



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Φυλογενετική προέλευση και θερμοαντοχή :
Υπάρχει σύνδεση ;
Το παράδειγμα των εκτρεφόμενων αγελάδων**



**Δημήτρης Χαϊδάς
Λάρισα 2019**

Τίτλος :

Φυλογενετική προέλευση και θερμοαντοχή : Υπάρχει σύνδεση ;
Το παράδειγμα των εκτρεφόμενων αγελάδων

Phylogenetic origin and thermotolerance; is there a linkage?
The example of dairy cows

Τριμελής επιτροπή :

1. Επιβλέπων καθηγητής: **ΖΗΣΗΣ ΜΑΜΟΥΡΗΣ**

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών - Πρύτανης Π.Θ.

2. **ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΜΟΥΤΟΥ**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών

3. **ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΣΤΑΜΑΤΗΣ**

Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό

Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες	5
Περίληψη	6
Summary	7
1.1 Αγελάδες Holstein	8
1.1.1 Βοοτροφία στην Ελλάδα.....	9
1.2 Θερμικό στρες.....	10
1.2.1 Κλιματική αλλαγή και θερμικό στρες.....	10
1.2.2 Δείκτης θερμοκρασίας-υγρασίας	12
1.2.3 Μηχανισμός αντιμετώπισης της θερμικής καταπόνησης στις αγελάδες	13
1.2.4 Συνέπειες του θερμικού στρες	13
1.2.5 Ανάγκη για επιλογή των θερμοανθεκτικών αγελάδων.....	14
1.3 Θερμοαντοχή.....	15
1.3.1 Θερμοαντοχή και θερμικό στρες κατά τη διάρκεια καθυστερημένης κήσης	16
1.4.Μιτοχόνδριο	17
1.4.1 Παραγωγή θερμότητας στο μιτοχόνδριο.....	17
1.4.2 Γονιδίωμα μιτοχονδρίου	17
1.4.3 Ρόλος μιτοχονδρίου.....	18
1.4.4 Απλότυποι μιτοχονδριακού DNA	19
1.5 Σχέση φυλογένεσης και μιτοχονδριακού γονιδιώματος	20
1.6 Πολυμορφισμός	22
1.7 Σκοπός του πειράματος.....	24
2.Υλικά και μέθοδοι.....	25
2.1. Υλικά.....	25
2.2 Μέθοδοι.....	26
2.2.1 Δείγματα.....	26
2.2.2 Απομόνωση DNA	26
2.2.3. Προσδιορισμός ποσότητας DNA.....	26
2.2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - PCR	26
2.2.5 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης.....	29
2.2.6 Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP) : Single-strand conformation polymorphism.....	30
2.2.7. Χρώση πηκτής πολυακρυλαμίδης σε διάλυμα νιτρικού άργυρου	31
2.2.8 Αλληλούχηση των προϊόντων PCR	32
3.Αποτελέσματα.....	33
3.1Απομόνωση.....	33

3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης(PCR)	34
3.3 Single-strand conformation polymorphism(SSCP)	34
3.4 Αλληλούχηση	35
4.Συζήτηση.....	37
Βιβλιογραφία.....	39

Ευχαριστίες

Θα ήθελα, κατ' αρχήν, να ευχαριστήσω θερμά την τριμελή επιτροπή μου που αποτελείται από τον κ. Ζήση Μαμούρη , την κα Μούτου Αικατερίνη και τον κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο για την ανάθεση της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας στο πλαίσιο των προπτυχιακών σπουδών μου στο εργαστήριο της Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας και τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ τον Διδάκτορα Γιαννούλη Θεμιστοκλή για την σημαντική βοήθεια που μου προσέφερε με τις συμβουλές του, την άψογη συνεργασία και την πολύτιμη καθοδήγηση που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου σκοπό την πραγματοποίησή της. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για τη βοήθειά τους και την άψογη συνεργασία που είχα μαζί τους.

Περίληψη

Η υπερθέρμανση του πλανήτη επηρεάζει άμεσα τα συστήματα ζωικής παραγωγής και ιδιαίτερα εκείνα που χρησιμοποιούν βοοειδή για μεγάλη παραγωγή γάλακτος. Οι συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και υγρασίας στο περιβάλλον επηρεάζουν αρνητικά τις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής που αποτελούν τον υπό μελέτη πληθυσμό αυτής της εργασίας. Οι πληθυσμοί αυτοί παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα παραγωγής γάλακτος και μειωμένο αριθμό κηρήσεων που αποτελούν συνέπειες του θερμικού στρες. Ωστόσο, μεταξύ αυτών των πληθυσμών παρατηρούνται ανθεκτικά άτομα ως προς τη θερμική καταπόνηση που εμφανίζουν ήπια συμπτώματα. Για τη διερεύνηση αυτών των ατόμων, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της περιοχής D-Loop του μιτοχονδριακού DNA για την εύρεση πολυμορφισμών που να σχετίζονται με τη θερμοαντοχή. Στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία, πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από δείγματα αίματος αγελάδας τα οποία με τη χρήση κατάλληλου ζεύγους εκκινητών ενισχύθηκαν με την αντίδραση PCR. Έπειτα, τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε τζελ πολυακρυλαμίδης και μέσω της SSCP έγινε ο διαχωρισμός των προτύπων. Ακολούθως, τα πρότυπα αλληλουχήθηκαν και προέκυψε η αλληλουχία του τμήματος του επιθυμητού γονιδίου. Συνολικά ανιχνεύθηκαν 14 πρότυπα, στα οποία εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί που υπάρχουν στη βιβλιογραφία καθώς και 11 επιπλέον πολυμορφισμοί.

Summary

Global warming has a direct impact on livestock production systems, especially those using dairy cows for high milk production. High temperature and humidity conditions affect negatively dairy cows, which are the study population of this work. Under these conditions, dairy cows show low levels of milk production and decreased calving rate that are sequences of heat stress. However, there are thermotolerant cows with milder symptoms amongst these populations. In order to investigate these thermotolerant individuals, the D-Loop region of mitochondrial DNA was used to find polymorphisms associated with thermotolerance. In this study, DNA was isolated from cow blood samples and then amplified by PCR using the correct pair of primers. Afterwards, the PCR products were electrophoresed on polyacrylamide gel and the standards were observed by SSCP. In the final stage, the standards were sequenced and the sequence of the desired gene was obtained. Overall, 14 different standards were detected which contain polymorphisms existed on known bibliographies and 11 extra polymorphisms.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Αγελάδες Holstein

Η φυλή Χολστάιν προέρχεται από την Ευρώπη και συγκεκριμένα από δύο βόρειες περιοχές της σημερινής Ολλανδίας, τη Βόρεια Ολλανδία και τη Φριςλανδία (Friesland) η οποία αποτελούσε επιλογή για αιώνες με σκοπό την υψηλή γαλακτοπαραγωγή. Η πορεία της Χολστάιν συνεχίσθηκε από την Ολλανδία στο Νέο Κόσμο, όπου έκανε την πρώτη εμφάνισή της στη Βοστώνη, γύρω στα 1850. Έπειτα, ακολούθησαν και άλλες εισαγωγές ζώων από την Ολλανδία όμως οι τοπικοί παραγωγοί της Αμερικής είχαν σταματήσει νωρίτερα τις μαζικές εισαγωγές και ιδρύσει την Ένωση Παραγωγών με το δικό τους γενεαλογικό βιβλίο και επιλέγοντας ζώα με υψηλές αποδόσεις εν τέλει δημιούργησαν την δική τους φυλή την οποία ονόμασαν Χολστάιν. Σήμερα η ονομασία αυτή χρησιμοποιείται σε όλες τις χώρες, ενώ ταυτόχρονα χρησιμοποιείται και το όνομα Φρίζιαν ή ασπρόμαυρη (-κόκκινη) φυλή.

Οι αγελάδες Χολστάιν ξεχωρίζουν εύκολα λόγω του χαρακτηριστικού ασπρόμαυρου χρωματισμού τους ενώ υπάρχουν και οι ασπροκόκκινες αγελάδες, οι οποίες προκύπτουν ως απόγονοι των ασπρόμαυρων στην περίπτωση όπου και οι δύο γονείς είναι φορείς ενός υποτελούς γονιδίου που δίνει αυτόν τον χρωματισμό μόνο σε κατάσταση ομοζυγωτίας. Στην Ελλάδα οι ασπροκόκκινες αγελάδες εκτρέφονται μέσα σε αγέλες μαζί με τις ασπρόμαυρες ενώ στο εξωτερικό υπάρχουν ξεχωριστές αγέλες με αποκλειστικά ασπροκόκκινες.



Εικόνα 1: Η ασπρόμαυρη αγελάδα Χολστάιν στα αριστερά και η ασπροκόκκινη στα δεξιά

Η φυλή Χολστάιν επικράτησε στις προτιμήσεις των παραγωγών εξαιτίας της υψηλής της παραγωγής γάλακτος που έχει και η οποία είναι, κατά μέσον όρο, μεγαλύτερη όσον αφορά τις υπόλοιπες φυλές αγελάδων αλλά με σχετικά μικρότερη περιεκτικότητα του γάλακτός της σε λίπος. Παράλληλα, προσφέρει και μια ικανοποιητική απόδοση σε μοσχαρίσιο κρέας ανάμεσα στις γαλακτοπαραγωγικές φυλές των βοοειδών.

Αποτελεί επίσης την πιο διαδεδομένη φυλή στις ΗΠΑ, τον Καναδά, την Αυστραλία, την Ν. Αμερική και τη Ν. Αφρική και σε πολλές χώρες της Ευρώπης, με συνολικό πληθυσμό πολλών δεκάδων εκατομμυρίων. Όσον αφορά την Ελλάδα, οι αγελάδες Χολστάιν ο πληθυσμός τους υπολογίζεται περίπου στα 203.000 ζώα από τα οποία τα 150.000 περίπου είναι αρμεγόμενα ενώ τα υπόλοιπα είναι ζώα αντικατάστασης. Σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία του 2009 υπάρχουν 5.630 αγελαδοτροφικές εκμεταλλεύσεις οι οποίες παρέδωσαν 716.000 τόνους γάλακτος περίπου. Τόσο ο αριθμός των μονάδων όσο και η ποσότητα του παραγόμενου γάλακτος παρουσιάζουν πτωτικές τάσεις.

Στην Ελλάδα η φυλή Χολστάιν έχει εισάχθηκε τη δεκαετία των '50, σε μικρούς αριθμούς επειδή εκείνη την εποχή βάρος ήταν στραμμένο σε φυλές μικτών αποδόσεων με γαλακτοπαραγωγική και κρεοπαραγωγική κατεύθυνση. Η διάδοση των αγελάδων Χολστάιν πραγματοποιήθηκε με γρήγορο ρυθμό, όταν στο τέλος της δεκαετίας του '70 και στις αρχές της δεκαετίας του '80, έγινε εγκατάσταση αγελαδοτροφικών μονάδων κοντά στα μεγάλα αστικά κέντρα με σκοπό την κάλυψη των απαιτήσεων του πληθυσμού σε γάλα. Τότε φανερώθηκε και η υπεροχή της αγελάδας Χολστάιν απέναντι στις άλλες φυλές ως προς τη γαλακτοπαραγωγή της.

Η γονιμοποίηση των αγελάδων πραγματοποιείται με τη χρήση σπέρματος που προέρχεται από ταύρους των οποίων οι απόγονοι έχουν ελεγχθεί και εισάγεται από πολλές κτηνοτροφικά προηγμένες χώρες του κόσμου. Τα παράγωγα γεννιούνται και μεγαλώνουν στη χώρα μας, επειδή όμως η διάρκεια παραγωγικής ζωής των αγελάδων είναι σύντομη, γίνονται συνεχώς εισαγωγές και έτσι δεν έγινε δυνατό ως τώρα να δημιουργηθεί ένας εγχώριος τύπος της φυλής.

1.1.1 Βοοτροφία στην Ελλάδα

Η κτηνοτροφία αποτελεί μία από τις παλαιότερες δραστηριότητες του ανθρώπου, στην προσπάθειά του να εξασφαλίζει την απαραίτητη ποσότητα τροφής. Ο κλάδος της κτηνοτροφίας ο οποίος ασχολείται με την εκτροφή κυρίως των βοοειδών και βουβαλιών για την παραγωγή γάλακτος, κρέατος και δέρματος ονομάζεται βοοτροφία. Τα διατηρούμενα στον κόσμο βοοειδή (αγελάδες, ταύροι, δαμάλες, μόσχοι, μοσχίδες), διαφοροποιούνται, σύμφωνα με τις παραγωγικές τους ιδιότητες, σε κατεύθυνση γαλακτοπαραγωγική, κρεοπαραγωγική ή μικτή(για κρέας και γάλα).

Στην Ελλάδα εκτρέφονται περίπου 730.000 βοοειδή, εκ των οποίων τα 200.000 περίπου είναι γαλακτοπαραγωγής, τα 430.000 είναι κρεοπαραγωγής και υπόλοιπα 100.000 είναι μικτής παραγωγής. Από αυτά παράγονται περίπου 700.000 τόνοι αγελαδινού γάλακτος και 65.000 τόνοι βόειου-μοσχαρίσιου κρέατος. Η πλειονότητα του ζωικού κεφαλαίου αποτελείται από εγχώριες βελτιωμένες αγελάδες σε ποσοστό 64% του συνόλου των αμελγόμενων αγελάδων, το 27% του συνόλου είναι γενετικά βελτιωμένες, προέλευσης από άλλες ευρωπαϊκές χώρες και σε μόλις 9% του συνόλου είναι εγχώριες αβελτίωτες.

Όσον αφορά στον κλάδο της γαλακτοπαραγωγού αγελαδοτροφίας, κύριο χαρακτηριστικό του είναι η ταχεία αύξηση του μεγέθους των μονάδων και η αντίστοιχη μείωση του αριθμού των παραγωγών. Ο αριθμός των αγελαδοτρόφων το 1989 ανερχόταν περίπου στις 55.000, το 1999 μειώθηκε στις 12.000 περίπου ενώ το 2011 δεν υπερβαίνει τους 5.000 παραγωγούς. Αν και ο βόειος πληθυσμός παρουσίασε σημαντική πτώση για πολλά χρόνια, η παραγωγή αγελαδινού γάλακτος αυξήθηκε σημαντικά γεγονός που οφείλεται στην αύξηση της μέσης απόδοσης γάλακτος των αγελάδων. Παρόλα αυτά η μέση απόδοση γάλακτος ανά αγελάδα στη χώρα μας εξακολουθεί να παραμένει σχετικά χαμηλή σε σχέση με το μέσο όρο της Ε.Ε.



Εικόνα 2: Αγελάδες Χολστάιν σε κτηνοτροφική μονάδα

1.2 Θερμικό στρες

Ως θερμικό στρες μπορεί να οριστεί η κατάσταση που παρατηρείται όταν ένα ζώο αδυνατεί να διοχετεύσει ικανοποιητικά την περίσσεια ενδογενούς ή εξωγενούς θερμότητας για να διατηρήσει την θερμική ισορροπία του σώματος. Αυτό πιθανόν να ωθεί σε φυσιολογικές και συμπεριφορικές αλλαγές οι οποίες οδηγούν σε φυσιολογικές διαταραχές που επηρεάζουν αρνητικά την παραγωγική και αναπαραγωγική απόδοση των εκτρεφόμενων ζώων. (Bernabucci et al, 2014)

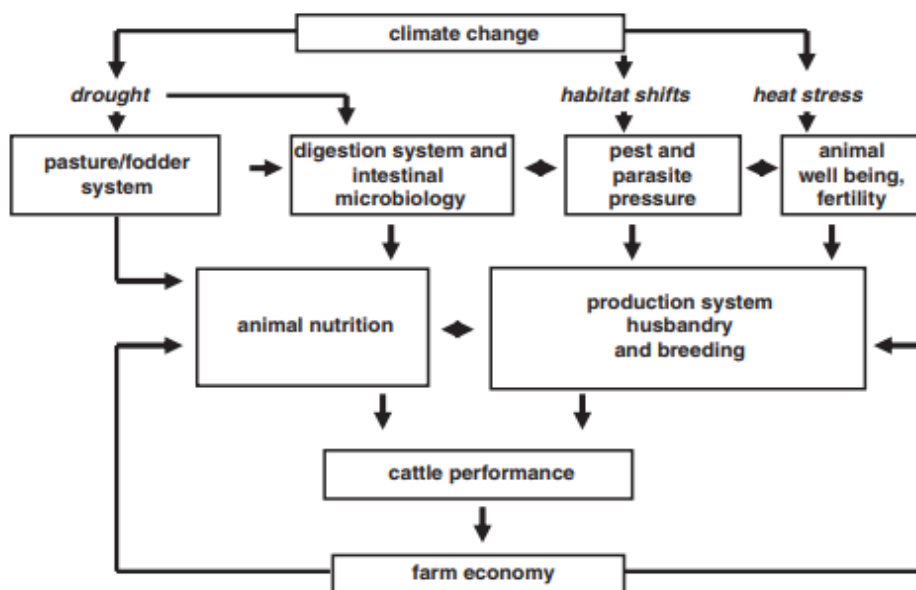
Το θερμικό στρες σε θερμά περιβάλλοντα είναι ένας από τους κύριους παράγοντες που επηρεάζει αρνητικά την παραγωγή γάλακτος, την αναπαραγωγή και την υγεία των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής.(Bernabucci et al, 2014) Επίσης, μειώνει τα ποσοστά σύλληψης και αυξάνει τη συχνότητα εμφάνισης προβλημάτων υγείας και τα ποσοστά θνησιμότητας των γαλακτοπαραγωγικών αγελάδων. (Nguyen et al,2017)

1.2.1 Κλιματική αλλαγή και θερμικό στρες

Η αύξηση των μέσων θερμοκρασιών στον αέρα και στους ωκεανούς παγκοσμίως, το εκτεταμένο λιώσιμο του χιονιού και του πάγου, καθώς και η άνοδος της μέσης στάθμης της θάλασσας όλου του πλανήτη δείχνουν ότι η υπερθέρμανση του πλανήτη είναι αναμφισβήτητα αναπόφευκτη. Συνεπώς, θα πρέπει να διερευνηθούν οι μελλοντικές επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής στα συστή-

ματα ζωικής παραγωγής όπου η αλλαγή του κλίματος ενδέχεται να μεταβάλει τα κύρια χαρακτηριστικά αυτών των συστημάτων. Εκτός από τα συστήματα παραγωγής σε εσωτερικούς χώρους, η παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων δεν επηρεάζεται μόνο έμμεσα από το περιβάλλον αλλά και άμεσα λόγω της χρήσης των βοσκοτόπων και των ανοιχτών συστημάτων εκτροφής ζώων. Οι κύριες άμεσες συνέπειες της αλλαγής του κλίματος που έχει δυσμενείς επιπτώσεις στη φυσιολογία των ζώων, την ευημερία, την υγεία και την αναπαραγωγή είναι η αυξανόμενη θερμοκρασία και τα ακραία καιρικά φαινόμενα. (Gauly et al,2013)

Η συχνότητα και η διάρκεια των συνθηκών θερμικής καταπόνησης στις γαλακτοκομικές περιοχές αυξάνεται. Για παράδειγμα, η ανάλυση των κλιματολογικών δεδομένων από τις εύκρατες περιοχές γαλακτοπαραγωγής όπως η νότια Αυστραλία δείχνει ότι ο συνολικός αριθμός ημερών θερμικής καταπόνησης αυξήθηκε για την περίοδο από το 1960 έως το 2008 (Garner et al,2016) και ο αριθμός των ημερών που προκαλούν θερμικό στρες, δηλαδή οι ημέρες με τιμή δείκτη θερμοκρασίας-υγρασίας (ΤΗΙ) υψηλότερη από 68, αυξήθηκε κατά 4,1% από το 1973 έως το 2008 σε ορισμένα τμήματα της ζώνης της Κεντρικής Ευρώπης. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι υπάρχουν ήδη 80 έως 86 ζεστές μέρες σε αυτήν την περιοχή.(Gauly et al,2013) Επίσης, ο μέσος αριθμός διαδοχικών ημερών των συνθηκών θερμικής καταπόνησης στις περιοχές που εκτρέφονται βοοειδή έχει αυξηθεί και αναμένεται να αυξηθεί περαιτέρω στο μέλλον. Οι διαδοχικές ημέρες των συνθηκών θερμικής καταπόνησης έχουν το μεγαλύτερο αντίκτυπο διότι οι αγελάδες περνούν το μεγαλύτερο μέρος του χρόνου τους εκτεθειμένο στην ηλιακή ακτινοβολία ενώ βόσκουν και έτσι μειώνεται η ευκαιρία για τα βοοειδή να διαχέουν τη θερμότητα του σώματος τη νύχτα. Ως αποτέλεσμα, η πίεση που δέχονται λόγω της αυξημένης θερμοκρασίας του σώματος συσσωρεύεται καθημερινά κατά τη διάρκεια του θερμικού στρες, οδηγώντας σε σημαντική πτώση της παραγωγής και οδηγώντας σε αρνητικά αποτελέσματα για την υγεία και την καλή διαβίωση των ζώων (Garner et al, 2016).



Εικόνα 3:Σχηματική αναπαράσταση των επιδράσεων της κλιματικής αλλαγής σε περιβαλλοντικούς και κτηνοτροφικούς παράγοντες σχετικά με την απόδοση των βοοειδών (Gauly et al,2013).

1.2.2 Δείκτης θερμοκρασίας-υγρασίας

Το θερμικό στρες επηρεάζεται από τη θερμοκρασία του αέρα, την υγρασία, την κίνηση του αέρα, την ηλιακή ακτινοβολία και τις βροχοπτώσεις. Ωστόσο, υπάρχει ο δείκτης θερμοκρασίας-υγρασίας (THI) ο οποίος είναι μια ενιαία τιμή που απεικονίζει τις ολοκληρωμένες επιδράσεις της θερμοκρασίας και της υγρασίας του αέρα που σχετίζονται με το επίπεδο θερμικής της καταπόνησης. Το THI ενσωματώνει τις επιδράσεις τόσο της θερμοκρασίας όσο και της σχετικής υγρασίας και χρησιμοποιείται συνήθως για τον ποσοτικό προσδιορισμό του βαθμού θερμικής καταπόνησης στα γαλακτοπαραγωγά βοοειδή. Εφαρμόζεται ευρέως σε θερμές περιοχές σε όλο τον κόσμο συνήθως ως πρακτικός δείκτης για το βαθμό πίεσης στα γαλακτοπαραγωγά βοοειδή που προκαλείται από τις καιρικές συνθήκες. Αποτελεί τον καλύτερο δείκτη προγνωστικών της θερμοκρασίας του σώματος σε θερμαινόμενες αγελάδες σε σχέση με άλλες μετρήσεις των περιβαλλοντικών συνθηκών. Όταν παίρνει τιμές 70 ή λιγότερο αυτές θεωρούνται άνετες για τις αγελάδες, 75-78 προκαλούν στρες και τιμές μεγαλύτερες από το 78 προκαλούν εξαιρετική δυσφορία και τα ζώα δεν είναι σε θέση να διατηρούν τους θερμορυθμιστικούς μηχανισμούς ή την κανονική τους θερμοκρασία (Habeeb et al, 2018).

Temp	Relative Humidity (%)																
	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70		75	80	85	90	95	100
77 25.0						72	72	73	73	74	74	75	75	76	76	77	MILD
78 25.6					72	73	73	74	74	75	75	76	76	77	77	77	STRESS
79 26.1				72	76	73	74	74	75	76	76	77	77	78	78	79	
80 26.7		72	72	73	76	74	74	75	76	76	77	78	78	79	79	80	
81 27.2		72	72	73	73	74	75	75	76	77	77	78	78	79	80	81	
82 27.8		72	73	73	74	75	75	76	77	77	78	79	79	80	81	81	
83 28.3		73	73	74	74	75	76	77	78	78	79	80	80	81	82	82	SEVERE
84 28.9		73	74	75	75	76	77	78	78	79	80	80	81	82	83	83	STRESS
85 29.4		74	75	75	76	77	78	79	79	80	81	81	82	83	84	84	
86 30.0		74	75	76	77	78	78	79	80	81	81	82	83	84	84	85	
87 30.6		75	76	77	77	78	79	80	81	81	82	83	86	85	85	86	
88 31.1		75	76	77	78	79	80	81	81	82	83	84	85	86	86	87	
89 31.7		76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	86	87	88	89	
90 32.2		77	78	79	79	80	81	82	83	84	85	86	86	87	88	89	
91 32.8		77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	86	87	88	89	90	
92 33.3		78	79	80	81	82	83	84	85	85	86	87	88	89	90	91	
93 33.9		79	80	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	VERY
94 34.4		79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	SEVERE
95 35.0		80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	STRESS
96 35.6		80	81	82	83	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	
97 36.1		81	82	83	84	85	86	87	88	89	91	92	93	94	95	96	
98 36.7		82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	93	94	95	96	97	
99 37.2		82	83	84	85	87	88	89	90	91	92	93	94	96	97	98	
100 37.8		83	84	85	86	87	88	90	91	92	93	94	95	97	98	99	
101 38.3		83	86	86	87	88	89	90	92	93	96	95	96	97	99	100	
102 38.9		86	85	86	87	89	90	91	92	96	95	96	97	96	99	101	
103 39.4		86	86	87	88	89	91	92	94	95	96	97	98	100	101	102	
104 40.0		85	86	88	88	90	91	93	94	95	96	97	99	100	101	103	
105 40.6		86	87	88	89	91	92	93	96	96	97	98	99	100	101	104	DEAD
106 41.1		86	88	89	90	91	93	94	95	97	98	99	101	102	103	105	CATTLE
107 41.7		87	88	89	91	92	94	95	96	98	99	101	102	103	105	106	
108 42.2		87	89	90	92	93	94	96	97	98	100	101	102	104	105	106	
109 42.8		88	89	91	92	94	95	96	98	99	101	102	103	105	106	107	
110 43.3		88	90	91	92	94	96	97	98	100	101	102	104	105	106	108	
111 43.9		89	91	93	94	95	96	98	99	101	102	103	105	106	107	109	

Εικόνα 4 : Διάγραμμα του δείκτη θερμοκρασίας-υγρασίας για τις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής (Habeeb et al,2018)

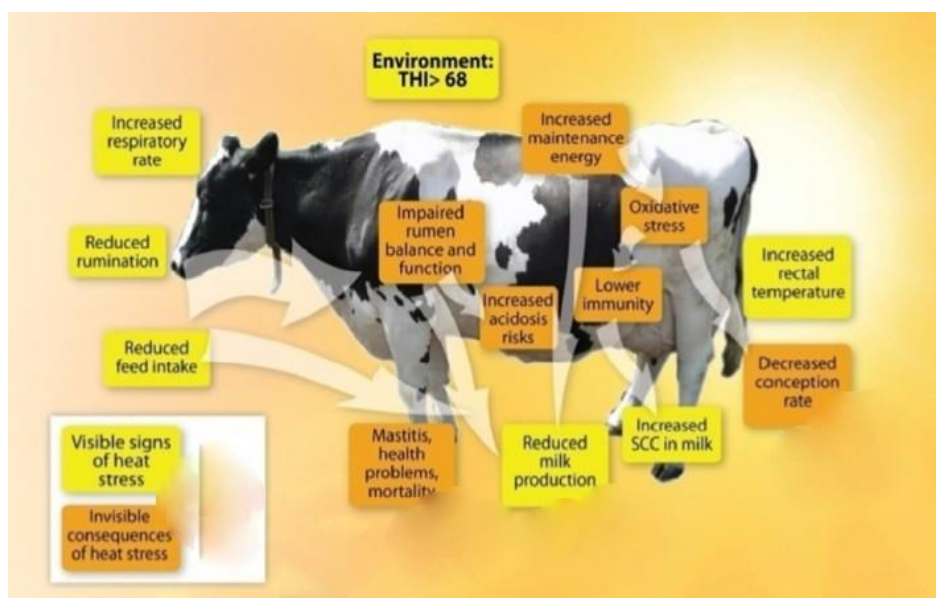
1.2.3 Μηχανισμός αντιμετώπισης της θερμικής καταπόνησης στις αγελάδες

Το ίδιο το σώμα των ζώων προστατεύει τον εαυτό του διασκορπίζοντας την υπερβολική θερμότητα στο περιβάλλον μέσω ομοιοστατικών μηχανισμών που περιλαμβάνουν αγγειοδιαστολή και εφίδρωση. Όταν η θερμοκρασία του σώματος ξεπεράσει τους 37 βαθμούς Κελσίου, αρχίζει η αγγειοδιαστολή καθώς η καρδιά αυξάνει τη ροή αίματος προς τα μικροσκοπικά αγγεία στα ανώτερα στρώματα του δέρματος και συνεπώς η περίσσεια θερμότητας μεταφέρεται στο εξωτερικό περιβάλλον που είναι ψυχρότερο. Εάν η αύξηση της κυκλοφορίας του αίματος στο δέρμα δεν μπορεί να δροσίσει επαρκώς το σώμα ή εάν ο περιβάλλοντας αέρας είναι θερμότερος από τον το δέρμα, τότε ο εγκέφαλος στέλνει σήμα στους ιδρωτοποιούς αδένες για να απελευθερωθεί ο ιδρώτας από το δέρμα. Ο ιδρώτας στη συνέχεια εξατμίζεται, μεταφέροντας επιπλέον θερμότητα από το σώμα καθώς υφίσταται τη μετάβαση φάσης από το υγρό προς το αέριο. Η υψηλή υγρασία του περιβάλλοντος μειώνει την ταχύτητα της εξάτμισης του ιδρώτα και κατά συνέπεια την ικανότητα του σώματος να διαχέει τη θερμότητα μέσω αυτού του μηχανισμού. Η σοβαρότητα του ζητήματος του θερμικού στρες στις αγελάδες θα συνεχίζει να αυξάνεται καθώς η υπερθέρμανση του πλανήτη εξελίσσεται. (Habeb et al,2018)

1.2.4 Συνέπειες του θερμικού στρες

Οι αυξήσεις της θερμοκρασίας και της υγρασίας του περιβάλλοντος που προβλέπεται να συμβούν στο άμεσο μέλλον θα έχουν σημαντικές αρνητικές επιπτώσεις στην παραγωγικότητα και την ευημερία των μηρυκαστικών όπως για παράδειγμα μείωση της παραγωγής γάλακτος, αυξημένο ρυθμό αναπνοής και εφίδρωσης και αλλαγές στην συμπεριφορά τους. Στα βοοειδή γαλακτοπαραγωγής, η θερμοκρασία και η υγρασία (που συχνά συνδυάζονται ως δείκτης υγρασίας, THI) που υπερβαίνουν τα όρια των ειδών οδηγούν σε σημαντική πτώση της πρόσληψης τροφής, της παραγωγής γάλακτος και της γονιμότητας, οι οποίες συνδέονται με φυσιολογικές αλλαγές όπως η αυξημένη θερμοκρασία του σώματος, η εφίδρωση και οι αλλαγές που παρατηρούνται στο ενδοκρινικό σύστημα που είναι σημαντικά για την υγεία και την παραγωγικότητα. Τα υψηλής παραγωγής γαλακτοπαραγωγά βοοειδή είναι τα πλέον ευαίσθητα οικόσιτα ζώα παραγωγής με τα επιβλαβή αποτελέσματα του θερμικού στρες. Η θερμοευαίσθητη ζώνη των βοοειδών γαλακτοπαραγωγής (για τις φυλές του είδους *Bos taurus*) είναι μεταξύ 0,5 ° C και 20 ° C. Η ανώτερη κρίσιμη θερμοκρασία περιβάλλοντος για τα υψηλής γαλακτοπαραγωγής βοοειδή *Bos taurus* στα οποία η θερμοκρασία του σώματος αρχίζει να αυξάνεται είναι περίπου 25 °, αν και αυτό ποικίλει ανάλογα με την κατάσταση της παραγωγής (γαλακτοπαραγωγή έναντι μη γαλακτοπαραγωγής), το βαθμό εγκλιματισμού, την κατάσταση εγκυμοσύνης, τη διατροφή και τις κλιματικές μεταβλητές συμπεριλαμβανομένης της ηλιακής ακτινοβολίας, της ταχύτητας του ανέμου και της σχετικής υγρασίας. (Garner et al,2016). Η χαμηλή απόδοση γάλακτος σε πολύ θερμό κλίμα οφείλεται στην μειωμένη όρεξη και χαμηλή πρόσληψη ξηράς τροφής. Ως εκ τούτου, τα βοοειδή χρησιμοποιούν την ενέργειά τους για την ανάπτυξή τους αντί για την παραγωγή γάλακτος (Kino et al, 2018).

Το θερμικό στρες μειώνει επίσης τη φυσική ανοσία, καθιστώντας τα ζώα περισσότερο ευάλωτα στις ασθένειες τις επόμενες ημέρες και εβδομάδες. Μειώνει την πρόσληψη τροφής (η οποία είναι μια φυσική απάντηση στη μείωση της μεταβολικής θερμότητας) και αυξάνει το ρυθμό αναπνοής. Ταυτόχρονα προκαλεί αύξηση της θερμοκρασίας του σώματος και όταν η θερμοκρασία του σώματος είναι σημαντικά αυξημένη, παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα του μεταβολισμού και μειωμένο σωματικό βάρος και απόδοση γάλακτος έτσι ώστε να μετριαστεί η ανισορροπία θερμότητας με αποτέλεσμα όσο μεγαλύτερο είναι το εύρος της επίδρασης του θερμικού στρες τόσο μεγαλύτερη να είναι και η πτώση της παραγωγής γάλακτος στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής. Γενικά, στα βοοειδή που επηρεάζονται από το θερμικό στρες οι αρνητικές επιδράσεις που παρουσιάζουν κατά τη διάρκεια του φαινομένου αυτού οδηγούν στην μείωση της αποτελεσματικότητας της παραγωγής γάλακτος. Ως εκ τούτου, τα βοοειδή που επηρεάζονται από το θερμικό στρες προσπαθούν να μειώσουν τη θερμότητα του σώματος μέσω των θερμορυθμιστικών μηχανισμών οι οποίοι με τη σειρά τους επηρεάζουν την απόδοση μετατροπής της τροφής με συνέπεια η ενέργεια της τροφής να χρησιμοποιείται για λειτουργίες του ζώου που βοηθούν στην επιβίωσή του και όχι για την παραγωγή γάλακτος. Το θερμικό στρες μπορεί, επίσης, να προκαλέσει προβλήματα αναπαραγωγής, όπως μειωμένη ποιότητα σπέρματος και νεογέννητα με χαμηλότερο βάρος από το φυσιολογικό, και να θέσει σε κίνδυνο το ανοσοποιητικό σύστημα. Η γονιμότητα στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής είναι σαφώς καθορισμένη ως η ικανότητα του ζώου να συλλάβει και να διατηρεί την εγκυμοσύνη εάν γονιμοποιηθεί από το σπέρματοζωάριο την κατάλληλη στιγμή σε σχέση με την ωορρηξία. Η κακή ανίχνευση οιστρογόνων και οι απώλειες εμβρύων ή εμβρύου συγκαταλέγονται μεταξύ των κύριων αιτιών κακής αναπαραγωγικής απόδοσης που οφείλονται στο θερμικό στρες (Habeeb et al, 2018).



Εικόνα 5 :Συνέπειες του θερμικού στρες στις αγελάδες

1.2.5 Ανάγκη για επιλογή των θερμοανθεκτικών αγελάδων(Habeeb et al,2018)

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, τα γαλακτοπαραγωγά βοοειδή είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στη μείωση της παραγωγής γάλακτος λόγω του θερμικού στρες. Η ταυτοποίηση βοοειδών γαλακτοπαραγωγής πιο ανεκτικών στις συνθήκες θερμικού στρες αποτελεί σημαντική πρόοδο προς την κατεύθυνση της αναπαραγωγής βοοειδών με καλύτερη προσαρμογή σε μελλοντικά κλίματα. Το ζευγάρωμα για τη δημιουργία ανθεκτικών στη θερμότητα αγελάδων μπορεί να επιταχυνθεί με τη γονιδιωματική επιλογή, χρησιμοποιώντας γενετικούς δείκτες που προβλέπουν την ανοχή στο θερμικό στρες (Garner et al 2016).

Η μετρίαση του θερμικού στρες μπορεί να είναι πολύπλευρη και περιλαμβάνει:

- τη φυσική προστασία
- τη διατροφική διαχείριση
- τη γενετική βελτίωση

Είναι ευρέως αναγνωρισμένο ότι η γενετική διαφοροποίηση συνδέεται με την απόδοση των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής κάτω από συνθήκες θερμικού στρες, κάνοντας την επιλογή για αυτό το χαρακτηριστικό πιθανή. Έτσι, διαπιστώνεται η ευνοϊκή συσχέτιση μεταξύ ανοχής στο θερμικό στρες και γονιμότητας, γεγονός που υποδηλώνει ότι η βελτίωση της ανοχής θα συμβάλει με τη σειρά στη βελτίωση της γονιμότητας (Nguyen et al, 2017).

Το εύρος της μείωσης της παραγωγής γάλακτος λόγω του αυξανόμενου θερμικού στρες ποικίλλει μεταξύ των ζώων με αποτέλεσμα κάποια βοοειδή να εμφανίζουν αυξημένη μείωση και κάποια αλλά λιγότερη. Αυτή η ιδιότητα αποτελεί ένα χαμηλό έως μέτρια κληρονομήσιμο χαρακτηριστικό. Αυτό το χαρακτηριστικό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως χαρακτηριστικό δείκτη για τη θερμική ανοχή. Η ανοχή της θερμότητας είναι ένα πολύπλοκο γνώρισμα και η μείωση της παραγωγής γάλακτος είναι μόνο ένας πιθανός ενδεικτικός φαινότυπος για αυτό το χαρακτηριστικό (Nguyen et al, 2016)

1.3 Θερμοαντοχή

Ένα ανθεκτικό στη θερμότητα ζώο είναι ένα ζώο που συνεχίζει να διατηρεί την ομοιοθερμία του υπό την άσκηση πίεσης από υψηλού επιπέδου περιβαλλοντικά θερμικά φορτία. Ωστόσο, από την άποψη της κτηνοτροφίας, ορίζεται ως η διατήρηση των παραγωγικών και αναπαραγωγικών επιπέδων του κάτω από υψηλές θερμοκρασίες. Η διατήρηση της ομοιοθερμίας υπό τις θερμές συνθήκες εξαρτάται από την ικανότητα του ζώου να εξισορροπεί τη θερμογένεση και τη διάχυση της θερμότητας. Έχουν προταθεί διάφορες μετρήσεις ως κριτήρια για τον εντοπισμό των ανθεκτικών στη θερμότητα ζώων. Αυτές περιλαμβάνουν τη θερμοκρασία του σώματος, την αναπνοή, τον καρδιακό ρυθμό και το ρυθμό εφίδρωσης. Η απόδοση των ζώων υπό θερμική καταπόνηση είναι ένας τρόπος μέτρησης της συνολικής ικανότητας του ζώου να αντιμετωπίσει τη θερμότητα. Τα χαρακτηριστικά του τριχώματος και της γούνας, συμπεριλαμβανομένου του ρυθμού αποβολής του τριχώματος και της αναλογίας επιφάνειας σώματος προς μάζα, σχετίζονται με την ικανότητα του ζώου να διαχέει την εσωτερική θερμότητα και έχουν επίσης προταθεί ως χαρακτηριστικά ανθεκτικά στη θερμότητα. Τέλος, διάφοροι βιοδείκτες όπως οι παράμετροι του αίματος ή τα διάφορα μόρια που σχετίζονται

με την αντίδραση θερμικού στρες έχουν επίσης προταθεί ως δείκτες θερμικού στρες στα ζώα (Carabano et al,2019)

Η αυξανόμενη ανησυχία σχετικά με την αντοχή στο θερμικό στρες για τα γαλακτοφόρα ζώα σε εύκρατες περιοχές είναι συνέπεια τόσο της κλιματικής αλλαγής όσο και της υψηλότερης παραγωγής μεταβολικής θερμότητας από ζώα υψηλής απόδοσης, Ενώ η ανοχή στο θερμικό στρες είναι μια αρκετά απλή έννοια, η συστηματική της μέτρηση παραμένει προβληματική. Από την άλλη πλευρά, η ποσοτικοποίηση αυτού του χαρακτηριστικού είναι θεμελιώδους σημασίας για να θεωρηθεί ένας δυνητικός στόχος επιλογής στα προγράμματα αναπαραγωγής. Ορισμένα φυσιολογικά χαρακτηριστικά σχετίζονται με την ικανότητα του ζώου να αντιμετωπίσει το θερμικό στρες. Για παράδειγμα, η θερμοκρασία του ορθού και ο ρυθμός αναπνοής αυξάνονται όταν τα ζώα εκτίθενται σε ζεστό περιβάλλον. (Macciotta et al,2017)

Τα γαλακτοπαραγωγά βοοειδή που είναι ανθεκτικά στη θερμότητα έχουν μικρότερη πτώση στην παραγωγή γάλακτος και μειωμένες αυξήσεις της θερμοκρασίας του σώματος, κατά τη διάρκεια ενός συμβάντος προσομοιωμένου θερμικού κύματος σε σύγκριση με τις αγελάδες που προβλέπεται να είναι ευαίσθητες στη θερμότητα. Έτσι, η γονιδιωματική επιλογή για θερμική ανοχή θα μπορούσε να αυξήσει την ανθεκτικότητα και την ευημερία των αγελάων γαλακτοπαραγωγής παγκοσμίως και την παραγωγικότητα της γαλακτοπαραγωγής σε ένα μέλλον με αυξημένη συχνότητα και διάρκεια συμβάντων θερμικού στρες(Garner et al 2016)

1.3.1 Θερμοαντοχή και θερμικό στρες κατά τη διάρκεια καθυστερημένης κύησης

Το θερμικό στρες σε θηλυκή αγελάδα κατά τη διάρκεια της καθυστερημένης κύησης επηρεάζει τη δραστηριότητα των μοσχарιών κατά τη διάρκεια της μεταγεννητικής ζωής τους. Η εμβρυϊκή ανάπτυξη ενώ το έμβρυο βρίσκεται σε μητέρα που εκτίθεται σε θερμικό στρες κατά τη διάρκεια καθυστερημένης κυοφορίας έχει ως αποτέλεσμα το μοσχάρι να παρουσιάζει αυξημένη θερμική ανοχή κατά την ενηλικίωση. Οι αγελάδες που προέρχονταν από μητέρες που εκτέθηκαν σε θερμική καταπόνηση είχαν μειωμένες αυξήσεις στην ορθική θερμοκρασία, στο ρυθμό εφίδρωσης και αυξημένη θερμοκρασία δέρματος όταν βίωναν καταστάσεις οξείας θερμικής καταπόνησης ως ενήλικες. Οι αγελάδες στη μήτρα που εκτέθηκαν σε θερμικό στρες είχαν μεγαλύτερη θερμοκρασία του δέρματος που μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι οι θερμοανθεκτικές αγελάδες αύξησαν την αιμάτωση του δέρματος και συνεπώς είχαν μεγαλύτερη ψύξη μέσω αγωγιμότητας. Στη μήτρα, οι θερμοανθεκτικές αγελάδες φαίνεται να διαχέουν τη θερμότητα πιο αποτελεσματικά επειδή γεννιούνται από αγελάδες που υπέστησαν θερμικό στρες. Ως εκ τούτου θα έχουν υψηλότερη απώλεια θερμότητας και μειωμένη θερμοκρασία του σώματος, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη χαμηλότερη ορθική θερμοκρασία και το χαμηλότερο ποσοστό εφίδρωσης όταν εκτίθεται σε θερμικό στρες. Επομένως η θερμική καταπόνηση στη μήτρα κατά την καθυστερημένη κύηση αυξάνει τη θερμοαντοχή στις ενηλικιωμένες αγελάδες μέσω της αύξησης της ικανότητας διάχυσης της θερμότητας για τη διατήρηση της θερμοκρασίας του σώματος.(Ahmed et al, 2017)

Γίνεται όλο και πιο προφανές ότι ο φαινότυπος μετά τη γέννηση επηρεάζεται από το προγεννητικό περιβάλλον. Αυτό είναι σίγουρα αλήθεια όσον αφορά το μητρικό θερμικό στρες κατά τη διάρκεια της καθυστερημένης κύησης στα γαλακτοπαραγωγά βοοειδή. Η πίεση που ασκείται από το θερμό σώμα της μητέρας στις αγελάδες που κυοφορούνται επιδρά και στους δύο οργανισμούς, μειώνοντας την επακόλουθη παραγωγή γάλακτος της μητέρας και αποδυναμώνοντας την υγεία και την απόδοση των μοσχαριών μετά τη γέννηση. (Ahmed et al, 2017)

Η ικανότητα ρύθμισης της θερμοκρασίας του σώματος είναι ένας σημαντικός καθοριστικός παράγοντας για το αν η γονιμότητα και η παραγωγή μειώνονται κατά τη διάρκεια του θερμικού στρες. Πράγματι, το μέγεθος της αύξησης της θερμοκρασίας του ορθού που προκαλείται από θερμική καταπόνηση είναι ανάλογο του μεγέθους των επιδράσεων θερμικού στρες στην απόδοση γάλακτος. Έτσι, οι χαμηλότερες θερμοκρασίες του ορθού που εμφανίζονται από τις θερμοανθεκτικές αγελάδες μπορεί να είναι σημαντικές για την παραγωγή και τις αποκρίσεις στην γονιμότητα κατά τη θερμική καταπόνηση. (Ahmed et al, 2017)

Η γενική ομολογία για τα σύνθετα χαρακτηριστικά, όπως η γονιμότητα, η παραγωγή γάλακτος, η ποιότητα του κρέατος και η αντοχή στις ασθένειες είναι ότι αποτελούν προϊόντα των αλληλεπιδράσεων των γονιδίων με το περιβάλλον.

1.4. Μιτοχόνδριο

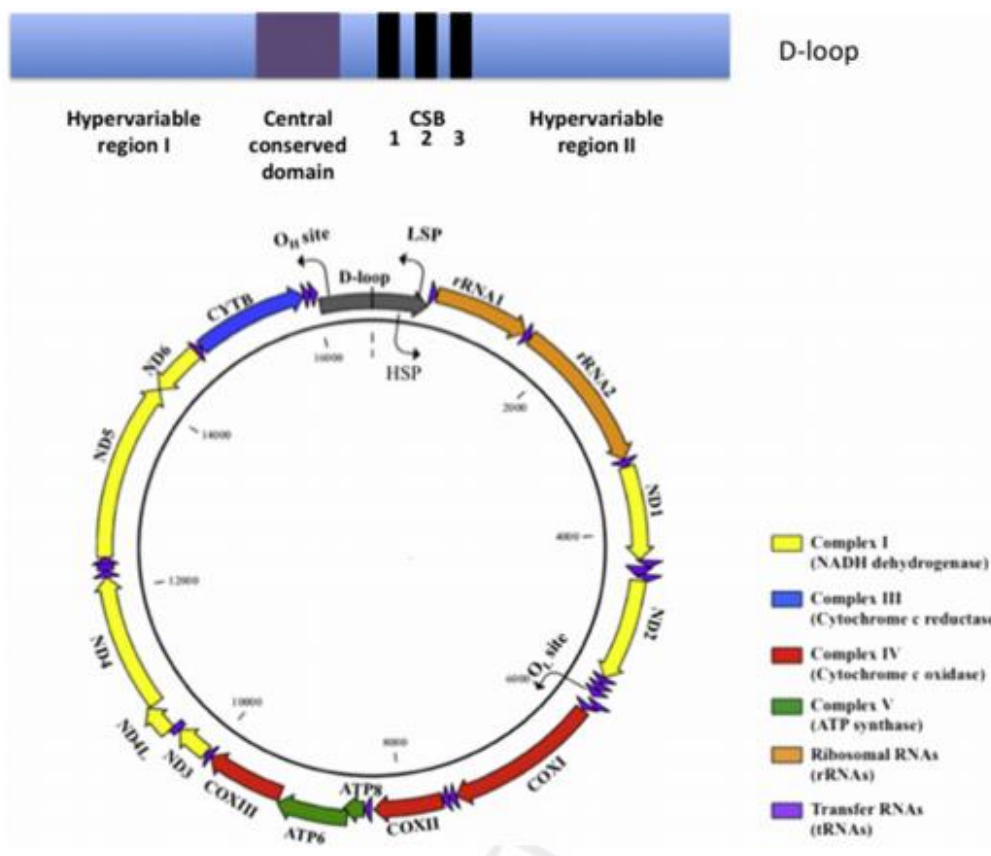
1.4.1 Παραγωγή θερμότητας στο μιτοχόνδριο

Στα ενδοδερμικά είδη, η θερμότητα που απελευθερώνεται ως προϊόν μεταβολισμού εξασφαλίζει τη σταθερή εσωτερική θερμοκρασία σε όλο τον οργανισμό, παρά τις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν τους σημαντικούς παράγοντες αυτής της διαδικασίας. Μέρος της ενέργειας που απελευθερώνεται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση οδηγεί στη σύνθεση του ATP ενώ το υπόλοιπο της ενέργειας αυτή απελευθερώνεται ως θερμότητα. Σε μια σταθερή εξωτερική θερμοκρασία 38°C, τα μιτοχόνδρια έχουν θερμοκρασία τουλάχιστον 10°C υψηλότερη όταν η αναπνευστική αλυσίδα είναι πλήρως λειτουργική. Αυτή η αυξημένη θερμοκρασία παύει να παρατηρείται στα μιτοχόνδρια όταν αυτά αδρανοποιούνται. Με δεδομένο ότι παρατηρείται κάποια αντίσταση στη μεταφορά θερμότητας στις βιοενεργειακές μεμβράνες που είναι πλούσιες σε πρωτεΐνες, τα μιτοχόνδρια πρέπει να λειτουργούν σε υψηλότερη θερμοκρασία από τη θερμοκρασία στα θηλαστικά και στα πτηνά. (Chretien D et al, 2018)

1.4.2 Γονιδίωμα μιτοχονδρίου

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των θηλαστικών είναι ένα κλειστό, κυκλικό, δίκλωνο DNA. Αυτό το γονιδίωμα μοριακού βάρους περίπου 16.6-kb περιέχει την κωδική αλληλουχία για 13 πολυπεπτίδια, 2 ριβοσωμικά RNAs και 22 RNA μεταφοράς, τα οποία είναι απαραίτητα για τη συναρμολόγηση της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Οι 13 από τις περίπου 100 πρωτεϊνικές υπομονάδες της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων που κωδικοποιούνται από το mtDNA είναι: οι 7 υπομονάδες

της αφυδρογονάσης του NADH (σύμπλεγμα 1), μια υπομονάδα της αναγωγάσης του κυτοχρώματος c (σύμπλεγμα III), 3 υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (σύμπλεγμα IV) και 2 υπομονάδες της ATP συνθάσης (σύμπλεγμα V). Οι υπόλοιπες υπομονάδες κωδικοποιούνται από το χρωμοσωμικό γονιδίωμα. Ο βρόχος μετατόπισης περίπου 1000 bp (D-loop), γνωστός και ως περιοχή ελέγχου, είναι η μόνη κύρια μη κωδικοποιητική αλληλουχία σε αυτό το συμπαγές γονιδίωμα. Η συνεναιτική ακολουθία D-loop περιέχει ένα κεντρικό συντηρημένο πεδίο και 3 συντηρημένα τμήματα αλληλουχιών (CSB). Αυτές οι συντηρημένες περιοχές πλαισιώνονται από 2 υπερμεταβλητές περιοχές. (Tsai et al, 2016)



Εικόνα 6 :Απεικόνιση του μιτοχondριακού γονιδιώματος και της D-Loop περιοχής(Tsai et al,2016)

1.4.3 Ρόλος μιτοχondρίου

Ο μιτοχondριακός μεταβολισμός συνδέεται άμεσα με το περιβάλλον ενός ατόμου, καθώς τα μιτοχόνδρια μετατρέπουν τους υδατάνθρακες και τα λίπη μέσω της πρόσληψης τροφής σε κυτταρικό ATP για την κάλυψη των ενεργειακών απαιτήσεων των κυττάρων και των ιστών, οι οποίοι άμεσα σχετίζονται με τον φαινότυπο ενός ζώου. Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην σηματοδότηση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), στην παραγωγή θερμότητας, στην

σηματοδότηση του ασβεστίου, στην απόπτωση, στη σύνθεση των στεροειδών ορμονών, στην σύνθεση των αιμοπεταλίων και στην οξειδωση των λιπαρών οξέων. Συνεπώς, η μιτοχονδριακή γενετική και η φυσιολογία παίζει κεντρικό ρόλο στην υγεία των ζώων, στις ασθένειες και στην αναπαραγωγή. (Tsai et al, 2016)

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα χρησιμοποιείται συχνά για τη μοριακή αναγνώριση των ειδών. Ωστόσο, η χρησιμότητά του για μελέτες της φυσικής γενετικής του πληθυσμού παραμένει αμφιλεγόμενη καθώς εξελίσσεται ταχέως με μη ουδέτερο τρόπο. Παρόλα αυτά, είναι γενικά αποδεκτό ότι έχει συνεξελιχθεί με το χρωμοσωμικό γονιδίωμα και παρουσιάζει υψηλή ενδο-ειδική μεταβλητότητα-ποικιλομορφία. Η συντριπτική πλειοψηφία της κυτταρικής ενέργειας παράγεται μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, η οποία λαμβάνει χώρα στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων κωδικοποιείται από 2 γονιδιώματα, το χρωμοσωματικό και το μιτοχονδριακό γονιδίωμα (mtDNA). Το μιτοχονδριακό DNA συνδέεται με έναν αριθμό χαρακτηριστικών που περιλαμβάνουν την ανοχή στη θερμότητα, την ανάπτυξη και τη σωματική απόδοση, την ποιότητα του κρέατος και του γάλακτος και τη γονιμότητα. Τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα μπορούν να συγκεντρωθούν σε ομάδες γνωστές ως mtDNA απλοτύπους. Οι απλοτύποι μιτοχονδριακού DNA είναι μια πιθανή γενετική πηγή για το χειρισμό των φαινοτύπων των εκτρεφόμενων ζώων. Η χρήση τεχνολογιών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, όπως είναι η μεταφορά πυρήνων, επιτρέπει την ανάμιξη ευνοϊκών χρωμοσωμικών γενετικών χαρακτηριστικών και την αντιστοίχισή τους με τα επιζητούμενα χαρακτηριστικά απλότυπου mtDNA (Tsai et al, 2016).

Επιπλέον, υπάρχουν όλο και περισσότερες ενδείξεις ότι το μιτοχονδριακό γονιδίωμα παίζει ρόλο στον προσδιορισμό του φαινοτύπου και θα μπορούσε επομένως να είναι χρήσιμο για τη γενετική επιλογή με σκοπό την ενίσχυση των αναπαραγωγικών αξιών. (Tsai et al, 2016) Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) θεωρείται επίσης ένα καλό εργαλείο για τη γενετική ποικιλομορφία και τις εξελικτικές μελέτες λόγω της ουδετερότητας, της μητρικής κληρονομικότητας και της φύσης του ποσοστού υποκατάστασών του που μοιάζει με ρολόι. Η ρυθμιστική περιοχή (D-Loop) έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας ιδιαίτερα χρήσιμος γενετικός δείκτης επειδή εξελίσσεται πολύ γρηγορότερα από ότι η κωδική περιοχή του mtDNA (Sharma et al, 2015).

1.4.4 Απλότυποι μιτοχονδριακού DNA

Οι απλότυποι του μιτοχονδριακού DNA αντιπροσωπεύουν ομάδες μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών που έχουν διατηρηθεί στο γονιδίωμα, κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Αν και το mtDNA εξελίσσεται ραγδαία, ο ρυθμός με τον οποίο συμβαίνει αυτό δεν είναι πανομοιότυπος σε όλο το γονιδίωμα. Για παράδειγμα, η D-Loop περιοχή έχει υψηλότερο ρυθμό μετάλλαξης από ότι οι κωδικές περιοχές του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Επιπλέον, τα μιτοχονδριακά tRNA μεταλλάσσονται 25 φορές ταχύτερα από ότι τα πυρηνικά tRNA στα θηλαστικά. Αυτοί οι πολυμορφισμοί είναι δυνατόν να σταθεροποιηθούν σε έναν πληθυσμό και να γίνουν ουδέτεροι, επιβλαβείς ή επωφελείς. Διάφοροι απλότυποι συνδέονται με τη μακροζωία, με διαφορές στην κινητικότητα σπέρματος και με τη προδιάθεση σε σχετιζόμενες με την ηλικία διαταραχές όπως είναι ο διαβήτης και ο καρκίνος. Παρόλα αυτά, η συν-εξέλιξη για τη διασφάλιση της συμβατότητας μεταξύ του μιτοχονδριακού και

πυρηνικού γονιδιώματος αποτελεί το κλειδί για τη φυσική κατάσταση ενός οργανισμού. Σε κυτταρικό επίπεδο, έχει αποδειχθεί ότι οι απλότυποι mtDNA επηρεάζουν τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης στην διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, τα οποία θα μπορούσαν τελικά να καθορίσουν τον φαινότυπο του κυττάρου. Η επιλογή των οικονομικά σημαντικών χαρακτηριστικών στην κτηνοτροφία παραδοσιακά επιτυγχάνεται μέσω της διασταύρωσης με βάση την εκτιμώμενη αναπαραγωγική αξία. Οι επιθυμητοί φαινότυποι κατατάσσονται και εκφράζονται ως EBVs τόσο για το αρσενικό όσο και για το θηλυκό, και αυτό χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη του φαινότυπου των απογόνων τους. Τα σύνθετα χαρακτηριστικά καθορίζονται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίου-περιβάλλοντος. Επειδή οι απλότυποι mtDNA έχουν δείχθει ότι επηρεάζουν τα σύνθετα χαρακτηριστικά σε ανθρώπινα και άλλα ζωικά μοντέλα, είναι πιθανό ότι αυτοί απλότυποι mtDNA θα μπορούσαν να συμβάλουν σε χαρακτηριστικά που παραδοσιακά θεωρούνται ότι έχουν χαμηλή κληρονομικότητα στα εκτρεφόμενα ζώα. Στα γαλακτοπαραγωγά βοοειδή, η περιοχή D-loop έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με την ποιότητα και την παραγωγική απόδοση του γάλακτος. Ωστόσο, σημειώθηκε επίσης ότι υπήρξε αρνητικός συσχετισμός μεταξύ της απόδοσης γάλακτος και της αναπαραγωγής.. Επιπλέον, οι πολυμορφισμοί στην D-loop επηρέασαν σημαντικά τον μέσο όρο του ποσοστού των τοκετών που υπήρξαν σε μια χρονική περίοδο 4 ετών στα βοοειδή. (Tsai et al,2016) Κάθε απλότυπος mtDNA έχει διαμορφωθεί μέσα σε δισεκατομμύρια χρόνια και μπορεί να προσδώσει φαινοτυπικές μεταβολές μεταξύ των ατόμων.

Οι απλοτύποι του μιτοχονδριακού DNA έχουν συνεξελιχθεί με το χρωμοσωμικό γονιδίωμα και μπορούν εύλογα να χρησιμοποιηθούν ως γενετικοί δείκτες για την επιλογή εκτεφόμενων ζώων με επιθυμητά χαρακτηριστικά. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι οι απλότυποι του mtDNA μπορούν να αξιοποιηθούν στη μεταφορά πυρήνων που προέρχονται από σωματικά κύτταρα για να αυξηθεί ο αριθμός των γενετικά ανώτερων ζώων. Για παράδειγμα, το χρωμοσωμικό γονιδίωμα του *Bos taurus* με υψηλή ποιότητα κρέατος ή απόδοση γάλακτος μπορεί να εισαχθεί σε ωκύτταρα της μεταφάσης II με mtDNA απλότυπο του *Bos indicus* που σχετίζονται με αντοχή στη θερμότητα, για την παραγωγή απόγονων και με τα δύο επιθυμητά χαρακτηριστικά. Τα αποτελέσματα τέτοιου είδους πειραμάτων μπορούν επίσης να αποτελέσουν τη βάση για περαιτέρω κατανόηση των επιδράσεων που έχουν οι απλοτύποι mtDNA σε πιο σύνθετα χαρακτηριστικά.(Tsai et al,2016)

1.5 Σχέση φυλογένεσης και μιτοχονδριακού γονιδιώματος

Φυλογενετικές ή πληθυσμιακές γενετικές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην εύρεση γενετικών παραλλαγών στο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA), επειδή οι μεταλλάξεις στην περιοχή αυτή περιέχονται 5 φορές περισσότερο σε σχέση με άλλα γενετικά υλικά. Σύμφωνα με τις γενετικές δομές και τα πρότυπα διαχωρισμού του mtDNA ακολουθώντας τα συστήματα κληρονόμησης, η ανάλυση του mtDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό της προέλευσης των φυλών καθώς και για την αναγνώριση μεμονωμένων ζώων. Γενικά, η αναζήτηση γενετικών πολυμορφισμών στο mtDNA επικεντρώθηκε στην περιοχή D-loop η οποία χρησιμοποιήθηκε κυρίως για την ανάλυση των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των φυλών λόγω του τεράστιου αριθμού μεταλλάξεων που παρατηρούνται σε αυτή. Τα γονίδια στο mtDNA είναι επίσης διαθέσιμα για να χαρακτηρίζουν τις φυλές και τα άτομα

σε φυλογενετικές μελέτες, αλλά υπάρχουν λίγες αναφορές για SNPs από τις κωδικές περιοχές επειδή πιστεύεται ότι τα SNPs στις περιοχές αυτές μπορεί να μην είναι διαθέσιμα για να εξηγήσουν τη γενετική ποικιλότητα με χαμηλές συχνότητες γενετικών παραλλαγών. Ωστόσο, απαιτείται ακόμα η χρήση όλων των αλληλουχιών mtDNA για την εκτίμηση των γενετικών σχέσεων μεταξύ των φυλών, για τον χαρακτηρισμό της εξειδίκευσης των φυλών και για τον εντοπισμό των ατόμων. Επιπλέον, η ανάλυση του μιτοχονδριακού DNA μπορεί να καθορίσει τις γενετικές σχέσεις εντός των φυλών για να υποθέσει το βαθμό ομοιότητας μεταξύ των μεμονωμένων ζώων της ίδιου είδους. Γενικά, η περιοχή D-Loop περιέχει πολλές θέσεις μετάλλαξης μιας και αποτελεί το σημαντικό σημείο για την ανάλυση των γενετικών αποστάσεων και των διαφορών μεταξύ των φυλών των βοοειδών και των ατόμων, όπως επιβεβαιώνεται και από πειραματικά αποτελέσματα που φαίνονται στην εικόνα 4, καθώς ο μεγαλύτερος αριθμός μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών ανιχνεύεται στην περιοχή αυτή.(Chung 2013)

Gene ¹	Position	No. of SNP					Average	Share ⁷
		KNC ²	ANG ³	JBC ⁴	HOL ⁵	OTH ⁶		
D-loop	1 - 364, 15792 - 16338	26	25	10	27	22	22	15
ND1	3101 - 4057	5	2	1	2	4	2.8	1
ND2	4266 - 5309	2	3	0	2	2	1.8	0
COX1	5687 - 7231	4	3	2	8	7	4.8	2
COX2	7374 - 8057	5	3	1	2	2	2.6	0
ATP8	8129 - 8329	2	0	0	1	1	0.8	0
ATP6	8290 - 8970	3	4	0	4	3	2.8	1
COX3	8970 - 9750	3	1	0	3	5	2.4	1
ND3	9823 - 10179	0	1	0	1	1	0.6	0
ND4L	10239 - 10535	2	1	1	2	0	1.2	0
ND5	12109 - 13929	8	9	3	9	8	7.4	4
ND6	13913 - 14440	1	1	1	1	3	1.4	1
CYTB	14514 - 15653	4	3	1	6	6	4	3
Others		4	9	2	10	14	7.8	1
Sum		69	65	22	78	78	62.4	29

Εικόνα 7: Ο αριθμός των SNPs σε κάθε περιοχή του βοδινού μιτοχονδριακού DNA σύμφωνα με πειραματικά αποτελέσματα(Chung et al 2013)

Το μιτοχονδριακό DNA είναι πολύ πολυμορφικό και αυτό οφείλεται στο υψηλό ποσοστό μεταλλάξης του, το οποίο εμφανίζεται με ρυθμό περίπου 10 φορές ταχύτερα σε σύγκριση με το αντίστοιχο του χρωμοσωμικού DNA, και αυτό το κάνει ένα ιδανικό εργαλείο για τις φυλογενετικές μελέτες.

Γενικά, το mtDNA χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο ως γενετικός δείκτης για την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό συγκεκριμένων ατόμων καθώς και φυλών επειδή είναι πιο ευάλωτο σε περισσότερες μεταλλάξεις από ότι το πυρηνικό DNA. Ένας από τους λόγους είναι ότι το mtDNA στερείται προστατευτικών ιστονών και διαθέτει μερικούς λιγότερο αποτελεσματικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης, ενώ παράλληλα εμφανίζει υψηλό ποσοστό λαθών που έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μεγάλου αριθμού μεταλλάξεων. Ως εκ τούτου, η εύρεση γενετικών δεικτών έχει επικεντρωθεί στο mtDNA, με την αυξανόμενη χρησιμοποίηση των περιοχών με τις περισσότερες πολυμορφικές θέσεις για τη διεξαγωγή μελετών πληθυσμού και την ταυτοποίηση ατόμων καθώς και φυλών. Μετά την ανάπτυξη της τεχνολογίας αλληλούχησης, τα SNPs είναι οι σημαντικότεροι δείκτες για τον εντοπισμό ατομικών διαφορών στις μελέτες γονιδιώματος. Αρκετές μελέτες επικεντρώθηκαν στους πολυμορφισμούς στην περιοχή D-loop για την ανάλυση φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ φυλών των βοοειδών λόγω του υψηλού αριθμού σε πολυμορφικές θέσεις που διαθέτει και επειδή έχει διαπιστωθεί υψηλή γενετική διακύμανση στην περιοχή αυτή. Επιπλέον, δεν έχουν αναφερθεί πολλές προσπάθειες για τη φυλογενετική ανάλυση χρησιμοποιώντας όλες τις αλληλουχίες mtDNA επειδή θεωρήθηκε ότι εκτός από την περιοχή D-Loop δεν υπάρχουν επαρκείς πολυμορφισμοί στις κωδικές περιοχές του mtDNA οι οποίοι πιθανόν να μην λειτουργούν αποτελεσματικά στη γενετική ταυτοποίηση. Ωστόσο, εκτός από την περιοχή D-loop, υπάρχουν ακόμα πολλά SNPs σε γονίδια του mtDNA σε σύγκριση με γονίδια των γονιδιωματικών περιοχών. Επομένως, μπορεί να είναι μια χρήσιμη στρατηγική για να εκτιμηθεί η γενετική ποικιλομορφία χρησιμοποιώντας SNPs σε ολόκληρο το μιτοχονδριακό DNA. Προκύπτει ότι η χρήση όλων των αλληλουχιών mtDNA για την εκτίμηση γενετικών αποστάσεων και σχέσεων μπορεί να αποτελέσει την καλύτερη δυνατή επιλογή. Επιπλέον, μελέτες που έγιναν στον ανθρώπινο οργανισμό ανέφεραν ότι εστιάζοντας μόνο στην περιοχή D-Loop που είναι η μοναδική μη κωδικοποιητική και η ταχέως εξελισσόμενη περιοχή ελέγχου μπορεί να είναι ανεπαρκής. (Chung 2013).

1.6 Πολυμορφισμός

Ένας γενετικός τύπος ενδέχεται να υφίσταται σε δύο ή περισσότερες εναλλακτικές μορφές (αλληλόμορφα) οι οποίες διαφέρουν ως προς την νουκλεοτιδική τους αλληλουχία. Σε αυτή την περίπτωση, οι διάφορες παραλλαγές της αλληλουχίας που συναντώνται σε έναν πληθυσμό ονομάζονται πολυμορφισμοί. Οι διαφορές αυτές συχνά οφείλονται στο γεγονός ότι φέρουν διαφορετικό αριθμό αντιγράφων κάποιας διαδοχικά επαναλαμβανόμενης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μικρού μήκους. Οι πολυμορφικοί γενετικοί τύποι είναι δείκτες DNA οι οποίοι, όπως και τα αλληλόμορφα των γονιδίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε φυλογενετικές αναλύσεις, περάματα χαρτογράφησης.

σης και σε άλλες εφαρμογές. Φαινότυποι των πολυμορφικών γενετικών τόπων θεωρούνται οι εναλλακτικές αλληλουχίες τους οι οποίες προσδιορίζονται με μοριακές τεχνικές. Παραδείγματα πολυμορφισμών του DNA είναι οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNP).

Ένας μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός είναι μια αλλαγή σε ένα ζεύγος βάσεων-μια σημειακή μεταλλαγή-σε μια θέση (ένα γενετικό τόπο) του γονιδιώματος. Πρόκειται για τον πιο συνηθισμένο τύπο πολυμορφισμού DNA. Νέοι SNP δημιουργούνται λόγω αυθόρμητων μεταλλαγών, οι οποίες συνήθως οφείλονται σε σφάλματα κατά την αντιγραφή. Στη συντριπτική τους πλειοψηφία οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί συναντώνται σε η κωδικές περιοχές του γονιδιώματος ,οπότε ονομάζονται μη κωδικοί SNP . Οι SNP που βρίσκονται σε κωδικές περιοχές ονομάζονται κωδικοί SNP.Η γονιδιακή λειτουργία επηρεάζεται από τους κωδικούς SNP αναλόγως από την αμινοξική αλλαγή που προκαλεί στην πρωτεΐνη αλλά και από τους μη κωδικούς SNP, όταν αυτοί συναντώνται σε υποκινητές ή άλλες ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων. (Russel et al, 2006)

1.7 Σκοπός του πειράματος

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο γενετικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Σκοπός της είναι η εύρεση πολυμορφισμών στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και πιο συγκεκριμένα στην περιοχή D-Loop που σχετίζονται με θερμοαντοχή σε εκτρεφόμενες αγελάδες Holstein.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.Υλικά και μέθοδοι

2.1. Υλικά

<i>Αγαρόζη</i>
<i>Ακρυλαμιδη</i>
<i>Βοροϋδρίδιο του Νατρίου</i>
<i>Νιτρικός άργυρος</i>
<i>Οξικό οξύ</i>
<i>Υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH)</i>
<i>Φορμαλδεύδη</i>
<i>Agarose buffer</i>
<i>Aps</i>
<i>Bis-acrylamide</i>
<i>EDTA</i>

<i>EtOH</i>
<i>NaCl</i>
<i>Ladder 100bp</i>
<i>TEMED</i>

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Δείγματα

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργαστηριακή μελέτη είναι συνολικά 107 και είναι αίματα τα οποία συλλέχθηκαν κατά την χρονική περίοδο μεταξύ του Αυγούστου και του Σεπτεμβρίου του 2018 από διάφορες κτηνοτροφικές μονάδες της περιφέρειας της Θεσσαλίας από αγελάδες Holstein στις οποίες πραγματοποιήθηκε τεχνητή σπερματέγχυση. Από τα 107 δείγματα τα 27 από αυτά γονιμοποιήθηκαν οπότε θεωρούνται θερμοάντοχα ενώ τα υπόλοιπα 80 που δεν γονιμοποιήθηκαν είναι θερμοευαίσθητα.

2.2.2 Απομόνωση DNA

Αφού συγκεντρώθηκαν τα δείγματα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στην συγκεκριμένη μελέτη, το πρώτο βήμα που απαιτείται για την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας είναι η απομόνωση του γενετικού υλικού που προέρχονται από τα δείγματα αίματος των αγελάδων. Για την πραγματοποίηση της απομόνωσης έγινε χρήση του PureLink™ Genomic DNA Mini kit της εταιρίας Invitrogen ακολουθώντας τις οδηγίες του πρωτοκόλλου.

2.2.3. Προσδιορισμός ποσότητας DNA

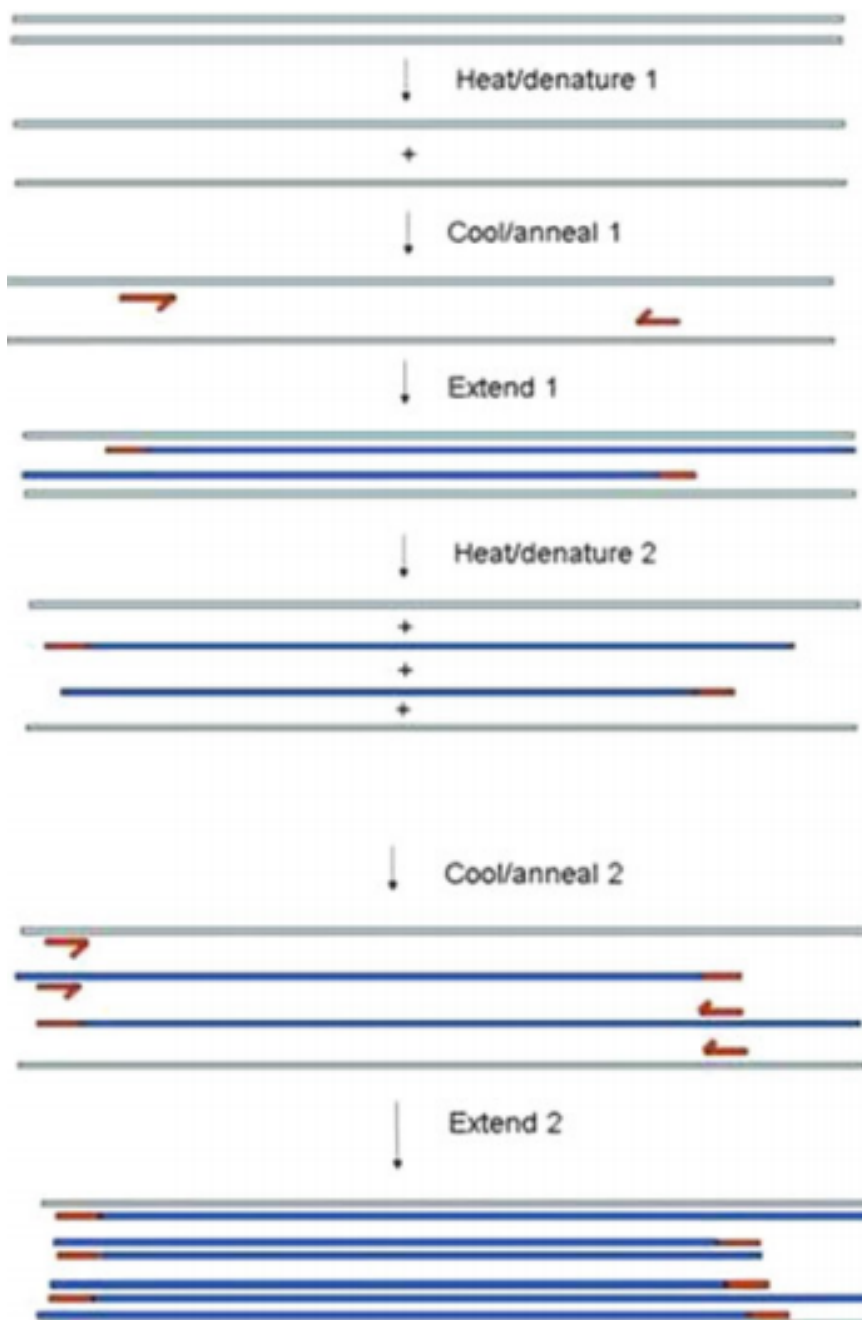
Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης του DNA είναι σημαντικό να ελεγχθεί η επιτυχία της ποιοτικά και ποσοτικά μέσω φωτομέτρησης των δειγμάτων ή μέσω ηλεκτροφόρησης τους σε πήκτη αγαρόζης 1% w/v. Όσον αφορά την φωτομέτρηση, θα πρέπει να έχει γίνει αρχικά μια αραιώση 2μl διαλύματος του απομονωμένου DNA σε 98μl ddH₂O. Για την εκτίμηση της καθαρότητας ενός διαλύματος νουκλεϊκών οξέων είναι απαραίτητο να μετρηθεί η απορρόφηση του στα 260 nm και στα 280 nm και ακολούθως να υπολογιστεί ο λόγος των δύο απορροφήσεων A_{260nm}/A_{280nm}. Στην περίπτωση που ο λόγος αυτός έχει τιμή 1,8, τότε το διάλυμα DNA χαρακτηρίζεται ως υψηλής καθαρότητας.

2.2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - PCR

Στα μέσα της δεκαετίας του 1980 αναπτύχθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης(PCR), η οποία έφερε μια νέα επανάσταση στον τομέα της γονιδιακής ανάλυσης. Η αλυσιδωτή αντίδραση

πολυμεράσης(PCR) είναι μια τεχνική η οποία επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό in vitro επιλεγμένων αλληλουχιών DNA, από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος. Τα βήματα της PCR είναι τα ακόλουθα:

1. Αποδιάταξη με θέρμανση του δίκλωνου μορίου DNA που φέρει την αλληλουχία-στόχου
2. Πρόσδεση των εκκινήτων στο αποδιαταγμένο DNA . Οι δύο εκκινήτες είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε στην κατάλληλη θερμοκρασία ο καθένας να προσδένεται με υψηλή ειδικότητα σε μία από τις δύο αλυσίδες του DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα.
3. Επιμήκυνση των εκκινήτων από μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση όπως η DNA πολυμεράση Taq. Το ένζυμο αυτό απομονώνεται από ένα θερμοφίλο βακτήριο, το *Thermus aquaticus*.



Εικόνα 8: Σχηματικό διάγραμμα της PCR (Waters DL et al 2014)

Για την ενίσχυση των τμημάτων του μιτοχονδριακού γονιδίου D-Loop που μελετάται στη συγκεκριμένη εργασία που αποτελεί το επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας και επιτυγχάνεται μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι απαραίτητη η χρήση του ζεύγους εκκινητών το οποίο φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1. Εκκινητές D-Loop για την αντίδραση της PCR

D-Loop Forward	5'-CACCATCAACCCCAAAGCT-3'
D-Loop Reverse	5'-CCTGAAGAAAGAACCAGATG-3'

Οι αλληλουχίες των εκκινητών της περιοχής D-Loop του μιτοχονδριακού γονιδιώματος σχεδιάστηκαν σύμφωνα με την αλληλουχία της περιοχής (NCBI database, DQ124418 Holstein) για την ενίσχυση ενός τμήματος 537 bp (Srirattana et al 2017).

Στη συνέχεια ακολουθεί η προετοιμασία του PCR mix. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων του διαλύματος της PCR αντίδρασης υπολογίζονται σύμφωνα με τον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 2. Η σύσταση του διαλύματος για την αντίδραση της PCR

	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα/PCR tube
Ρυθμιστικό διάλυμα Buffer Kappa Taq	10x	1x	5 μ l
Διάλυμα ιόντων Mg	50mM	2mM	1 μ l
Taq πολυμεράση Kappa Taq	5 U/ μ l	1 U	0,2 μ l
dNTPs	10 mM	0,2 mM	1 μ l
Forward εκκινητής	50 μ M/ μ l	1 μ M	1 μ l
Reverse εκκινητής	50 μ M/ μ l	1 μ M	1 μ l
DNA	100 ng		
ddH ₂ O	Έως 50 μ l		

Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιήθηκε η αντίδραση της PCR με σκοπό την ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων είναι οι ακόλουθες:

- Αρχική αποδιάταξη του DNA με θέρμανση στους 95°C για 5 min
- Αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 40 sec
- Υβριδοποίηση των εκκινητών D-Loop στους 57°C για 40 sec
- Επιμήκυνση του DNA από την Taq πολυμεράση στους 72°C για 40 sec

Οι κύκλοι ενίσχυσης σε κάθε αντίδραση είναι 35.

- Τελική επιμήκυνση του DNA για 10 min
- Συντήρηση των δειγμάτων στους 4°C

2.2.5 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι ο πλέον αποτελεσματικός τρόπος διαχωρισμού θραυσμάτων DNA ποικίλων μεγεθών που κυμαίνονται από 100 bp έως 25 kb. Κατά τη διάρκεια της ζελατινοποίησης, τα πολυμερή αγαρόζης συνδέονται μη-ομοιοπολικά και σχηματίζουν ένα δίκτυο πόρων. Για να διαχωριστεί το DNA χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης, το DNA φορτώνεται σε προσχηματισμένα πηγαδάκια στο πήκτωμα και εφαρμόζεται ένα ρεύμα. Καθώς το φωσφορικό μόριο του DNA (και του RNA) είναι αρνητικά φορτισμένο, όταν τοποθετείται σε ηλεκτρικό πεδίο, θραύσματα DNA θα μεταναστεύσουν στην θετικά φορτισμένη άνοδο. Επειδή το DNA έχει μία ομοιόμορφη αναλογία μάζας / φορτίου, τα μόρια DNA διαχωρίζονται κατά μέγεθος εντός ενός πηκτώματος αγαρόζης. Ο ρυθμός μετανάστευσης ενός μορίου DNA μέσω πηκτής προσδιορίζεται από τα ακόλουθα:

- 1) μέγεθος μορίου DNA,
- 2) συγκέντρωση αγαρόζης
- 3) διαμόρφωση DNA,
- 4) εφαρμοζόμενη τάση
- 5) τύπος αγαρόζης
- 6) ρυθμιστικό διαλύμα ηλεκτροφόρησης. (Lee et al, 2012)

Μετά την ολοκλήρωση της PCR αντίδρασης τα προϊόντα που προκύπτουν οδηγούνται για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v, έτσι ώστε να γίνει έλεγχος της επιτυχίας των αποτελεσμάτων της αντίδρασης. Για τη δημιουργία του πηκτώματος αγαρόζης χρησιμοποιούμε TAE 1X έπειτα από αραιώση σε TAE 50%(stock). Σε κωνική φιάλη διαλύουμε 0.9gr αγαρόζης σε 50 ml TAE 1X με σκοπό την τελική συγκέντρωση 2% w/v, η οποία σχετίζεται με το μέγεθος των τμημάτων DNA που πρόκειται να διαχωριστούν. Στη συνέχεια, θερμαίνουμε το διάλυμα έτσι ώστε η αγαρόζη να διαλυθεί και προσθέτουμε στο διάλυμα 4ml expert green με σκοπό την απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας. Έπειτα, αδειάζουμε το περιεχόμενο της κωνικής φιάλης σε ειδικά διαμορφωμένο καλούπι για να πολυμεριστεί το πήκτωμα. Στο καλούπι έχουμε τοποθετήσει ειδικά χτενάκια τα οποία αφαιρούνται όταν το πήκτωμα αγαρόζης ρυθμιστεί σε θερμοκρασία δωματίου μετά από 20 λεπτά για τον σχηματισμό των πηγαδιών πάνω σε αυτό.

Για την ηλεκτροφόρηση των ενισχυμένων τμημάτων DNA, προστίθενται 3ml loading buffer που αναμιγνύονται με 5ml δείγματος και τοποθετούνται στο εσωτερικό του πηγαδιού που έχει διαμορφωθεί πάνω στο πήκτωμα αγαρόζης. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων λαμβάνει χώρα σε συσκευή ηλεκτροφόρησης με ρυθμιζόμενη τάση στα 150 volts και διάρκεια περίπου 20 λεπτών. Μετά το πέρας των 20 λεπτών η πηκτή αφαιρείται από τη συσκευή και οδηγείται σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας για την παρατήρηση των αποτελεσμάτων.

2.2.6 Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP) : Single-strand conformation polymorphism

Η ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP) είναι μια απλή και ευαίσθητη τεχνική ανίχνευσης μεταλλάξεων και γονοτύπων. Η αρχή της ανάλυσης SSCP βασίζεται στο γεγονός ότι το μονοκλωνικό DNA έχει μια καθορισμένη διαμόρφωση. Η αλλοιωμένη διαμόρφωση του λόγω μίας μόνο αλλαγής βάσης στην αλληλουχία του μπορεί να προκαλέσει μετανάστευση ενός μονόκλωνου DNA σε διαφορετικές συνθήκες ηλεκτροφόρησης χωρίς διάκριση. Επομένως δείγματα άγριου τύπου και μεταλλαγμένου DNA εμφανίζουν διαφορετικά μοτίβα ζωνών. Η ανάλυση SSCP περιλαμβάνει τα ακόλουθα τέσσερα βήματα: (1) ενίσχυση μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) της αλληλουχίας DNA που μας ενδιαφέρει, (2) μετουσίωση προϊόντων διπλής έλικας PCR, (3) ψύξη του μετουσιωμένου DNA (μονόκλωνο) για μεγιστοποίηση της αυτό-ανόπτησης, (4) ανίχνευση της διαφοράς κινητικότητας των μονόκλωνων DNA με ηλεκτροφόρηση υπό συνθήκες μη μετουσίωσης σε πήκτωμα ακρυλαμίδης. (Dong Y et al, 2005)

Πρώτο βήμα αυτής της μεθόδου αποτελεί η παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης. Η σύσταση των συστατικών για μια πηκτή πολυακρυλαμίδης 10% (η πυκνότητα της οποίας επιλέχθηκε για τα την ανάλυση των δειγμάτων του συγκεκριμένου πειράματος) είναι η εξής :

· Ακρυλαμίδα	6,25gr
· Bis-acrylamide	0,16gr
· Glycerol 50%	6,25 ml
· TBE 10X	3,2 ml
· TEMED	62.5 ml
· APS 20%	375 ml
· ddH2O	προσθήκη έως 62,5 ml

Σε ποτήρι ζέσεως , αφού προηγουμένως έχουν υπολογιστεί οι ποσότητες τους στο ζυγό, τοποθετούνται όλα τα αντιδραστήρια εκτός των TEMED και APS, και μια μικρή ποσότητα από τον συνολικό όγκο του ddH2O που θα προστεθεί. Έπειτα το ποτήρι ζέσεως αναδεύεται (με τη βοήθεια ενός μαγνήτη που έχουμε προσθέσει στο ποτήρι)μέχρι να ομογενοποιηθεί το διάλυμα. Αφού ομογενοποιηθεί, το διάλυμα διηθείται σε έναν ογκομετρικό σωλήνα με τη χρήση διηθητικού χαρτιού και συμπληρώνουμε με ddH2O μέχρι τα 62,5 ml. Στη συνέχεια προσθέτουμε το TEMED και το APS 20% στο διάλυμα με σκοπό την επιτάχυνση του πολυμερισμού της ακρυλαμίδης και το τοποθετούμε σε ένα καλούπι που σχηματίζεται σε μια ειδική συσκευή στησίματος. Το καλούπι αυτό αποτελείται από δύο μικρά ειδικά τζάμια τα οποία με τη βοήθεια των spacers δημιουργούν ενδιάμεσα κενά στα οποία χύνεται το διάλυμα ακρυλαμίδης. Οι κάτω επιφάνειες αυτών των ειδικών τζαμιών θα πρέπει να ακουμπάνε κάθετα στην συσκευή στησίματος έτσι ώστε να μη δημιουργείται κενό από το οποίο θα υπάρχει διαρροή του διαλύματος που τοποθετείται. Όταν το διάλυμα γεμίσει το εσωτερικό του καλουπιού αυτού προστίθενται από πάνω ειδικά χτενάκια , πριν να ξεκινήσει ο πολυμερισμός της

ακρυλαμίδης, έτσι ώστε όταν πήξει το διάλυμα να σχηματιστούν τα πηγαδάκια. Η διάρκεια που απαιτείται για να πήξει το διάλυμα είναι περίπου 30 λεπτά.

Αφού το διάλυμα έχει πήξει, αφαιρούνται τα χτενάκια προσεκτικά για να σχηματιστούν τα πηγαδάκια και το καλούπι μεταφέρεται από την συσκευή στησίματος στην συσκευή κατακόρυφης ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθενται το ρυθμιστικό διάλυμα, 0,5x TBE buffer.

Πριν από την ηλεκτροφόρησή τους, τα δείγματα αποδιατάσσονται κάτω από ειδικές συνθήκες οι οποίες είναι :

- Αποδιάταξη στους 95 °C για 2'
- Αποδιάταξη στους 97°C για 2'
- Αποδιάταξη στους 99 °C για 9'

Έπειτα, τα δείγματα αφαιρούνται από τη συσκευή αποδιάταξης και τοποθετούνται σε πάγο έως ότου γίνει η μεταφορά τους στην πηκτή πολυακρυλαμίδης. Κάθε δείγμα περιέχει 10 μl προϊόντος PCR και 10 μl loading buffer.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 220 volts για περίπου 21 ώρες για την περίπτωση των D-Loop .

2.2.7. Χρώση πηκτής πολυακρυλαμίδης σε διάλυμα νιτρικού αργύρου

Αφού περάσουν οι 20 ώρες που απαιτούνται για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, ακολουθεί η χρώση της πηκτής σε διάλυμα νιτρικού αργύρου με σκοπό την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων πάνω σε αυτή. Για τη χρώση χρειάζεται η παρασκευή 3 διαφορετικών διαλυμάτων και η πλύση της πηκτής με καθένα από αυτά.

Η σύσταση των διαλυμάτων είναι η παρακάτω :

ΔΙΑΛΥΜΑ 1

400ml ddH₂O (2 x 200ml)

500μl οξικού οξέος

Για το διάλυμα 1, σε ένα ογκομετρικό σωλήνα ογκομετρούνται 400ml ddH₂O (2 x 200ml) και προστίθενται τα 500μl οξικού οξέος. Ακολουθεί ανάδευση

ΔΙΑΛΥΜΑ 2

200ml ddH₂O

0,3gr νιτρικού αργύρου (AgNO₃)

Για το διάλυμα 2. σε ένα δεύτερο ογκομετρικό ογκομετρούνται 200ml ddH₂O και προστίθενται 0,3gr νιτρικού αργύρου (AgNO₃). Στον ογκομετρικό σωλήνα εισάγουμε κι ένα μαγνήτη για την πλήρη διαλυτοποίηση του νιτρικού αργύρου στο διάλυμα.

ΔΙΑΛΥΜΑ 3

200ml ddH₂O

3gr υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH)

1ml φορμαλδεύδη

0,01gr βοροϋδρίδιο του Νατρίου (NaBH₄)

Για το διάλυμα 3, σε ένα ποτήρι ζέσεως ογκομετρούνται και προστίθενται 200ml ddH₂O , 3gr υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH), 1ml φορμαλδεύδη και 0,01gr βοροϋδρίδιο του Νατρίου (NaBH₄). Στο ποτήρι ζέσεως προσθέτουμε κι ένα μαγνήτη για την διαλυτοποίηση των αντιδραστηρίων.

Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης το καλούπι απομακρύνεται από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και στη συνέχεια αφαιρούνται τα ειδικά τζάμια που περιέχουν το πήκτωμα που έχει σχηματιστεί. Έπειτα, το πήκτωμα τοποθετείται προσεκτικά σε μια ζελατίνη και μαζί με αυτή σε ένα δοχείο. Η πλύση του πηκτώματος από τα διαλύματα που θα παρασκευασθούν θα πραγματοποιηθεί στο εσωτερικό του δοχείου.

Αρχικά, εισάγουμε 200 ml του διαλύματος 1 στο δοχείο που περιέχει την πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η ανάδευση διαρκεί 2 λεπτά και μετά το διάλυμα απομακρύνεται. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και για τα υπόλοιπα 200 ml του διαλύματος 1. Στη συνέχεια, προσθέτουμε το διάλυμα 2 που περιέχει το νιτρικό άργυρο στο δοχείο και αφήνουμε για 15 λεπτά την πηκτή να αναδυθεί με το διάλυμα. Ακολούθως, απομακρύνουμε το διάλυμα 2 από το δοχείο και έπονται δύο πλύσεις με ddH₂O όπου διαρκεί 2 λεπτά η καθεμιά. Τέλος, τοποθετούμε το διάλυμα 3 και το αφήνουμε να αναδυθεί με την πηκτή μέχρι να εμφανιστούν οι επιθυμητές ζωνώσεις. Το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την εμφάνιση τους υπολογίζεται στα 30 λεπτά. Συνήθως, μετά το πέρας 40 λεπτών οδηγούμαστε σε ένα πλατώ.

Αφού εμφανιστούν οι ζωνώσεις ακολουθεί μια τελευταία πλύση με ddH₂O και η πηκτή αποθηκεύεται στην ζελατίνη για την παρατήρηση των αποτελεσμάτων πάνω σε αυτή και τη σύγκριση των πρότυπων ζωνώσεων.

2.2.8 Αλληλούχηση των προϊόντων PCR

Μετά την πραγματοποίηση της χρώσης των πηκτών πολυακρυλαμίδης και την εμφάνιση των ζωνώσεων, πραγματοποιήθηκε η ερμηνεία των αποτελεσμάτων και η εύρεση των πιθανών προτύπων. Εν συνεχεία, τα προϊόντα PCR που αντιστοιχούν στα συγκεκριμένα πρότυπα υπόκεινται σε καθαρισμό και μετά στέλνονται για αλληλούχηση. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το kit Nucleospin Gel and PCR Clean-up της εταιρίας Macherey-nagel. Ο σκοπός του καθαρισμού είναι η απομάκρυνση των εκκινητών και των συστατικών της αντίδρασης PCR και των παραπροϊόντων της αντίδρασης. Έπειτα, τα δείγματα που έχουν καθαριστεί στέλνονται σε μια ορισμένη εταιρεία που αναλαμβάνει τη διαδικασία της αλληλούχησης.

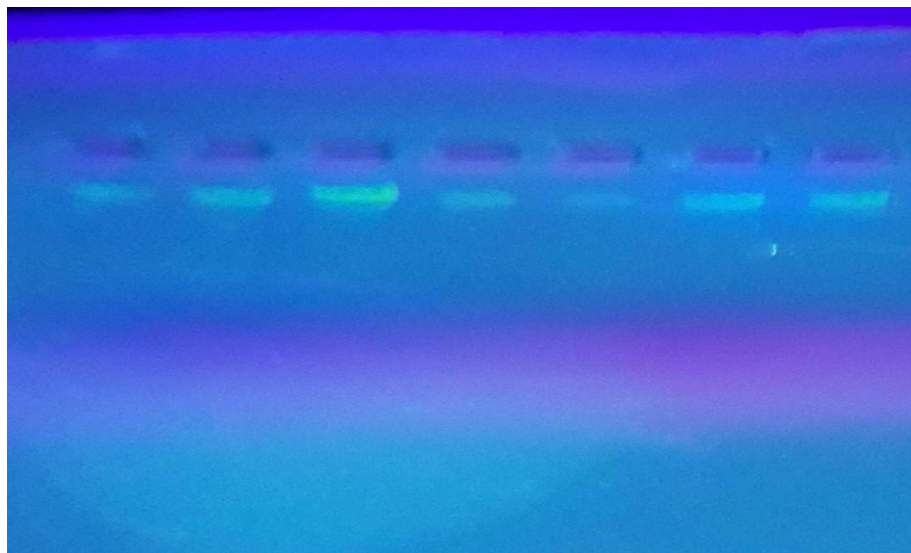
Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης που παραδίδονται από την εταιρία απαντώνται στη μορφή χρωματογραφήματος, τα οποία επεξεργάζονται με τη βοήθεια του πρόγραμματος βιοπληροφορικής BioEdit. Το χρωματογράφημα περιέχει 4 καμπύλες με διαφορετικό χρώμα η καθεμιά. Κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε ένα διαφορετικό νουκλεοτίδιο. Το μαύρο χρώμα της καμπύλης αντιστοιχεί στη γουανίνη (G), το πράσινο χρώμα στην αδενίνη (A), το κόκκινο στη θυμίνη (T) και το μπλε στην

κυτοσίνη (C). Στο χρωματογράφημα, οι καμπύλες με το διαφορετικό χρώμα εναλλάσσονται αποτυπώνοντας τις θέσεις των νουκλεοτιδίων στην αλληλουχία που μελετάται. Η αλληλούχηση πραγματοποιείται και για τις δύο αλυσίδες χρησιμοποιώντας το ζεύγος των εκκινήτων που σχεδιάστηκε για την αντίδραση της PCR. Στη συνέχεια, γίνεται ομοπαράθεση μεταξύ των δύο αλληλουχιών που προέκυψαν από τις δύο αλυσίδες μέσω του ClustalX με σκοπό τον εντοπισμό πιθανών λαθών κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Μόλις ολοκληρωθεί η ομοπαράθεση, λαμβάνουμε την πλήρη αλληλουχία του τμήματος του επιθυμητού γονιδίου.

3.Αποτελέσματα

3.1Απομόνωση

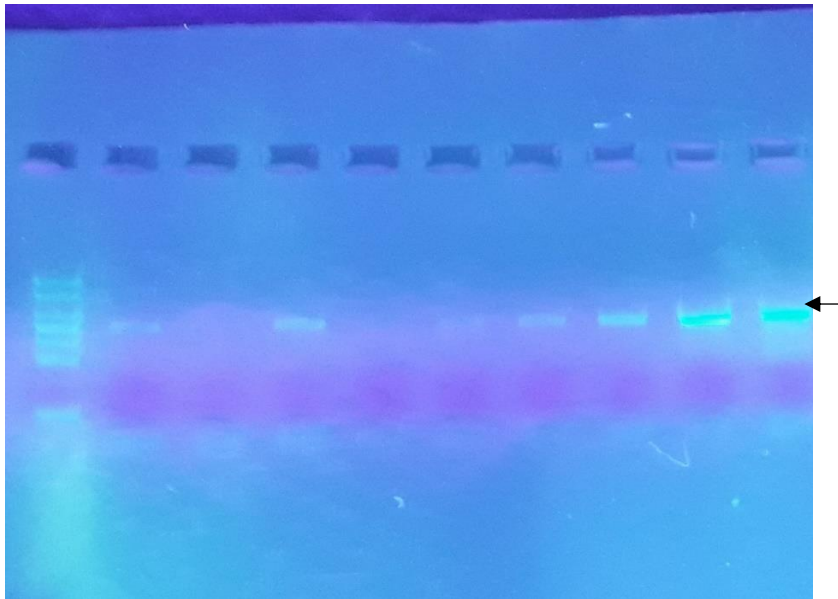
Με σκοπό την επιβεβαίωση της επίτευξης επιτυχημένης απομόνωσης του DNA από τα δείγματα αίματος αγελάδας ,πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%, με τα αποτελέσματα να απεικονίζονται στην παρακάτω εικόνα όπου διακρίνονται οι ζώνες του DNA που απομονώθηκε.



Εικόνα 9.Απεικόνιση των αποτελεσμάτων απομόνωσης DNA

3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης(PCR)

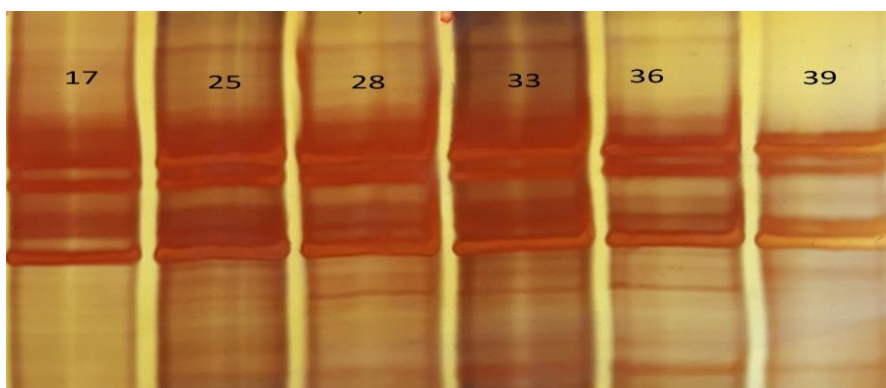
Για την ενίσχυση ενός τμήματος της περιοχής D-Loop στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα της αγελάδας, χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών D-Loop όπως προηγουμένως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.2.4. Τα προϊόντα PCR που προέκυψαν ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% με σκοπό τον έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης της πολυμεράσης. Επίσης, για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας τμημάτων DNA (ladder 100bp). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην εικόνα που ακολουθεί. Στο βέλος φαίνεται το μέγεθος του τμήματος που ενισχύθηκε (537 bp).



Εικόνα 10. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR

3.3 Single-strand conformation polymorphism(SSCP)

Τα προϊόντα της PCR που προέκυψαν από το ζεύγος των εκκινητών D-Loop, αφού αποδιατάχθηκαν, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10% w/v για 22 ώρες περίπου στα 220 volts. Στη συνέχεια στις πηκτές πραγματοποιήθηκε χρώση με νιτρικό άργυρο με σκοπό την εμφάνιση ζωνών για να γίνει η διάκριση μεταξύ των διαφορετικών προτύπων. Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται μια πηκτή ακρυλαμίδης που περιέχει πρότυπα από προϊόντα PCR που προέκυψαν με ενίσχυση από το ζεύγος εκκινητών D-Loop.

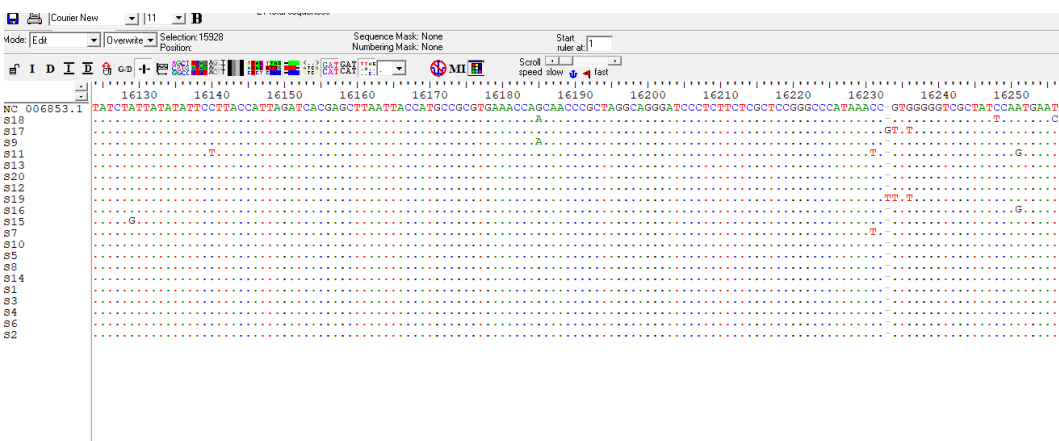
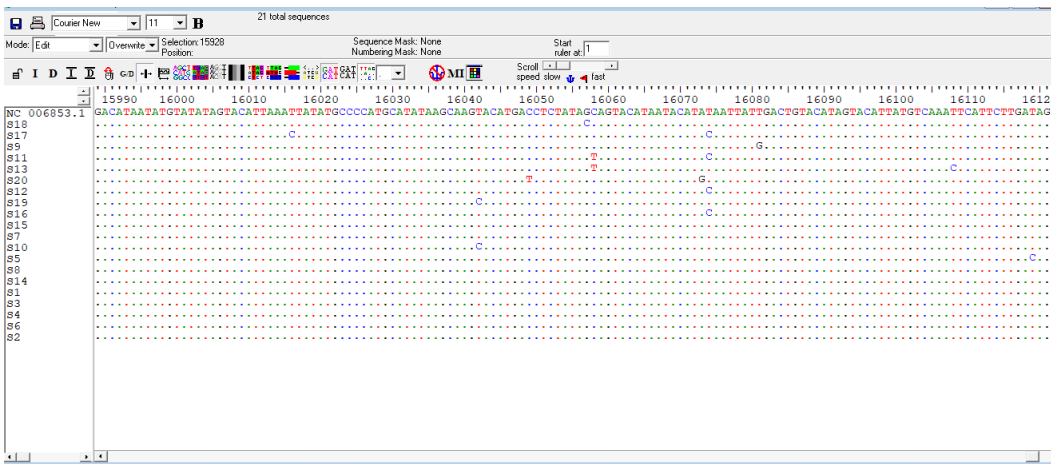


Εικόνα 11. Αποτελέσματα SSCP

Στην εικόνα διακρίνονται 4 διαφορετικά πρότυπα ζωνών. Ένα κοινό πρότυπο για τα δείγματα 17 και 28, ένα για τα δείγματα 25 και 36 και τέλος τα δείγματα 33 και 39 αποτελούν ξεχωριστά πρότυπα αντίστοιχα.

3.4 Αλληλούχηση

Από τα συνολικά 107 δείγματα παρατηρήθηκαν 20 διαφορετικά πρότυπα με τη χρησιμοποίηση του ζεύγους εκκινητών D-Loop, τα οποία επιλέχθηκαν και εστάλησαν για αλληλούχηση. Στη συνέχεια, έγινε σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης για τα 20 αυτά δείγματα με βάση μια αλληλουχία αναφοράς. Η αλληλουχία αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε, λήφθηκε από τη βάση δεδομένων της NCBI (NC_006853.1 *Bos taurus* mitochondrion, complete genome). Σύμφωνα με αυτή τη σύγκριση, προέκυψαν 14 διαφορετικά πρότυπα τα οποία ανιχνεύτηκαν στα άτομα από τον πληθυσμό αγελάδων Holstein όπου έγινε η λήψη των δειγμάτων.



Εικόνα 12. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης

Πίνακας 3. Τα πρότυπα της SSCP για τους εκκινητές D-Loop σε σχέση με τον αριθμό των δειγμάτων που εμφανίζονται.

ΠΡΟΤΥΠΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
ΠΡΟΤΥΠΟ 1	13
ΠΡΟΤΥΠΟ 2	2
ΠΡΟΤΥΠΟ 3	1
ΠΡΟΤΥΠΟ 4	1
ΠΡΟΤΥΠΟ 5	1
ΠΡΟΤΥΠΟ 6	5
ΠΡΟΤΥΠΟ 7	1
ΠΡΟΤΥΠΟ 8	1
ΠΡΟΤΥΠΟ 9	9
ΠΡΟΤΥΠΟ 10	1
ΠΡΟΤΥΠΟ 11	1
ΠΡΟΤΥΠΟ 12	1
ΠΡΟΤΥΠΟ 13	36
ΠΡΟΤΥΠΟ 14	1

Τα πρότυπα, στη συνέχεια, αντιστοιχήθηκαν σε ανθεκτικά και μη ανθεκτικά άτομα του πληθυσμού που ερευνήθηκε. Ως ανθεκτικά ορίστηκαν εκείνα που αναπαράχθηκαν επιτυχώς έπειτα από τεχνητή σπερματέγχυση που τους πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της καλοκαιρινής περιόδου.

Πίνακας 4. Η αντιστοίχιση των προτύπων σε ανθεκτικά και μη ανθεκτικά άτομα

ΠΡΟΤΥΠΑ	ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΑΤΟΜΑ	ΜΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΑΤΟΜΑ
1	1	12
2	0	1
3	0	1
4	0	1
5	0	1
6	1	4
7	0	1
8	1	0
9	4	5
10	0	1
11	1	0
12	1	0
13	10	26
14	0	1

4. Συζήτηση

Οι αγελάδες γαλακτοπαραγωγής είναι εξαιρετικά ευαίσθητες στην θερμική καταπόνηση που είναι αποτέλεσμα των πολύ υψηλών επιπέδων θερμοκρασίας και υγρασίας κατά τη διάρκεια των θερινών περιόδων. Στις αγελάδες που εκτίθενται σε αυτές τις συνθήκες παρατηρείται σημαντική μείωση της παραγωγής γάλακτος, μειωμένη όρεξη και πρόσληψη τροφής, καθώς και μειωμένος αριθμός γεννήσεων. Μια προσέγγιση για την επίλυση του προβλήματος είναι η εγκατάσταση των παραγωγικών μονάδων σε ψυχρότερες περιοχές με στόχο την αποφυγή των αρνητικών επιπτώσεων της θερμικής καταπόνησης στην παραγωγικότητα των αγελάδων (Kino et al 2018, Habeeb et al 2018). Επίσης, έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλες στρατηγικές για την αντιμετώπιση της θερμικής καταπόνησης, όπως η διατροφική διαχείριση και η παροχή κατάλληλου περιβάλλοντος για τις αγελάδες με τη χρήση ειδικών ανεμιστήρων για δροσισμό και κατασκευών που εξασφαλίζουν σκιά, οι οποίες έχουν υψηλό κόστος και δεν εμφανίζουν ιδιαίτερα θετικά αποτελέσματα. (Nguyen et al 2017).

Παράλληλα, τα ίδια τα ζώα διαθέτουν ομοιοστατικούς μηχανισμούς ώστε να διατηρούν σε ισορροπία το εσωτερικό τους περιβάλλον. Η ικανότητα των ομοιόθερων ζώων να ρυθμίζουν την θερμοκρασία του σώματός τους αποτελεί μια εξελικτική προσαρμογή που τους επιτρέπει να παραμένουν λειτουργικοί παρά τις μεταβαλλόμενες θερμοκρασίες του περιβάλλοντος στο οποίο ζουν. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του ζώου και του περιβάλλοντός του είναι ιδιαίτερα σημαντική και υπογραμμίζεται και από το γεγονός της παραγωγής υψηλής ποσότητας γάλακτος σε εύκρατο κλίμα. Επίσης, και μέσα σε ένα είδος, οι διαφορετικές ράτσες εμφανίζουν ποικίλα επίπεδα προσαρμογής στο θερμικό στρες. Για παράδειγμα, από παλαιότερες μελέτες είναι αποδεκτό ότι τα βοοειδή *Bos taurus* είναι λιγότερο προσαρμοσμένα σε τροπικά και υποτροπικά ζεστά, καθώς επίσης και σε περιβάλλοντα με υγρασία, από ότι τα βοοειδή *Bos indicus* και *Zebu*. Επιπλέον, συγκρίνοντας τα βοοειδή *B. taurus* μεταξύ τους, τα βοοειδή *Jerseys* ήταν πιο ανθεκτικά στις επιδράσεις θερμικού στρες στην παραγωγή γάλακτος από ότι τα *Holstein*. (Kadzere et al, 2002).

Τα τελευταία χρόνια, η στρατηγική που έχει επικρατήσει για τον περιορισμό των αρνητικών αποτελεσμάτων της θερμικής καταπόνησης στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής είναι η γενετική βελτίωσή τους μέσω των επιλεκτικών διασταυρώσεων μεταξύ των ανθεκτικών ατόμων που παρατηρούνται σε έναν πληθυσμό. Τα ανθεκτικά άτομα συνήθως εμφανίζουν πολυμορφικές θέσεις στο γονιδίωμά τους που σχετίζονται με την ανοχή στο θερμικό στρες και μπορούν να παράγουν γάλα και αναπαραχθούν επιτυχημένα. Για παράδειγμα, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε πυρηνικά γονίδια, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η έκφραση των γονιδίων μεταγραφικών παραγόντων θερμικού σοκ καθώς επίσης και των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες θερμικού σοκ και υπομονάδες του συμπλόκου Na^+/K^+ ATPase (ATP1A1 και ATP1B2) επηρεάζεται από την επίδραση της θερμικής καταπόνησης.

Ωστόσο, εκτός από την εύρεση πολυμορφικών θέσεων που σχετίζονται με τη θερμοανθεκτικότητα στα πυρηνικά γονίδια, έχει γεννηθεί η ανάγκη αναζήτησης αντίστοιχων θέσεων στο μιτοχονδριακό

DNA. Πιο συγκεκριμένα, έρευνες έχουν δείξει πως η μητρική κληρονομικότητα επιδρά στην ικανότητα των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής να παράγουν γάλα και να αναπαράγονται επιτυχώς. Τα μιτοχονδριακό γονιδίωμα κληρονομείται από την μητέρα και λόγω του υψηλού ποσοστού μεταλλαγών που εμφανίζει, πιθανόν οι αλλαγές που παρατηρούνται σε αυτό να σχετίζονται με τα παραπάνω χαρακτηριστικά. (Sutarno et al, 2002). Επίσης, το μιτοχόνδριο αποτελεί το κέντρο παραγωγής ενέργειας, καθώς είναι η κύρια πηγή παραγωγής της κυτταρικής ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Srirattana et al, 2017). Ένας λόγος που δικαιολογεί την μειωμένη παραγωγή γάλακτος είναι το αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο καθώς το ζώο προσπαθεί να διατηρήσει την ομοιόσταση του προς αποφυγή της υπερθερμίας. Οι αγελάδες που υποφέρουν από θερμική καταπόνηση εμφανίζουν μειωμένη όρεξη που οδηγεί σε μειωμένη πρόσληψη ζωοτροφών. Ακολούθως, προκαλείται μείωση του επιπέδου της ηπατικής γλυκόζης που οδηγεί σε ελαττωμένη παραγωγή ενέργειας μέσω του μεταβολισμού (που συμμετέχουν τα μιτοχόνδρια) και μειωμένη παροχή γλυκόζης στους μαστικούς αδένες με αποτέλεσμα να επηρεάζεται αρνητικά η σύνθεση λακτόζης που οδηγεί σε χαμηλή παραγωγή γάλακτος σε αγελάδες Holstein (Habeeb et al, 2018).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν εκκινήτες για την ενίσχυση της D-Loop περιοχής του μιτοχονδριακού γονιδιώματος με σκοπό τον έλεγχο ύπαρξης πολυμορφικών θέσεων που να σχετίζονται με την θερμοαντοχή. Η επιλογή της D-Loop στηρίχθηκε στο γεγονός ότι αποτελεί την πιο γρήγορα εξελισσόμενη περιοχή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος και περιέχει πολλές πολυμορφικές θέσεις (περισσότερες από κάθε κωδική περιοχή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος), αρκετές από τις οποίες έχει δειχθεί ότι σχετίζονται με χαρακτηριστικά όπως η παραγωγή γάλακτος και η επιτυχημένη αναπαραγωγή, τα οποία επηρεάζονται άμεσα όταν επικρατούν συνθήκες θερμικής καταπόνησης (Schutz et al 1994, Sutarno et al 2002, Chung et al 2013).

Από την διαθέσιμη βιβλιογραφία, έχουν εντοπιστεί πολυμορφισμοί στην D-Loop περιοχή που σχετίζονται με αυξημένη ή μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα και απόδοση γάλακτος σε αγελάδες Holstein (Schutz et al 1994), οι οποίοι παρατηρήθηκαν σε μερικά πρότυπα που ανιχνεύθηκαν στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία. Πιο συγκεκριμένα στα πρότυπα 6,7,10 και 11 παρατηρήθηκε η αλλαγή T→C στη θέση 16074 η οποία έχει συσχετισθεί με αυξημένη παραγωγή γάλακτος και αναπαραγωγική ικανότητα. Στα πρότυπα 6 και 8 παρατηρήθηκε η αλλαγή C→T στη θέση 16058 που εμφάνιζε παρόμοια αποτελέσματα με την προηγούμενη, ενώ στο πρότυπο 3 παρατηρήθηκε η αλλαγή C→T στη θέση 16231 που σχετίζεται με μειωμένη απόδοση γάλακτος και αναπαραγωγική ικανότητα. Παράλληλα, έχουν βρεθεί πολυμορφισμοί στην D-Loop στις θέσεις 16042, 16119 και 16247 που ανιχνεύθηκαν σε κάποια από τα πρότυπα της εργασίας αλλά δεν έχουν συσχετισθεί με κάποια από τα παραπάνω χαρακτηριστικά (Chung et al, 2013). Επίσης, ανιχνεύθηκαν επιπλέον 11 πολυμορφικές θέσεις στην περιοχή D-Loop.

Συμπερασματικά, σε μερικά πρότυπα φαίνεται να επιβεβαιώνεται το γεγονός ότι οι πολυμορφισμοί στην D-Loop περιοχή του mtDNA επηρεάζουν την γονιμότητα των αγελάδων και την παραγωγή γάλακτος (Sutarno et al 2002, Schutz et al 1994). Δεν είναι ξεκάθαρο, όμως αν σχετίζονται με την αντοχή στην θερμοανθεκτικότητα. Παράλληλα, στην συγκεκριμένη εργασία βρέθηκαν πολυμορφισμοί όπου δεν συσχετίστηκαν με τέτοιου είδους χαρακτηριστικά και πιθανόν να απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση. Οι αλλαγές που παρατηρούνται στην D-Loop δεν επηρεάζουν την αμινοξική αλληλουχία καθώς αποτελεί μη κωδική περιοχή. Η εστίαση της έρευνας μόνο στη D-Loop περιοχή

φαίνεται να μην οδηγεί σε ασφαλή αποτελέσματα. Επειδή η D-Loop αποτελεί την θέση του αντιγραφικού και μεταγραφικού ελέγχου, οι πολυμορφισμοί σε αυτήν πιθανόν να επηρεάζουν την λειτουργία ολόκληρου του mtDNA, συμπεριλαμβανομένων και των περιοχών που κωδικοποιούν τις υπομονάδες που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (Sutarano et al 2002). Για αυτό, ίσως, η καλύτερη επιλογή θα ήταν ο έλεγχος των κωδικών περιοχών του mtDNA σε συνδυασμό με την D-Loop (Chung et al, 2013).

Βιβλιογραφία

- Ahmed BMS, Younas U, Asar TO, Dikmen S, Hansen PJ, Dahl GE (2017). Cows exposed to heat stress during fetal life exhibit improved thermal tolerance. *American Society of Animal Science. J. Anim. Sci.* 2017.95:3497–3503
- Bernabucci U, Biffani S, Buggiotti L, Vitali A, Lacetera N, Nardone A.(2014).The effects of heat stress in Italian Holstein dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 97 :471–486
- Carabaño María J, Ramón Manuel, Menéndez-Buxadera Alberto, Molina Antonio, Díaz Clara (2019). Selecting for heat tolerance. *Animal Frontiers*, Volume 9, Issue 1, Pages 62–68
- Chrétien D, Bénit P, Ha HH, Keipert S, El-Khoury R, Chang YT, Jastroch M, Jacobs HT, Rustin P, Rak M. (2018), Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 °C, *PLoS Biol.* 2018 Jan 25;16(1):e2003992. doi: 10.1371/journal.pbio.2003992.
- Chung Hoyoung (2013). Phylogenetic analysis and characterization of mitochondrial DNA for Korean native cattle .*Open Journal of Genetics*, 2013, 3, 12-23
- Dong Y, Zhu H. (2005) Single-strand conformational polymorphism analysis: basic principles and routine practice. *Methods Mol Med.*;108:149-57.
- Garner J. B., Douglas M. L., O Williams S. R., Wales W. J., Marett L. C, Nguyen T. T. T.,C. M. Reich & Hayes B. J. (2016). Genomic Selection Improves Heat Tolerance in Dairy Cattle. *Scientific Reports* | 6:34114 | DOI: 10.1038/srep34114
- Gauly M, Bollwein H, Breves G, Brügemann K, Dänicke S, Daş G, Demeler J, Hansen H, Iselstein J, König S, Lohölter M, Martinsohn M, Meyer U, Potthoff M, Sanker C, Schröder B, Wrage N, Meibaum B, von Samson-Himmelstjerna G, Stinshoff H, Wrenzycki C.(2013) Future consequences and challenges for dairy cow production systems arising from climate change in Central Europe - a review. *Animal.* 2013 May;7(5):843-59. doi: 10.1017/S1751731112002352. Epub 2012 Dec 20.

- Habeeb Alsaied Alnaimy, Gad Ahmed Elsayed and Abas Mostafa Atta(2018). Temperature-Humidity Indices as Indicators to Heat Stress of Climatic Conditions with Relation to Production and Reproduction of Farm Animals. *International Journal of Biotechnology and Recent Advances* 1(1): 35-50.doi: 10.18689/ijbr-1000107
- Hammami H, Bormann J, M'hamdi N, Montaldo HH, Gengler N (2013). Evaluation of heat stress effects on production traits and somatic cell score of Holsteins in a temperate environment. *J. Dairy Sci.* 96 :1844–1855
- Kadzere C.T, Murphy M.R, Silanikove N., Maltz E. (2002) Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livestock Production Science*, Volume 77, Issue 1, Pages 59–91
- Kino E, Kawakami R, Minamino T, Mikurino Y, Horii Y, Honkawa K, Sasaki Y (2018). Exploration of factors determining milk production by Holstein cows raised on a dairy farm in a temperate climate area. Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1720-6>
- Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH.(2012) Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp.* 2012 Apr 20;(62). pii: 3923. doi: 10.3791/3923.
- Macciotta NPP, Biffani S, Bernabucci U, Lacetera N, Vitali A, Ajmone-Marsan P, Nardone A. (2017). Derivation and genome-wide association study of a principal component-based measure of heat tolerance in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* Volume 100, Issue 6, Pages 4683-4697
- Nguyen TTT, Bowman PJ, Haile-Mariam M, Pryce JE, Hayes BJ.(2016). Genomic selection for tolerance to heat stress in Australian dairy cattle. *Journal of Dairy Science* Volume 99, Issue 4,Pages 2849-2862
- Nguyen TTT, Bowman PJ, Haile-Mariam M, Nieuwhof GJ, Hayes BJ, Pryce JE.(2017). Short communication: Implementation of a breeding value for heat tolerance in Australian dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 100:7362–7367
- Russel, Peter J. (2006) *iGenetics: A Mendelian Approach*
- Santana ML, Bignardi AB, Pereira RJ, Stefani G, El Faro L. (2016). Genetics of heat tolerance for milk yield and quality in Holsteins. *Animal*, page 1 of 11 The Animal Consortium
- Sharma R, Kishore A, Mukesh M, Ahlawat S, Maitra A, Pandey AK, Tantia MS. (2015). Genetic diversity and relationship of Indian cattle inferred from microsatellite and mitochondrial DNA markers. *BMC Genet.* 2015 Jun 30;16:73. doi: 10.1186/s12863-015-0221-0.
- Schutz M.M, Freeman A.E, Lindberg G.L, Koehler C.M, Beitz D.C (1994). The effect of mitochondrial DNA on milk production and health of dairy cattle. *Livestock Production Science* Volume 37, Issue 3, Pages 283-295

- Srirattana Kanokwan, McCosker Kieren, Schatz Tim and St. John Justin C. (2017), Cattle phenotypes can disguise their maternal ancestry. BMC Genetics. DOI 10.1186/s12863-017-0523-5
- Sutarno, Cummins JM, Greeff J, Lymbery AJ. (2002) Mitochondrial DNA polymorphisms and fertility in beef cattle. Theriogenology. Apr 1;57(6):1603-10.
- Tsai T, St John JC (2016). The role of mitochondrial DNA copy number, variants, and haplotypes in farm animal developmental outcome. Domestic Animal Suppl:S133-46
- Waters DL, Shapter FM(2014). The polymerase chain reaction (PCR): general methods. Methods Mol Biol. 2014;1099:65-75. doi: 10.1007/978-1-62703-715-0_7.