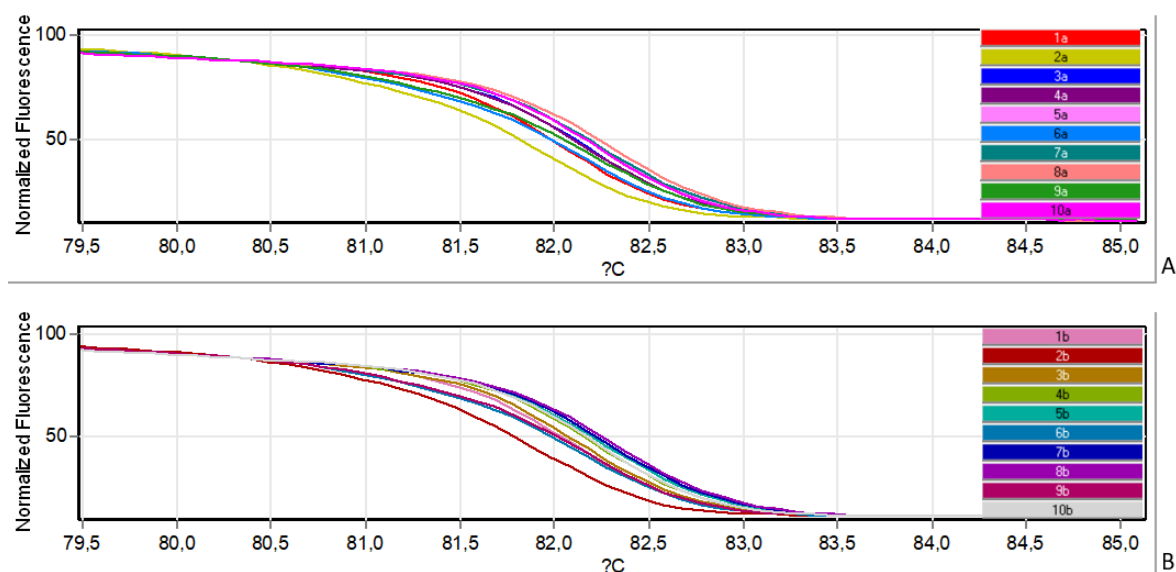


Εικόνα 7: Ενδεικτική φωτογραφία απομονωμένων δειγμάτων DNA μετά από ηλεκτροφόρηση.

3.1.2. Ποσοτική αξιολόγηση: επιλογή Quawell – Qubit

Επειδή η HRM είναι μια ευαίσθητη μέθοδος ως προς την αρχική συγκέντρωση των δειγμάτων, ήταν απαραίτητο να γίνει η επιλογή της συσκευής με την οποία θα γίνονταν οι μετρήσεις όλων των δειγμάτων. Για να γίνει αυτή η επιλογή πραγματοποιήθηκε μια αντίδραση HRM 10 κανονικοποιημένων δειγμάτων μετρημένα στη συσκευή Quawell και των ίδιων 10 στη συσκευή Qubit. Τα αποτελέσματα της αντίδρασης δεν έδειξαν κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων. Τελικά, επιλέχθηκε η συσκευή Quawell για τις μετρήσεις των δειγμάτων καθώς δεν απαιτεί τη χρήση αναλώσιμων.





Διάγραμμα 1: Οπτικοποίηση αποτελεσμάτων HRM από δείγματα που κανονικοποιήθηκαν σύμφωνα με τις συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν με τη συσκευή (A) Qubit και (B) Quawell.

3.2 Έλεγχος εκκινήτων

Για να διευκρινιστεί η καταλληλότητα των εκκινήτων που επιλέχθηκαν, πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικές αντιδράσεις PCR και HRM.

3.2.1. Δοκιμαστική PCR για εκκινήτες

Για να ελεγχθεί η λειτουργικότητα των εκκινήτων και να δοκιμαστούν οι βέλτιστες συνθήκες, πραγματοποιήθηκε από μια δοκιμαστική PCR για τον καθέναν.

	Ποσότητες ανά δείγμα
Buffer kappa Taq 10x	5 μ L
MgCl ₂	1 μ L
Forward Primer	0,5 μ L
Reverse Primer	0,5 μ L
dNTPs	1 μ L
Taq	0,2 μ L
H ₂ O	41 μ L
DNA	1 μ L

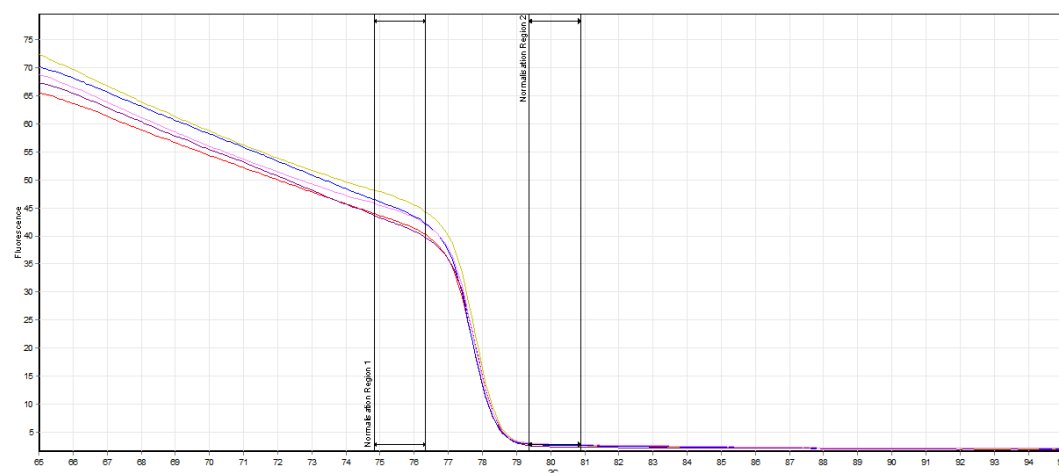
Η βέλτιστη θερμοκρασία για τους εκκινητές είναι οι 58°C.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης 2% με 0,8 gr αγαρόζης σε 50 ml διαλύματος TBE 0,5X.

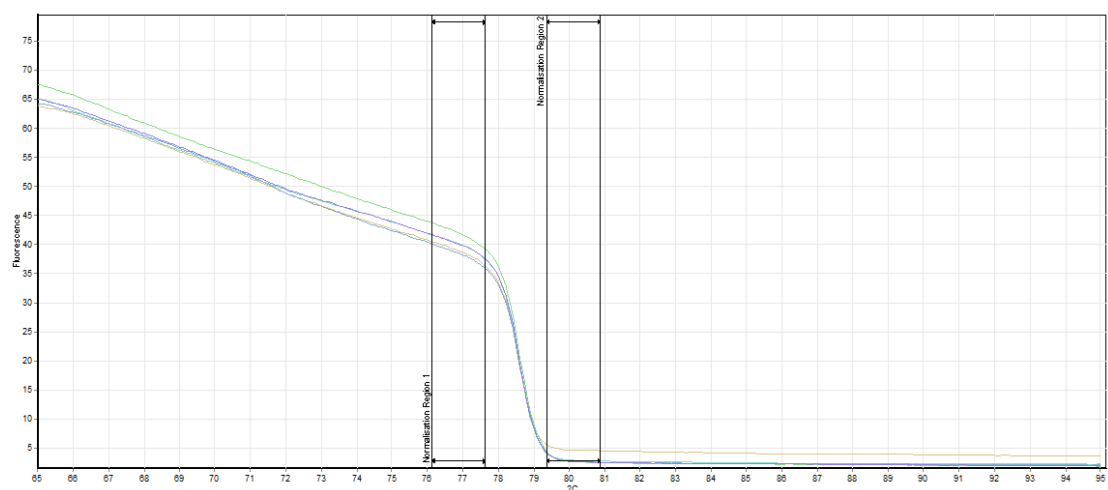
3.2.2. Δοκιμαστική HRM για εκκινητές

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε και δοκιμαστική HRM για τους εκκινητές.

Master Mix	per reaction
2X HRM MIX	12,5μl
F primer 10μM	1,75μl
R primer 10μM	1,75μl
H2O	7μl
DNA (20ng)	25 μL συνολικά



Διάγραμμα 2: Primer test για τον εκκινητή A.



Διάγραμμα 3: Primer test για τον εκκινητή B.

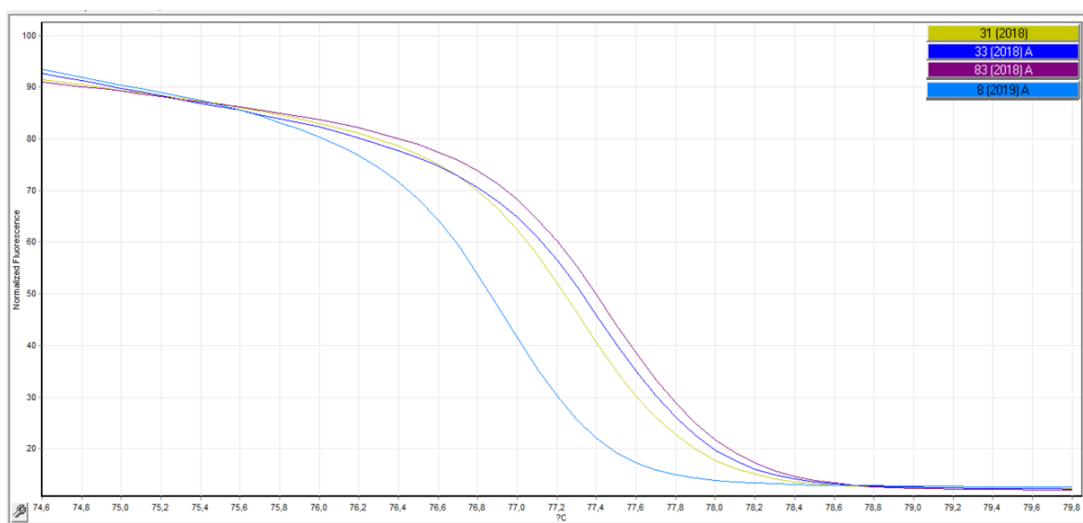
Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι οι επιλεγμένοι εκκινητές είναι κατάλληλοι για την πραγματοποίηση αντίδρασης HRM.

3.3. High Resolution Melting Analysis (HRM)

3.3.1. Primer A

Με τη χρήση του ζεύγους εκκινητών A, παρατηρήθηκαν 4 πρότυπα, όπως φαίνονται και παρακάτω.

Πρότυπα	Πρότυπα δείγματα	T_m °C
Πρότυπο 1	Δείγμα 31(2018)	77.30
Πρότυπο 2	Δείγμα 33(2018)	77.43
Πρότυπο 3	Δείγμα 83(2018)	77.49
Πρότυπο 4	Δείγμα 8(2019)	76.89

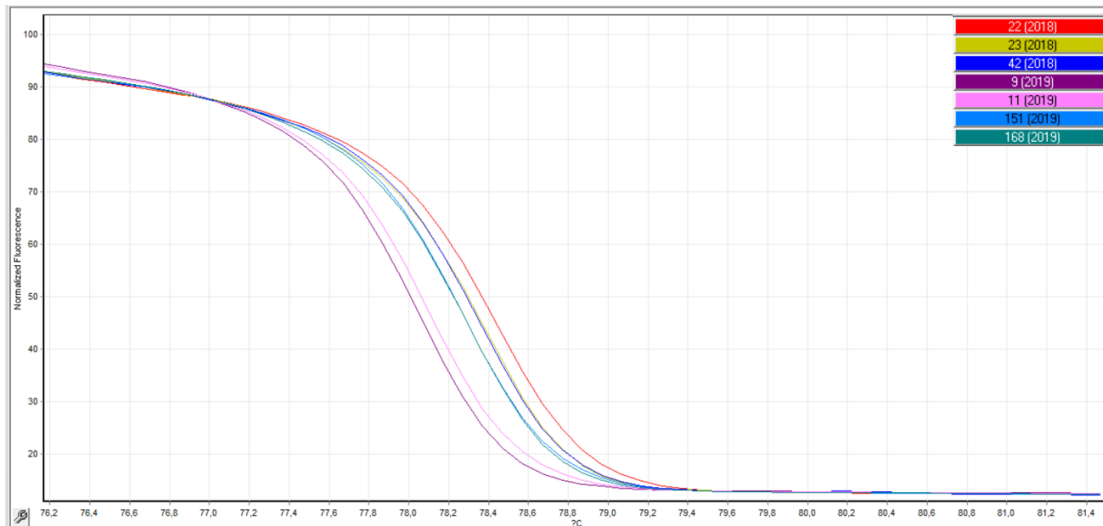


Διάγραμμα 4: Τα πρότυπα που εντοπίστηκαν για το πρώτο ζεύγος εκκινήτων.

3.3.2. Primer B

Με τη χρήση του ζεύγους εκκινήτων B, παρατηρήθηκαν 7 πρότυπα.

Πρότυπα	Πρότυπα δείγματα	T_m °C
Πρότυπο 1	Δείγμα 22 (2018)	79.37
Πρότυπο 2	Δείγμα 23 (2018)	79.21
Πρότυπο 3	Δείγμα 42 (2018)	78.91
Πρότυπο 4	Δείγμα 9 (2019)	78.2
Πρότυπο 5	Δείγμα 11 (2019)	78.00
Πρότυπο 6	Δείγμα 151 (2019)	78.43
Πρότυπο 7	Δείγμα 168 (2019)	78.15

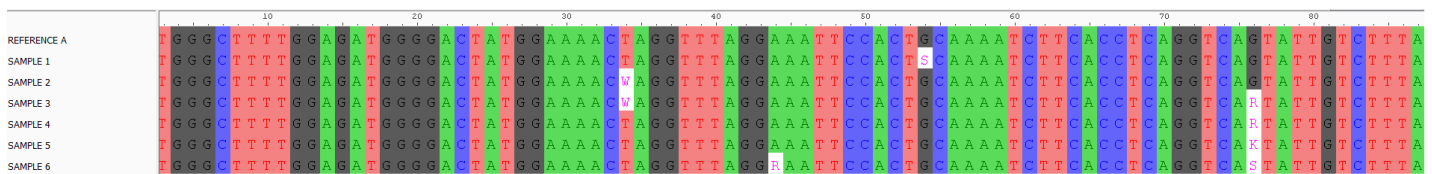


Διάγραμμα 4: Τα πρότυπα που εντοπίστηκαν για το δεύτερο ζεύγος εκκινητών.

3.4. Αλληλούχιση

3.4.1. Primer A

Για το πρώτο ζευγάρι Primers επιλέχθηκαν για αλληλούχιση 6 δείγματα. Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται τα αποτελέσματα της αλληλούχισης, όπου στην πρώτη σειρά φαίνεται η αλληλουχία αναφοράς (Ensembl, n.d.) και στη συνέχεια τα πρότυπα 1 έως 6 για το ζεύγος εκκινητών A.



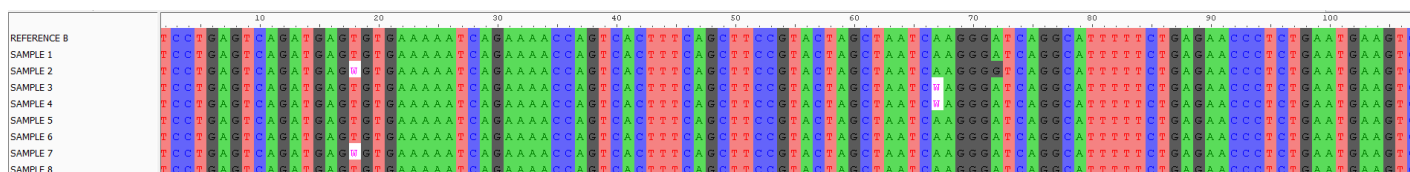
Εικόνα 8: Αποτελέσματα της αλληλούχισης για το πρώτο ζεύγος εκκινητών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αλληλούχισης, επιλέχθηκαν για ανάλυση οι εξής πολυμορφισμοί:

	SNP1 – Θέση 34	SNP2 – Θέση 44	SNP3 – Θέση 54	SNP4 – Θέση 76
Reference A	T	A	G	G
Sample 1	T	A	S (G/C)	G
Sample 2	W (T/A)	A	G	G
Sample 3	W (T/A)	A	G	R (G/A)
Sample 4	T	A	G	R (G/A)
Sample 5	T	A	G	K (G/T)
Sample 6	T	R (A/G)	G	S (G/C)

3.4.2. Primer B

Για το δεύτερο ζευγάρι εκκινητών επιλέχθηκαν για αλληλούχιση 8 δείγματα. Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται τα αποτελέσματα της αλληλούχισης, όπου στην πρώτη σειρά φαίνεται η αλληλουχίας αναφοράς (Ensembl, n.d.) και στη συνέχεια τα πρότυπα 1 έως 8 για το ζεύγος εκκινητών B.



Εικόνα 9: Αποτελέσματα της αλληλούχισης για το δεύτερο ζεύγος εκκινητών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αλληλούχισης, επιλέχθηκαν για ανάλυση οι εξής πολυμορφισμοί:

	SNP1 – Θέση 18	SNP2 – Θέση 67	SNP3 – Θέση 72
Reference A	T	A	A
Sample 1	T	A	A
Sample 2	W (A/T)	A	G
Sample 3	T	W (A/T)	A
Sample 4	T	W (A/T)	A
Sample 5	T	A	A
Sample 6	T	A	A
Sample 7	W (A/T)	A	A
Sample 8	T	A	A

3.5. Ανάλυση αποτελεσμάτων με SNPStats

Έγινε η ανάλυση των αποτελεσμάτων με βάση το SNPStats, για το κάθε ένα SNP ξεχωριστά. Τα δείγματα είναι χαρακτηρισμένα ως θερμοευαίσθητα (thermosensitive) ή θερμοανθεκτικά (thermotolerant).

3.5.1. Primer A

Για τον εκκινητή A, συλλέχθηκαν πληροφορίες συνολικά για 258 δείγματα.

- **SNP1**

- i. Αλληλομορφικές συχνότητες

Αλληλόμορφο	Σύνολο πληθυσμού		Θερμοευαίσθητα άτομα		Θερμοανθεκτικά άτομα	
	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα
T	407	0.79	229	0.8	178	0,77
A	109	0.21	57	0.2	52	0.23

- ii. Γονοτυπικές συχνότητες

Γονότυπος	Σύνολο πληθυσμού		Θερμοευαίσθητα άτομα		Θερμοανθεκτικά άτομα	
	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα
T/A	109	0.42	57	0.4	52	0.45
T/T	149	0.58	86	0.6	63	0.55

- iii. Υπολογισμός p - value

Γονότυπος	Θερμοευαίσθητα	Θερμοανθεκτικά	OR (95% CI)	p-value
T/T	86 (60.1 %)	63 (54,8 %)	1.00 1.25 (0.76-	0.39
T/A	57 (39.9 %)	52 (45.2 %)	2.05)	

- **SNP2**

- i. Αλληλομορφικές συχνότητες

Αλληλόμορφο	Σύνολο πληθυσμού		Θερμοευαίσθητα άτομα		Θερμοανθεκτικά άτομα	
	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα
A	497	0.96	276	0.97	221	0.96
G	19	0.04	10	0.03	9	0.04

ii. Γονοτυπικές συχνότητες

Γονότυπος	Σύνολο πληθυσμού		Θερμοαναισθητα άτομα		Θερμοανθεκτικά άτομα	
	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα
A/A	239	0.93	133	0.93	106	0.92
A/G	19	0.07	10	0.07	9	0.08

iii. Υπολογισμός p - value

Γονότυπος	Θερμοευαίσθητα	Θερμοανθεκτικά	OR (95% CI)	p-value
A/A	133 (93 %)	106 (92.2 %)	1.00 1.13 (0.44-	0.8
A/G	10 (7 %)	52 (7.8 %)	1.25)	

- SNP3

i. Αλληλομορφικές συχνότητες

Αλληλόμορφο	Σύνολο πληθυσμού		Θερμοαναισθητα άτομα		Θερμοανθεκτικά άτομα	
	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα
G	473	0.92	263	0.92	210	0.91
C	43	0.08	23	0.08	20	0.09

ii. Γονοτυπικές συχνότητες

Γονότυπος	Σύνολο πληθυσμού		Θερμοαναισθητα άτομα		Θερμοανθεκτικά άτομα	
	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα
G/C	43	0.17	23	0.16	20	0.17
G/G	215	0.83	120	0.84	95	0.83

iii. Υπολογισμός p - value

Γονότυπος	Θερμοευαίσθητα	Θερμοανθεκτικά	OR (95% CI)	p-value
G/G	120 (83.9 %)	106 (82.6 %)	1.00 1.10 (0.57-	0.78
G/C	23 (16.1 %)	9 (17.4 %)	2.12)	

- **SNP4**

i. Αλληλομορφικές συχνότητες

Αλληλόμορφο	Σύνολο πληθυσμού		Θερμοαναίσθητα άτομα		Θερμοανθεκτικά άτομα	
	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα
G	336	0.69	192	0.67	163	0.70
A	100	0.2	58	0.20	42	0.19
T	42	0.08	26	0.09	16	0.07
C	19	0.03	10	0.04	9	0.04

ii. Γονοτυπικές συχνότητες

Γονότυπος	Σύνολο πληθυσμού		Θερμοαναίσθητα άτομα		Θερμοανθεκτικά άτομα	
	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα
G/A	100	0.39	58	0.4	42	0.36
G/G	97	0.38	49	0.35	48	0.42
G/T	42	0.16	26	0.18	16	0.14
G/C	19	0.07	10	0.07	9	0.08

iii. Υπολογισμός p - value

Γονότυπος	Θερμοευαίσθητα	Θερμοανθεκτικά	OR (95% CI)	p-value
G/G	49 (34.3%)	48 (41.7%)	1.00 0.74 (0.42- 1.30)	0.38
G/A	58 (40,5%)	42(36.5%)		
G/T	26 (18.2%)	16 (14%)		
G/C	10 (7%)	9 (7,8%)		

Στους παραπάνω πίνακες φαίνεται ο αριθμός των αλληλομόρφων και των γονοτύπων για κάθε SNP που βρέθηκε. Στα SNP1, SNP2 και SNP3 οι ομόζυγοι γονότυποι συνολικά βρέθηκαν σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό από ότι οι ετερόζυγοι. Για το SNP4 ο ομόζυγος γονότυπος G/G και ο ετερόζυγος γονότυπος G/A βρέθηκαν σε σχεδόν ίδιες συχνότητες και στο σύνολο των δειγμάτων αλλά και στις κατηγορίες “thermosensitive” και “thermotolerant”.

Όλα τα αλληλόμορφα και όλοι οι γονότυποι εμφανίζουν παραπλήσιες αντίστοιχες συχνότητες τόσο στο σύνολο των δειγμάτων όσο και στις δύο υπό μελέτη κατηγορίες. Οι τιμές p – value που υπολογίστηκαν είναι > 0,05 επομένως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης των παραπάνω SNPs σε ευαίσθητα και ανθεκτικά άτομα.

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση απλοτύπου συγκεντρώνονται στον παρακάτω πίνακα. Η ανάλυση έδειξε ότι υπάρχουν 6 απλότυποι.

	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4	Συνολική συχνότητα	Θερμοεναίσθητα	Θερμοανθεκτικά
1	T	A	G	G	0.4342	0.4509	0.3868
2	A	A	G	G	0.1788	0.1468	0.2453
3	T	A	G	A	0.1599	0.1506	0.1981
4	T	A	C	G	0.09	0.0865	0.0943
5	T	A	G	T	0.0879	0.0977	0.0755
6	A	A	G	A	0.0493	0.0675	0

Στους απλότυπους αυτούς δεν εντοπίζεται κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισής τους.

3.5.2. Primer B

Για τον εκκινητή B, συλλέχθηκαν πληροφορίες συνολικά για 274 δείγματα.

- **SNP1**

- i. Αλληλομορφικές συχνότητες

Αλληλόμορφο	Σύνολο πληθυσμού		Θερμοεναίσθητα άτομα		Θερμοανθεκτικά άτομα	
	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα
T	396	0.72	226	0.74	170	0.7
A	152	0.28	80	0.26	72	0.3

- ii. Γονοτυπικές συχνότητες

Γονότυπος	Σύνολο πληθυσμού		Θερμοεναίσθητα άτομα		Θερμοανθεκτικά άτομα	
	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα
T/A	152	0.55	80	0.52	72	0.6
T/T	122	0.45	73	0.48	49	0.4

iii. Υπολογισμός p - value

Γονότυπος	Θερμοευαίσθητα	Θερμοανθεκτικά	OR (95% CI)	p-value
T/T	73 (47.7%)	49 (40.5 %)	1.00 1.34 (0.83- 2.17)	0.23
T/A	80 (52.3%)	72 (59.5 %)		

• SNP2

i. Αλληλομορφικές συχνότητες

Αλληλόμορφο	Σύνολο πληθυσμού		Θερμοευαίσθητα άτομα		Θερμοανθεκτικά άτομα	
	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα
A	466	0.85	256	0.84	210	0.87
T	82	0.15	50	0.16	32	0.13

ii. Αλληλομορφικές συχνότητες

Γονότυπος	Σύνολο πληθυσμού		Θερμοευαίσθητα άτομα		Θερμοανθεκτικά άτομα	
	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα
A/A	192	0.7	103	0.67	89	0.74
A/T	82	0.3	50	0.33	32	0.26

iii. Υπολογισμός p - value

Γονότυπος	Θερμοευαίσθητα	Θερμοανθεκτικά	OR (95% CI)	p-value
A/A	103 (67.3 %)	89 (73.5 %)	1.00 0.74 (0.44- 1.25)	0.26
A/T	50 (32.7 %)	32 (26.5 %)		

• SNP3

i. Αλληλομορφικές συχνότητες

Αλληλόμορφο	Σύνολο πληθυσμού		Θερμοευαίσθητα άτομα		Θερμοανθεκτικά άτομα	
	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα
G	294	0.54	156	0.51	138	0.57
A	254	0.46	150	0.49	104	0.43

ii. Γονοτυπικές συχνότητες

Γονότυπος	Σύνολο πληθυσμού		Θερμοαναίσθητα άτομα		Θερμοανθεκτικά άτομα	
	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα	Αριθμός	Συχνότητα
A/A	127	0.46	75	0.49	52	0.43
G/G	147	0.54	78	0.51	69	0.57

iii. Υπολογισμός p - value

Γονότυπος	Θερμοευαίσθητα	Θερμοανθεκτικά	OR (95% CI)	p-value
G/G	78 (51 %)	69 (57 %)	1.00 0.78 (0.49-	0.32
A/A	75 (49 %)	32 (43 %)	1.27)	

Αναφορικά για τα SNPs που εντοπίστηκαν με τη χρήση του ζεύγους εκκινιτών B, το SNP2 έχει σε μεγαλύτερη συχνότητα τον ομόζυγο γονότυπο. Τα SNP1 και SNP3 φαίνεται πως εμφανίζουν παραπλήσιες συχνότητες για τους δύο γονότυπους που εντοπίστηκαν. Και για τα 3 SNPs οι γονότυποι εμφανίζουν παρόμοιες συχνότητες τόσο στο σύνολο των δειγμάτων όσο και στις δύο κατηγορίες, “thermosensitive” και “thermotolerant”.

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση απλότυπου συγκεντρώνονται στον παρακάτω πίνακα.

Υπάρχουν 5 σύνολα πολυμορφισμών.

	SNP1	SNP2	SNP3	Συνολική συχνότητα	Θερμοευαίσθητα	Θερμοανθεκτικά
1	T	A	A	0.3047	0.3203	0.2851
2	A	A	G	0.2682	0.2549	0.2851
3	T	A	G	0.2682	0.2549	0.2851
4	T	T	A	0.1496	0.1634	0.1322
5	A	A	A	0.0091	0.0065	0.0124

Στους απλότυπους αυτούς δεν εντοπίζεται κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισής τους.

4. Συμπεράσματα – Συζήτηση

Η θερμική καταπόνηση προκαλεί πολλές διαταραχές στην υγεία, την ευημερία αλλά και την απόδοση των ζώων εκτροφής. Η κατάσταση αυτή έχει επιδεινωθεί παγκοσμίως τα τελευταία χρόνια λόγω της κλιματικής αλλαγής και ειδικότερα κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. Οι επιπτώσεις στα ζώα μπορεί να είναι τόσο άμεσες, όπως ασθένειες και θνητότητα, όσο και έμμεσες, όπως επιδράσεις λόγω αλλαγών στη συμπεριφορά, έλλειψη νερού κ.α..

Στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, οι βασικότεροι παράγοντες που οδηγούν σε θερμική καταπόνηση είναι η θερμοκρασία, η σχετική υγρασία, η ηλιακή ακτινοβολία, η ατμοσφαιρική πίεση και η ταχύτητα του ανέμου. Έτσι, διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ της ενδογενούς θερμοκρασίας και της θερμότητας που χάνεται από το σώμα. Ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα που προκαλείται στα βοοειδή είναι η διαταραχή αναπαραγωγικών διαδικασιών. Ως απόρροια, μειώνονται τα ποσοστά σύλληψης και μειώνεται σημαντικά η γαλακτοπαραγωγή. Αυτό οφείλεται σε καταστάσεις, όπως η μείωση του ενεργειακού ισοζυγίου λόγω μείωσης της πρόσληψης της τροφής. Αυτό με τη σειρά του οδηγεί σε διαταραγμένα επίπεδα ορμονών, όπως η αυξητική ορμόνη, η ωχρινοτρόπος ορμόνη, η οιστραδιόλη, η προλακτίνη, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει χαμηλή ποιότητα ωαρίων, αποτροπή της ωορρηξίας, αναστολή ανάπτυξης ωοθυλακίων κ.α. Επιπλέον, επηρεάζεται και το ενδομήτριο περιβάλλον οδηγώντας συχνά σε πρόωμη εμβρυική απώλεια.

Τα μειωμένα ποσοστά σύλληψης μέσω τεχνητής γονιμοποίησης και η μειωμένη παραγωγή και ποιότητα γάλακτος έχουν σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις. Για το λόγο αυτό γίνονται προσπάθειες στήριξης της αγοράς και της εκτροφής βοοειδών. Όσον αφορά την εκτροφή, έχουν αναπτυχθεί διάφορες επιστημονικές μέθοδοι με σκοπό τη διαχείριση της θερμικής καταπόνησης και την καλύτερη ευημερία των ζώων. Αυτές περιλαμβάνουν, κατά κύριο λόγο, συστήματα ψεκασμού νερού ώστε να διατηρείται η θερμοκρασία περιβάλλοντος σε επιθυμητά επίπεδα.

Παρόλα αυτά, οι λύσεις που έχουν δοθεί δεν είναι απόλυτα αποτελεσματικές. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει γενετική διαφοροποίηση μεταξύ ειδών και φυλών βοοειδών που σχετίζονται με τη θερμοανθεκτικότητα. Επομένως το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στη μοριακή και γενετική μελέτη της θερμοαντοχής στα εκτρεφόμενα βοοειδή. Έχουν, λοιπόν, χαρτογραφηθεί SNPs που φαίνεται να εμφανίζουν συσχέτιση με την αντοχή σε θερμική καταπόνηση. Τέτοια SNPs έχουν χαρτογραφηθεί σε γονίδια που, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχουν συνδεθεί με περιβαλλοντικό στρες και θερμοανθεκτικότητα στα ζώα. Άλλα SNPs που βρέθηκε ότι έχουν ισχυρή συσχέτιση με τα επίπεδα παραγωγής γάλακτος, χαρτογραφήθηκαν σε γενετικούς τόπους που φαίνεται να έχουν πλειοτροπική επίδραση στην

παραγωγή βόειου γάλακτος. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί, ότι νέοι πολυμορφισμοί έχουν εντοπιστεί σε γονίδια που σχετίζονται με κυτταρικές λειτουργίες υπό στρες, όπως για παράδειγμα μεταβολισμός και ομοιόσταση. Τέλος, κάποιες από αυτές τις παραλλαγές αφορούν και το νευρικό σύστημα των βοοειδών, καθώς και λειτουργίες που έχουν να κάνουν με την αλληλεπίδραση μεταξύ νευροϋποδοχέα και συνδέτη.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, επιλέχθηκαν να μελετηθούν δύο γονιδιακές περιοχές: μία στο χρωμόσωμα 10 και μία στο χρωμόσωμα 20. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος από 346 θηλυκές αγελάδες, οι οποίες είχαν χαρακτηριστεί θερμοανθεκτικές και θερμοευαίσθητες, σύμφωνα με την επιτυχία εγκυμοσύνης ύστερα από τεχνητή σπερματέγχυση σε συνθήκες με THI > 72. Η μοριακή τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η High Resolution Melting Analysis (HRM), η οποία προσδίδει ακρίβεια στα αποτελέσματα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μεγάλο αριθμό δειγμάτων και είναι μία οικονομική μέθοδος. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση για να προσδιοριστεί η συχνότητα εμφάνισης των πολυμορφισμών που εντοπίστηκαν, καθώς και η συσχέτισή τους με την θερμοαντοχή των βοοειδών.

Πιο συγκεκριμένα, στο χρωμόσωμα 10 εντοπίζεται το γονίδιο *HERC1* (HECT And RLD Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase Family Member 1). Η βιβλιογραφία αναφέρει την ύπαρξη ενός πολυμορφισμού στο γονίδιο αυτό, τον rs133428964, ο οποίος και αφορά μεταλλαγή G/A στην 5' αμετάφραστη περιοχή και βρίσκεται στη θέση chr10:46.378.062 και βρέθηκε πως επιδρά στο γονίδιο *HERC1*. Με βάση τον πολυμορφισμό αυτό, σχεδιάστηκαν primers που να στοχεύουν στη θέση chr10: 46.378.087-16.378.194, με σκοπό τον εντοπισμό άλλων πολυμορφισμών που να έχουν παρόμοια επίδραση. Εντοπίστηκαν τέσσερις νέοι πολυμορφισμοί. Ο πρώτος αφορά τη θέση 34 και πρόκειται για μεταλλαγή T-A, ο δεύτερος αφορά τη θέση 44 και τη μεταλλαγή A-G και ο τρίτος στη θέση 54 με τη μεταλλαγή G-C. Ο τέταρτος πολυμορφισμός, βρίσκεται στη θέση 76 και παρουσιάζει ενδιαφέρον, καθώς στη θέση αυτή βρέθηκαν τέσσερις παραλλαγές G/A/T/C. Από τη στατική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για καθέναν από αυτούς τους πολυμορφισμούς, φάνηκε πως εμφανίζονται με παρόμοιες συχνότητες στα υπό εξέταση ζώα και δεν υπάρχει κάποια διαφορά μεταξύ της ομάδας των θερμοευαίσθητων και της ομάδας των θερμοανθεκτικών που να είναι στατιστικά σημαντική.

Αντίστοιχα, στο χρωμόσωμα 20 βρίσκεται το γονίδιο *CPLANE1* (Ciliogenesis And Planar Polarity Effector Complex Subunit 1). Κοντά στο γονίδιο αυτό, χαρτογραφείται ο πολυμορφισμός rs41946451, ο οποίος αφορά μια σημειακή μετάλλαξη G/A και έχει βρεθεί συσχέτιση με θερμοανθεκτικότητα. Έτσι, σχεδιάστηκαν primers που να στοχεύουν στη θέση chr20: 37.085.414-37.085.537, ώστε να εντοπιστούν κι άλλοι πολυμορφισμοί με αντίστοιχες

ιδιότητες. Εντοπίστηκαν τρεις νέοι πολυμορφισμοί, εκ των οποίων ο πρώτος βρίσκεται στη θέση 18 με μεταλλαγή T-A, ο δεύτερος στη θέση 67 με μεταλλαγή A-T και ο τρίτος στη θέση 72 με μεταλλαγή A-G. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν πώς δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης των SNPs και των απλοτύπων στα θερμοανθεκτικά και θερμοευαίσθητα ζώα που μελετήθηκαν. Επομένως, δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική ένδειξη ότι οι πολυμορφισμοί αυτοί εμφανίζουν συσχέτιση με θερμοανθεκτικότητα.

Ως γενικό συμπέρασμα, τα SNPs που εντοπίστηκαν στις επιλεγμένες περιοχές, δεν εμφάνισαν στατιστική σημαντικότητα στις συχνότητες εμφάνισης τους σε θερμοανθεκτικά και θερμοευαίσθητα άτομα. Ως συνέχεια της μελέτης, προτείνεται η στόχευση περισσότερων γονιδίων που να έχουν συσχέτιση με τη θερμική καταπόνηση και την παραγωγή γάλακτος, όπως τα γονίδια *DGATI*, *MGST1* και *DHR*. Η High Resolution Melting Curve είναι μία κατάλληλη μοριακή τεχνική για την ανίχνευση πολυμορφισμών σε αυτά τα γονίδια, καθώς είναι απλή στη χρήση και μπορεί να μελετηθεί με μεγάλη ακρίβεια ένας μεγάλος όγκος δειγμάτων. Επίσης, με τη μέθοδο αυτή, δίνεται η δυνατότητα στόχευσης σε συγκεκριμένων περιοχών ενδιαφέροντος. Επιπλέον, στη βιβλιογραφία αναφέρεται πώς υπάρχουν μηχανισμοί που προσδίδουν θερμοαντοχή σε ζώα, οι οποίοι δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Η διατύπωση αυτή, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα πολλά από τα γονίδια αυτά δρουν πλειοτροπικά, ίσως να υποδηλώνει την ανάγκη για περισσότερη μελέτη και, επομένως, κατανόηση των ίδιων των μηχανισμών που αποδίδουν θερμοαντοχή. Με τον τρόπο αυτό, η έρευνα θα μπορεί να είναι περισσότερο στοχευμένη σε πιο συγκεκριμένα γονίδια, στη δράση τους και στην κληρονομικότητά τους. Έτσι, θα μπορούν στη συνέχεια να πραγματοποιούνται επιλεκτικές διασταυρώσεις, με σκοπό τη δημιουργία πληθυσμών που να έχουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά.

Βιβλιογραφία

- Animal Diversity Web*. (n.d.). Retrieved from University of Michigan: https://animaldiversity.org/accounts/Bos_taurus/#physical_description
- Applied Biosystems. (2009). *A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis*. USA.
- Armstrong, D. (1994). Heat stress interactions with shade and cooling. *Dairy Science*(77), σσ. 2044-2050.
- Beacon Designer . (n.d.). *Beacon Designer* . Retrieved from <http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>.
- Bournaoui R, L. M. (2002). The relationship of temperature-humidity index with milk production of dairy cows in a Mediterranean climate. *Anim. Res.* (51), σσ. 479-491. doi:10.1051/animres:2002036
- Cattle Gene Atlas. (2022). Ανάκτηση από <http://cattlegeneatlas.roslin.ed.ac.uk/>
- Cheruiyot E., H.-M. M. (2021). New loci and neuronal pathways for resilience to heat stress in cattle. *Nature*. doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-021-95816-8>
- Dash S, C. A. (2016). Effect of heat stress on reproductive performances of dairy cattle and buffaloes: A review. *Veterinary World*, 9(3), pp. 235-244. doi:10.14202/vetworld.2016.235-244
- Druml B., C.-M. M. (2014). High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis. *Food Chemistry*(158), σσ. 245-254. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.111>
- Ensembl. (n.d.). *Ensembl genome browser 107*. Retrieved from <https://www.ensembl.org/index.html>.
- European Commission. (2022). Ανάκτηση από Milk and dairy products: https://agriculture.ec.europa.eu/farming/animal-products/milk-and-dairy-products_en
- European Commission. (2022). Retrieved from Agriculture and rural development: https://agriculture.ec.europa.eu/farming/animal-products/beef_el
- Eurostat . (2022). Retrieved from Production of meat: cattle: <https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/tag00044/default/table?lang=en>
- Eurostat. (2022). Retrieved from Cows'milk collection and products obtained - annual data: https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/apro_mk_colade/default/table?lang=en
- Fabio De Rensis, R. J. (2003). Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow - a review. *Elsevier*(60), σσ. 1139–1151. doi:doi:10.1016/S0093-691X(03)00126-2
- Flamenbaum I., G. N. (2010). Management of heat stress to improve fertility in dairy cows in Israel. *Journal of Reproduction and Development*(56), σσ. 1–6. doi:<https://doi.org/10.1262/jrd.1056S36>
- Fregley M.J. (1996). Adaptations: some general characteristics. *Handbook of Physiology, Section 4: Environmental, 1*, 3-15.

- IPCC. (2022). *The Intergovernmental Panel on Climate Change*. Ανάκτηση από <https://www.ipcc.ch/>
- Liu Y.X., Z. X. (2010). Association of ATP1A1 gene polymorphism with heat tolerance traits in dairy cattle. *Genetics and Molecular Research*, 9(2), σσ. 891-896.
- Nardone A., R. B. (2010). Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. *Elsevier*, pp. 57–69. doi:10.1016/j.livsci.2010.02.011
- Primer3web. (n.d.). *Primer3web*. Retrieved from <https://primer3.ut.ee/>.
- QIAGEN®. (2009). *Sample and Assay Technologies: Type-it® HRM PCR Handbook*. Retrieved from <http://qiagen.com>
- Quawell Technology. (2017). Q5000 UV-Vis Spectrophotometer User's Manual.
- Reed G., K. O. (2007). High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, 8(6), σσ. 597–608.
- SNPStats. (n.d.). *SNPStats*. Retrieved from snpstats.net.
- Szumilas, M. (2010, August). Explaining Odds Ratios. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 19(3), pp. 227-229.
- Thermo Fisher Scientific. (2015). Qubit® dsDNA BR Assay Kits.
- ThermoFisher Scientific. (2022). Retrieved from PureLink™ Genomic DNA Mini Kit: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K182001>
- West, J. W. (2003). Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle. *J. Dairy Science*(86), σσ. 2131–2144.
- Wolfenson D., R. Z. (2019). Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. *Animal Frontiers*, pp. 32-38. doi:10.1093/af/vfy027