

پویش ژنوم برخی صفات تولیدمثلی گاو هلستاین ایران

Genome-Wide Association Studies for Selected Reproductive traits in Iranian Holstein cattle

Abstract

The aim of this study was to identify Single Nucleotide Polymorphism (SNP) associated with selected reproductive traits in Holstein dairy cattle. The interval between calving and the first insemination, days open, the interval between the first and last insemination, and the number of inseminations per pregnancy were analyzed. For this purpose, the hair samples of 150 cattle, born between 2012-2014 in one of the cattle farms of Ferdous Pars company, were used for genotyping based on 30108 SNPs chip. The data were analyzed using the least square variance analysis method using the GLM. GWAS analysis was performed after controlling the quality of the data. The results identified that 2 and 12 SNPs had a significant correlation with calving to insemination interval and interval between first to last insemination traits ($p < 0.04$), respectively. In addition, 11 SNPs and 5 SNPs showed significant correlation for days open and the number of insemination per conception traits ($p < 0.04$), respectively. In the Post-GWAS stage, some Quantitative Trait Loci (QTL) and various genes were identified that affected or controlled the trait. Out of the related NUF2 gene on chromosome 3 affects the development of the oocyte, ANAPC1 gene on chromosome 11, which affects sperm motility, PITX2 gene in chromosome 6, affects milk production and ELOVL6 gene on chromosome 6 affects body weight. In general, it can be concluded that chromosomes 3, 6 and 11 have SNPs that are more strongly related to reproductive traits.

Key word: Days open, Day to first insemination, interval from first to last insemination,

چکیده

هدف از انجام این تحقیق شناسایی نشانگرهای تک نوکلئوتیدی موثر بر برخی صفات تولیدمثلی در گاوهای شیری هلستاین ایران است. برای این منظور از نمونه مو ۱۵۰ راس گاو که بین سالهای ۱۳۹۰-۱۳۹۲ در یکی از گاوداری های شرکت فردوس پارس متولد شده بودند، جهت تعیین ژنوتیپ با تراشه حاوی ۳۰۱۰۸ SNP استفاده شد. بعد از انجام مراحل کنترل کیفیت داده‌ها با استفاده از روش تجزیه واریانس حداقل مربعات با استفاده از رویه GLM، آنالیز GWAS انجام گردید. نتایج آنالیز نشان داد ۲ تغییر تک نوکلئوتیدی با صفت فاصله زایش تا آبستنی و ۱۲ تغییر تک نوکلئوتیدی با صفت فاصله بین اولین و آخرین تلقیح ارتباط معنی داری ($p < 0.04$) داشتند، در صفت روزهای باز ۱۱ و برای صفت تعداد تلقیح به ازای آبستنی نیز ۵ تغییر تک نوکلئوتیدی معنی دار ($p < 0.04$) وجود داشت. بررسی ها بعد از مکان یابی ژنها تعدادی QTL و ژنهای مختلفی را شناسایی کرد که بر صفات مورد بررسی اثرگذار یا کنترل کننده بودند. از جمله این ژن‌ها می‌توان به ژن NUF2 در کروموزوم ۳ که بر تکامل سلول تخم، ژن ANAPC1 در کروموزوم ۱۱ که بر جنبانی اسپرم، ژن PITX2 در کروموزوم ۶ که بر تولید شیر، ژن ELOVL6 در کروموزوم ۶ که بر افزایش وزن بدن، موثر است اشاره نمود. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که کروموزوم ۳، ۶ و ۱۱ دارای تغییرات تک نوکلئوتیدی هستند که در ارتباط قوی تری با صفات تولیدمثلی بوده و در حاشیه همین تغییرات تک نوکلئوتیدی، QTL و ژن‌هایی یافت شد که مرتبط با صفات تولید مثلی بوده اند.

کلید واژه: روزهای باز، فاصله زایش تا اولین تلقیح، فاصله اولین و آخرین تلقیح،

مقدمه

هدف پرورش دهندگان گاو شیری داشتن گاوهایی است که میانگین رکورد بالایی داشته باشند، سالیانه یک گوساله تولید کنند و بدون مشکل جدی جسمی یک دوره تولید طولانی را سپری نمایند. از زمان اهلی شدن گاو تا کنون، طیف گسترده ای از رویدادهای انتخاب

طبیعی و مصنوعی، ویژگی‌های مهم اقتصادی گاو، مانند سازگاری با محیط‌های مختلف، تولیدمثل، فرم بدن، رفتار، مقاومت در برابر بیماری‌ها و انگل‌ها ویژگی‌های اقتصادی مطلوب را به شدت تغییر داده‌است (Bordbar et al., 2022). به عنوان نمونه، از آنجایی که مقدار تولید شیر با عملکردهای تولیدمثلی رابطه نامطلوب دارد، افزایش تولید شیر در سال‌های گذشته باعث ضعف در این صفات شد، بطوری که مشکلات تولیدمثلی از جمله دلایل اصلی عدم سودآوری در گله‌های گاو شیری گزارش شده‌است (Ahlman et al., 2011). با پیشرفت دانش و تکنولوژی در طی سال‌های گذشته راه‌های گوناگونی جهت رفع این مسائل یافت شد و مطالعاتی بر روی شناسایی جایگاه‌های کمی (QTL) موثر بر صفات مختلف در گاو شیری صورت گرفته که باعث شناسایی تعداد زیادی QTL موثر بر این صفات روی کروموزوم‌های مختلف گردیده‌است. پس از آن در حوزه روش‌های مولکولی و شناسایی تعداد زیاد نشانگرهای ژنتیکی از جمله نشانگرهای تک نوکلئوتیدی^۲ اصلاح‌کنندگان دام می‌توانند با صحت بالاتر نسبت به بررسی و یافتن QTL‌های موثر بر این صفات اقدام نمایند. همچنین مطالعه پویش کل ژنوم (GWAS^۳) می‌تواند به شناسایی بهتر ژن‌های مرتبط با صفات اقتصادی کمک کرده و این اطلاعات به درک بهتر ما از مکانیسم صفات مورد مطالعه کمک می‌کنند. اهمیت مطالعات پویش ژنوم برای شناسایی بخش‌های مختلف ژنوم و واریانت‌های ژنتیکی برای صفات با پیچیدگی بیشتر است. در گاو شیری از روش GWAS جهت شناسایی تغییرات تک نوکلئوتیدی موثر بر صفات تولیدی از جمله مقدار تولید شیر^۴، مقدار چربی^۵، مقدار پروتئین (Nayeri et al., 2016 و Van den Berg, et al (2016) صفات سلامتی از جمله: ورم پستان، سلامت رحم (Flurry et al., 2014 و Sahana et al., 2014) ماندگاری دام در گله (Zhang et al., 2016) و صفات تولیدمثلی (Nayeri et al., 2016) بهره گرفته شده‌است.

از جمله صفات تولیدمثلی مورد بررسی می‌توان به صفت فاصله زایش تا نخستین تلقیح^۶ (DFS)، روزهای باز^۷ (DO)، تعداد تلقیح به ازای آبستنی^۸ (NSPC) و فاصله بین اولین و آخرین تلقیح^۹ (IFL) اشاره نمود. هر چه فاصله زایش تا نخستین تلقیح به حد بهینه خود نزدیکتر باشد، روزهای غیر آبستنی و در نتیجه فاصله گوساله‌زایی کاهش می‌یابد، که این عامل باعث افزایش سوددهی واحد گاو‌داری خواهد شد. از عواملی که می‌توانند باعث افزایش این فاصله شوند می‌توان به جفت ماندگی و وزن گوساله در زمان تولد (Muller et al., 2014) اشاره نمود. فاصله اولین و آخرین تلقیح از جمله صفاتی است که به توانایی گاو برای آبستن شدن مرتبط است. این صفت همبستگی زیادی با تعداد تلقیحات (۰/۹۲) دارد (Giasi et al., 2011). افزایش یک تلقیح می‌تواند این فاصله را در حدود ۲۱ روز افزایش دهد. افزایش IFL در گله می‌تواند ناشی از مشکلات تولیدمثلی، جذب رویان در روزهای اولیه یا سقط جنین در ماه‌های اول آبستنی و عدم توجه به فحل‌یابی باشد.

روزهای باز فاصله بین زایش تا تلقیح منجر به آبستنی است. روزهای باز مناسب، فاصله گوساله‌زایی بهتر را به همراه خواهد داشت. اما زایش‌های غیر طبیعی همراه با سخت‌زایی روزهای باز را افزایش می‌دهند (Hammoud et al., 2010). تعداد تلقیح به ازای آبستنی صفت مهم دیگری است که به طور مستقیم، میانگین تعداد زایش در گله، هزینه‌های تلقیح، درآمد حاصل از گوساله‌های متولد شده، جایگزینی و حذف اختیاری و غیراختیاری، ترکیب سنی گله، فاصله نسل، شدت انتخاب و صحت انتخاب تحت تاثیر قرار می‌دهد (Hammoud et al., 2010).

1. Quantitative Trait Locus

2. Single Nucleotide Polymorphism

3. Genome-Wide Association Studies

4. Milk yield

5. Fat yield

6. Days to First Services

7. Days Open

8. Number of Services per Conception

9. Interval from First to Last Insemination

از آن جا که هدف نهایی اصلاح نژاد افزایش شایستگی اقتصادی سیستم است، لذا بررسی صفات تولیدمثلی و ژنهای موثر بر این صفات با استفاده از روش GWAS و یافتن جایگاه‌های موثر بر این صفات در جمعیت‌های مختلف گاو هلستاین ضروری است. در نهایت، این داده‌ها می‌توانند به گسترش درک ما از ژن‌های موثر در داخل یک جمعیت نژادی در منطقه خاص کمک می‌کنند. هدف این پژوهش شناسایی تغییرات تک نوکلئوتیدی موثر بر برخی صفات تولیدمثلی در گاوهای هلستاین ایران بود.

مواد و روش‌ها

از مهمترین عوامل در مطالعات GWAS، اندازه نمونه است. هرچه اندازه نمونه بزرگتر باشد، نمونه نماینده‌تری برای جمعیت بوده و احتمال اینکه اثر واقعی شناسایی شود بیشتر است. روشی برای نمونه‌گیری بهتر است که با حداقل تعداد نمونه و هزینه‌های کمتر صحت آماری بالاتری داشته باشد. بنابراین برای انجام این مطالعه از روش انتخاب بر اساس ارزش انحراف عملکرد دو طرفه (Jalil Sargale et al., 2020) استفاده گردید. به منظور انجام این پروژه از ۱۵۰ (این قسمت در فایل جداگانه این توضیح داده شد) راس گاو هلستاین ایرانی در یکی از دامداری‌های شرکت فردوس پارس، که بین سال‌های ۱۳۹۰ - ۱۳۹۲ متولد شده بود استفاده شد. در مرحله اول گاوها بر اساس ارزش اصلاحی صفت تولید شیر از بزرگ به کوچک مرتب شده و در مرحله بعد ۷۵ راس گاو دارای بالاترین ارزش اصلاحی و ۷۵ راس با کمترین ارزش اصلاحی تولید شیر انتخاب شد. لازم به ذکر است گاوهای از نظر همخونی مورد بررسی قرار گرفته و همچنین رابطه خوهری تنی در این گاوها وجود نداشت.

حیوانات انتخاب شده دارای شجره و رکورد برداری کامل بودند و دقت شد که حیوانات انتخاب شده جزء حیوانات کاندیدای حذف شدن نباشند. همچنین جهت برآورد صفات تولیدمثلی، داده گله و دام‌های مورد بررسی شامل اطلاعات شناسنامه، زایش و رکورد تولید و داده تلقیح دام‌ها از نرم افزار مدیریتی گله‌ها و داده تکمیلی از مرکز اصلاح نژاد دام کل کشور جمع‌آوری شد. کارت موی ۱۵۰ حیوان جهت تعیین ژنوتیپ به شرکت GeenSeek در کشور آمریکا فرستاده شد. به طوری که ۱۵۰ حیوان مربوط با panel GGP-LD v4 SNP (حاوی ۳۰۱۰۸ تغییر تک نوکلئوتیدی) تعیین ژنوتیپ شد. جهت کنترل کیفیت ژنوتیپ‌ها از چهار معیار در نرم افزار PLINK 2.0 استفاده شده بود (Moradi et al., 2012).

۱. Animal call rate: در این معیار حیوانات با بیش از ۵ درصد ژنوتیپ از دست رفته حذف شدند.

۲. فراوانی آلل کمیاب (MAF^{10}): تغییرات تک نوکلئوتیدی‌هایی با MAF کمتر از ۲ درصد حذف شدند.

۳. نرخ فراخوانی تغییرات تک نوکلئوتیدی: تغییر تک نوکلئوتیدی که برای بیش از ۵ درصد حیوانات ژنوتایپ نشده حذف شدند.

۴. تعادل هاردی-واینبرگ

جهت شناسایی عوامل ثابت موثر بر صفات تولیدمثلی در GWAS، داده‌ها با استفاده از روش تجزیه واریانس حداقل مربعات با استفاده از رویه (Generalized Linear Model) GLM در نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ مورد آنالیز قرار گرفتند (رابطه ۱). که اثر بهار بند و سال تولد به عنوان عوامل ثابت و سن حیوان به عنوان کوواریت در مدل تعریف شد. معادله مورد استفاده در GWAS به صورت زیر است:

$$y = X\beta + Zu + e$$

(رابطه ۱)

در این مدل y بردار مشاهدات، X ماتریس ضرایب برای عوامل ثابت شامل میانگین، کوواریت‌ها و اثرات تغییرات تک نوکلئوتیدی می‌باشد، β بردار اثرات ثابت، Z ماتریس ضرایب اثرات تصادفی ژنتیک افزایشی، u بردار آثار تصادفی ژنتیکی افزایشی و e بردار اثرات باقی مانده مدل می‌باشد.

علاوه بر این $\text{Var}(e) = \sigma_e^2 I$ و $\text{Var}(u) = \sigma_u^2 K$ می‌باشد که K یک ماتریس خویشاوندی ژنومی با استفاده از داده های ژنوتیپ محاسبه شد و سپس در مدل مورد استفاده قرار گرفت و I یک ماتریس یکه است.

جهت انجام آنالیزهای Post-GWAS و بررسی QTLهای گاوی در حاشیه ۱MB (۵۰۰kb بالاتر و ۵۰۰kb پایین تر از موقعیت تغییرات تک نوکلئوتیدی معنی‌دار) که در همبستگی با تغییرات تک نوکلئوتیدی معنی‌دار بر صفات مورد مطالعه بودند، از <https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/index> استفاده گردید.

از طرفی به منظور بررسی ژن‌های کاندیدا در اطراف تغییرات تک نوکلئوتیدی مشاهده شده (۱Mb) Ensemble BioMart (<http://www.ensembl.org/biomart/martview>) استفاده شد.

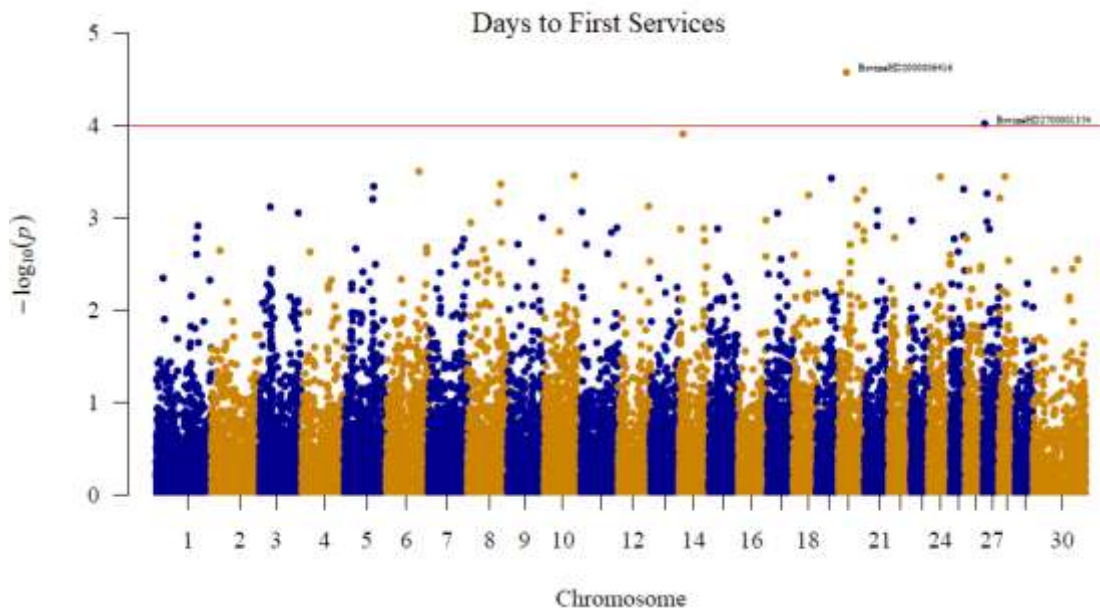
و همچنین جهت تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی (GO¹¹) پایگاه DAVID نسخه ۶/۷ (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) کار برده شد.

نتایج و بحث

در صفت فاصله زایش تا اولین تلقیح (بدون در نظر گرفتن سقط و مرده زایی) میانگین (انحراف معیار) ۶۱(۱۹/۸) روز، در فاصله بین اولین و آخرین تلقیح میانگین ۶۸ (۲۱/۶۶) روز، روزهای باز میانگین ۱۲۹ (۲۶/۹۴) روز و در تعداد تلقیح به ازای آبستنی میانگین ۱/۶ (۲/۶۰ در شکم اول) بود. پس از انجام کنترل کیفیت ژنوتیپ‌ها، تعداد ۲ راس دام بر اساس معیار Animal call rate حذف شده و تعداد ۱۴۸ راس دام برای انجام GWAS باقی ماندند و همچنین بعد از انجام MAF و نرخ فراخوانی تغییر تک نوکلئوتیدی در نهایت ۲۷۳۲۶ SNP مورد آنالیز قرار گرفت.

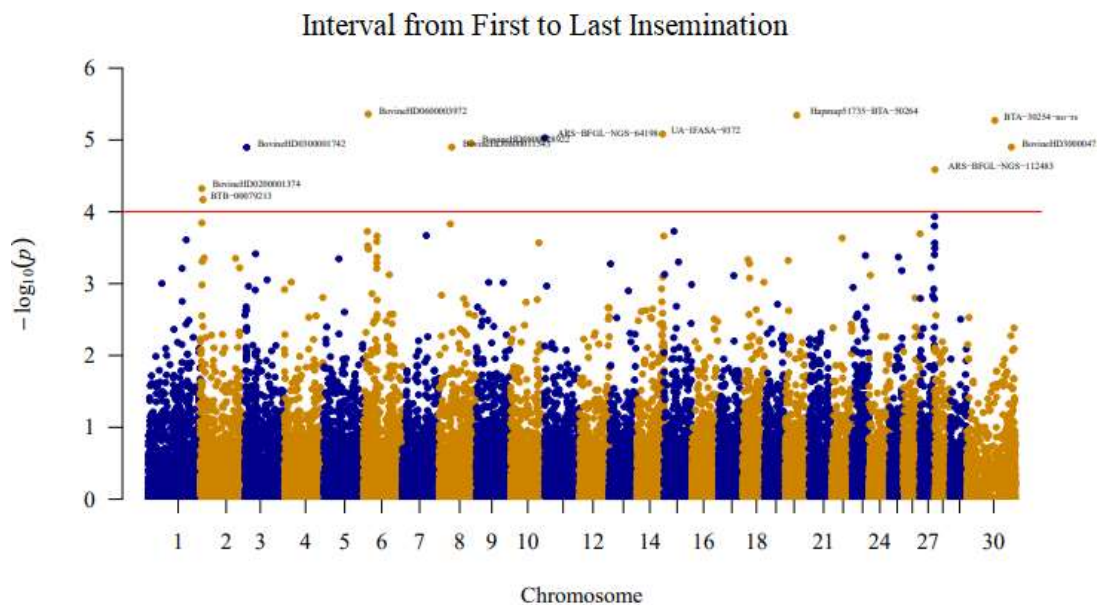
نتایج حاصل از انجام این مطالعه نشان داد در این جمعیت و برای صفت فاصله تلقیح به ازای آبستنی، تعداد ۲ تغییر تک نوکلئوتیدی ارتباط معنی‌داری ($p\text{Value} < 0.04$) با این صفت داشته که بر روی BTA20 و BTA27 واقع شده بودند (شکل ۱). نتایج مطالعه‌ای نشان داد که ۲ تغییر تک نوکلئوتیدی موجود در منطقه BTA13 با صفت DFS همبستگی دارند (Sahana et al., 2010). همچنین در گاوهای شمال کانادا یک ژن در منطقه BTA5 با این صفت همبستگی داشت (Hoglund et al., 2014). در مطالعه (Chen et al., 2022)، ۶۹ تغییر تک نوکلئوتیدی همبستگی با این صفت داشت که در منطقه BTA10، BTA15 و BTA27 بودند که با نتایج بدست آمده در این مطالعه مطابقت دارد. در مطالعه‌ای که بر روی گاوهای هلشتاین ایران انجام گرفت، بیشتر تغییرات تک نوکلئوتیدی معنی‌دار بر این صفت بر روی کروموزوم ۱۹ واقع شده بودند (Mohammadi et al., 2022) در این مطالعه تغییر تک نوکلئوتیدی معنی‌داری در این منطقه مشاهده نشد.

¹¹. Gene Ontology



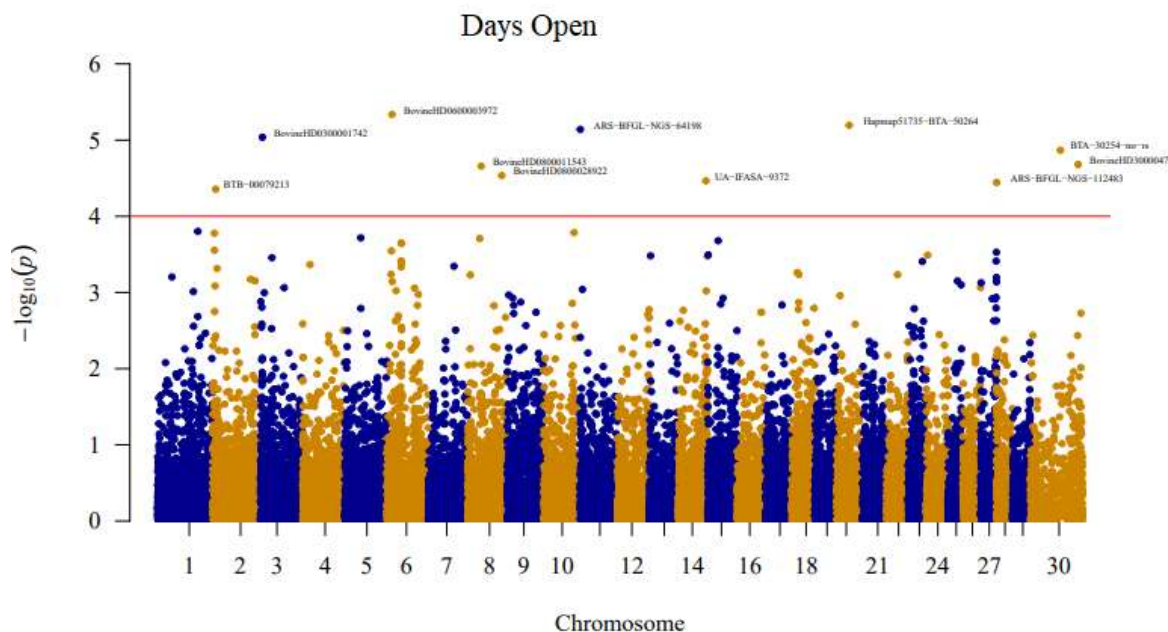
شکل ۱- نمودار منتهن صفت فاصله زایش تا اولین تلقیح، محور X مکان نشانگرها روی کروموزوم، محور Y منفی لگاریتم بر مبنای ۱۰ معیار pValue و خط قرمز رنگ نشانه آستانه معنی داری 10^{-4} می باشد

نتایج آنالیز GWAS نشان داد که ۱۲ تغییر تک نوکلئوتیدی در مناطق BTA2 (۲ تغییر تک نوکلئوتیدی)، BTA3، BTA6، BTA8 (۲ تغییر تک نوکلئوتیدی)، BTA11، BTA14، BTA20، BTA28، BTA30 قرار داشت که ارتباط معنی داری ($p\text{Value} < 0.04$) با صفت فاصله بین اولین و آخرین تلقیح داشته اند (شکل ۲). همچنین تغییر تک نوکلئوتیدی واقع شده بر روی کروموزوم ۸ و ۱۱ بر صفت تعداد تلقیح به ازای آبستنی نیز اثر گذار بود. در مطالعه‌ای (Mohammadi *et al.*, 2022) که بر روی گاوهای هلشتاین ایران انجام گرفت تعداد ۶ تغییر تک نوکلئوتیدی واقع شده در BTA19 اثر معنی دار بر این صفت داشته و همچنین در مطالعه‌ای دیگر (Chen *et al.*, 2022) تعداد ۷۳ تغییر تک نوکلئوتیدی همبستگی با این صفت داشتند که در منطقه BTA6، BTA7، BTA25 واقع شده بودند، که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. همچنین در مطالعه دیگری یک تغییر تک نوکلئوتیدی در BTA2 با صفت DFS همبستگی دارد که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد (Brooks and *et al.*, 2012).



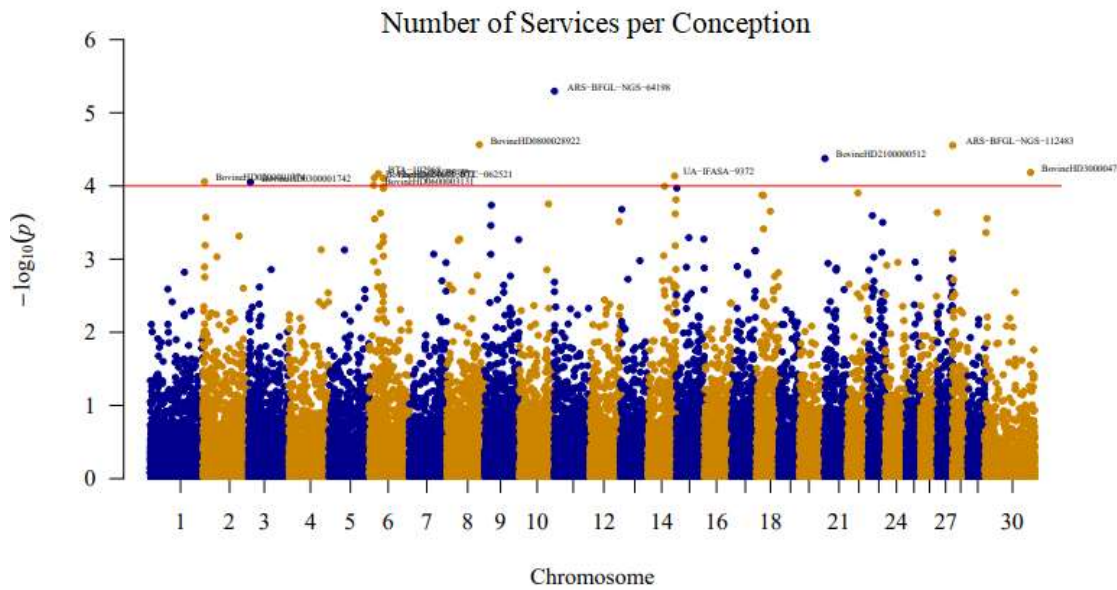
شکل ۲- نمودار منتهن صفت فاصله بین اولین و آخرین تلقیح، محور X مکان نشانگرها روی کروموزوم، محور Y منفی لگاریتم بر مبنای ۱۰ معیار pValue خط قرمز رنگ نشانه آستانه معنی‌داری 10^{-4} می‌باشد

همچنین برای صفت روزهای باز تعداد ۱۱ تغییر تک نوکلئوتیدی معنی‌داری ($pValue < 0.04$) مشاهده شد که در مناطق BTA2، BTA3، BTA6، BTA8 (۲ تغییر تک نوکلئوتیدی)، BTA11، BTA14، BTA20، BTA28 و BTA30 (۲ تغییر تک نوکلئوتیدی) قرار داشتند (شکل ۳). نکته قابل توجه این است که اکثر تغییرات تک نوکلئوتیدی موثر بر این صفت در ارتباط معنی‌دار با IFL بوده‌اند. در مطالعه‌ای ارتباط معنی‌دار (Genom-wide 1% FDR) ۸ تغییر تک نوکلئوتیدی با صفت روزهای باز در گاو هلشتاین نشان داده شد، که همه این تغییر تک نوکلئوتیدی در منطقه BTA20 و BTA21 واقع شده‌بودند (Nayeri *et al.*, 2016). که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. همچنین در مطالعه‌ای تغییر تک نوکلئوتیدی معنی‌داری با صفت روزهای باز گزارش شد، که در منطقه BTA3، BTA4، BTA8 و BTA21 واقع شده بودند (Chen *et al.*, 2022) که با نتایج بدست آمده در این مطالعه مطابقت دارد.



شکل ۳- نمودار منتهن صفت روزهای باز، محور X مکان نشانگرها روی کروموزوم، محور Y منفی لگاریتم بر مبنای ۱۰ معیار pValue و خط قرمز رنگ نشانه آستانه معنی‌داری 10^{-4} می‌باشد

در صفت تعداد تلقیح به ازای آبستنی تعداد ۱۱ تغییر تک نوکلئوتیدی معنی‌دار ($pValue < 0.04$) مشاهده شد که در منطقه BTA2، BTA3، BTA6 (۳ تغییر تک نوکلئوتیدی)، BTA9، BTA11، BTA20، BTA21، BTA28 و BTA30 قرار داشتند (شکل ۴). که بیشترین معنی‌داری مربوط به تغییر تک نوکلئوتیدی واقع شده بر روی کروموزوم ۱۱ بود. در مطالعه‌ای، بر روی کروموزوم شماره ۱۳ و ۲۵، تعداد ۸ تغییر تک نوکلئوتیدی مشاهده شد که باصفت نرخ گیرایی (معکوس صفت تعداد تلقیح به ازای آبستنی) ارتباط معنی‌داری داشت، این تغییرات تک نوکلئوتیدی همچنین بر روی صفت نرخ باروری دختران گاو نر (DPR^{12}) اثرگذار بودند (Abdollahi Arpanahi *et al.*, 2019). که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. در گاوهای هلشتاین منطقه آمریکای شمالی ژن واقع شده‌ای در منطقه BTA3 به نام GNAIL بر روی صفت نرخ گیرایی تلیسه، نرخ گیرایی در گاو و همچنین صفت نرخ باروری دختران گاو نر (DPR) اثرگذار بود. این ژن همچنین با صفت تعداد تلقیح به ازای آبستنی (NSC) باروری گاو و روزهای باز ارتباط معنی‌داری داشت (Abdollahi Arpanahi *et al.*, 2019) که در این مطالعه نیز مشاهده شد. در دیگر مطالعات تغییرات تک نوکلئوتیدی در BTA3 (Daetwyler *et al.*, 2014)، BTA6 (Druet *et al.*, 2014)، BTA9 (Galliou *et al.*, 2020) و BTA20 (Galliou *et al.*, 2020) ارتباط معنی‌داری با این صفت داشته‌اند که با نتایج بدست آمده در این مطالعه مطابقت دارد.



شکل ۴- نمودار منتهن صفت روزهای باز، محور X مکان نشانگرها روی کروموزوم، محور Y منفی لگاریتم بر مبنای ۱۰ معیار pValue و خط قرمز رنگ نشانه آستانه معنی داری 10^{-4} می باشد

نتایج آنالیزهای post GWAS نشان داد در BTA20 در مجاورت تغییر تک نوکلئوتیدی موثر بر صفت فاصله زایش تا اولین تلقیح، ۱ QTL با صفت مرده زایی در ارتباط بود. مرده زایی از جمله عوامل موثر بر بازگشت رحم به شرایط طبیعی بوده که می تواند بر فاصله زایش تا اولین تلقیح موثر باشد. نتایج مطالعه ای نشان داد که ۵ ژن کاندیدا با عملکرد بالا که به صورت بلوک هاپلوتایپی بودند، اثر مؤثری بر مرده زایی و صفات باروری داشتند (Fonseca *et al.*, 2022). که با نتایج بدست آمده در این مطالعه مطابقت دارد. همچنین یک QTL با همبستگی بالا با صفت زاویه کپل مشاهده شد. زاویه کپل مناسب می تواند به تخلیه بهتر مواد ترشح شده بعد از زایمان و بازگشت دام به شرایط طبیعی کمک کرده و باعث کوتاهتر شدن DFS شود (Almeida *et al.*, 2017). در مطالعه ای دیگر نیز زاویه کپل ارتباط معنی داری با DFS و OD داشت (Fonseca *et al.*, 2022) که می تواند تایید کننده نتایج این مطالعه باشد.

در این مطالعه نیز چندین QTL موثر بر صفات ساختار پستان، تولید شیر در BTA20 و BTA27 در مجاورت تغییرات تک نوکلئوتیدی مرتبط با صفت DFS مشاهده شد (جدول ۱). ساختار پستان در گاو شیری از جمله مهمترین صفات در سودآوری است، زیرا هرچه پستان ساختار مناسبتری داشته باشد، تولید شیر بهتری داشته، احتمال ابتلا به عفونت پستان در دام و تعداد سلول های سوماتیک کاهش خواهد یافت. نتایج مطالعات گواهی بر ارتباط بین صفات سلامت پستان، تولید شیر (Zhou *et al.*, 2019) و صفات تولیدمثلی بوده است (Liu *et al.*, 2017).

در مجاورت تغییرات تک نوکلئوتیدی مرتبط با صفات DO, IFL و NSPC، QTLهایی مشاهده شد که با صفات وزن بدن در ارتباط هستند و می تواند گواهی بر این ادعا باشد که تلیسه در زمان تلقیح باید به وزن مطلوب خود رسیده باشد، که این وزن بسته به نژادهای مختلف متفاوت خواهد بود، به عنوان مثال در گاو نژاد برهمن گاوهای با وزن بالاتر باروری نامناسبتری داشتند (Olson, 1993). نتایج این مطالعه نشان می دهد کاهش نرخ باروری می تواند تحت تاثیر صفت باقیمانده خوراک مصرفی تحت تاثیر قرار بگیرد (Olson, 1993). بالانس منفی انرژی بر میزان انسولین تولیدی اثر گذاشته و تولید هورمون رشد را کاهش داده و در نهایت منجر به کاهش سنتز

IGF-1 کبدی خواهد شد (Fenwick *et al.*, 2008). در اطراف همین تغییر تک نوکلئوتیدی (BTA8) یک QTL با صفت باقیمانده خوراک همبستگی داشت.

در BTA6 همچنین QTL دیگری شناسایی شد که با صفت آسانزایی در ارتباط بود (Fenwick *et al.*, 2008). نتایج مطالعه‌ای نشان می‌دهد که آسان زایی در نژاد براون سوئیس تحت تاثیر وزن بدن بوده به گونه‌ای که گاوهای با وزن بالاتر بیشتر دچار سخت‌زایی شده و فاصله زایش بالاتری خواهند داشت (Guo *et al.*, 2012) که با نتایج این مطالعه مطابقت می‌نماید. در BTA20 در اطراف تغییر تک نوکلئوتیدی دیده شده، ۲ QTL مشاهده شد که با صفت مقدار شیر و عفونت پستان همبستگی داشتند (جدول ۱)، که می‌تواند نشان دهنده این مورد باشد که دام در اوج شیرواری، دیرتر آبستن شده و همچنین عفونت پستان بر صفات فاصله‌ای مورد بررسی اثرگذار است. در BTA11 در اطراف تغییر تک نوکلئوتیدی مشاهده شده در این مطالعه، یک QTL اثرگذار بر چند قلو زایی مشاهده شد. در مطالعه Widmer *et al.* (2021) در کروموزوم ۱۱، QTL های زیادی به شکل بلوک‌های هاپلوتایپی با صفات باروری و زایش ارتباط معنی‌داری داشته‌اند، همچنین گزارش شد که همبستگی بین صفات زایش و باروری با صفت چندقلوزایی منفی و نامطلوب بوده است. در BTA3 در مجاورت با تغییر تک نوکلئوتیدی معنی‌دار بر صفات OD, IFL, NSPC چند QTL مشاهده شد، که بیشتر بر صفات تولید شیر و صفات موثر بر ماندگاری (جابجایی شیردان و عفونت پستانی) اثر گذار بودند (جدول ۱)، که با نتایج Zhang *et al.* (2021) مطابقت دارد. در BTA28 یک QTL بر صفت نرخ باروری اثرگذار بود (جدول ۱). نرخ باروری حاصل ضرب نرخ گیرایی در نرخ فحل یابی است و از آنجایی که صفت نرخ گیرایی معکوس صفت تعداد تلقیح به ازای آبستنی است، پس وجود این QTL می‌تواند تأکیدی بر اثرگذاری تغییر تک نوکلئوتیدی شناسایی شده باشد. در همان حوالی QTL دیگری موثر بر تعداد فولیکول آنترال مشاهده گردید (Zhang *et al.*, 2021). در BTA6 و BTA2 در مجاورت تغییرات تک نوکلئوتیدی شناسایی شده، QTL هایی موثر بر صفات شاخص بدنی و تولید شیر یافت شد. همچنین در BTA21 و BTA6 علاوه بر QTL های موثر بر شاخص بدنی و تولید شیر، ۳ QTL با صفات باروری (سخت‌زایی، باروری تلیسه‌ها و آسان‌زایی) همبستگی داشتند. به طور کلی می‌توان گفت در مجاورت تغییرات تک نوکلئوتیدی شناسایی شد، بیشتر QTL هایی وجود دارند که با صفات تولید شیر، تولیدمثل، شاخص بدنی و سلامت همبستگی دارند (جدول ۱).

جدول ۱. QTL هایی که در نزدیک ترین فاصله با تغییرات تک نوکلئوتیدی که همبستگی معنی‌داری با صفت فاصله زایش تا اولین تلقیح (DFS)، روزهای باز (DO)، فاصله اولین و آخرین تلقیح (IFL) و تعداد تلقیح به ازای آبستنی (NSPC) هستند

Trait	SNP name	QTL trait	QTL symbol		
DFS	۲۰/۲۱۶۰۲۳۳۱	Rump angle	RANG		
		Stillbirth	SB		
		Somatic cell score	SCS		
		Dairy capacity composite index	DCCI		
		Udder attachment	UA		
		Udder width	UWDT		
		Udder height	UHT		
		Milk yield	MY		
		Milk protein percentage	PP		
		Milk fat yield	FY		
		Rump angle	RANG		
		DFS	۲۷/۴۰۱۳۱۳۱	Somatic cell count	SCC
				Milk fat yield	FY
Stature	STA				
Dystocia	DYST				
Bovine tuberculosis susceptibility	BTBS				
DO IFL	۶/۱۴۷۱۰۲۵۳	Body weight	BW		
		Milk protein yield	PY		

NSPC		Marbling score	MARBL
		Fat thickness at the 12th rib	FATTH
		Calving ease	CALEASE
DO	٢٠/٢٥٣٣٤٥٨٠	Milk yield	MY
IFL		Clinical mastitis	CM
DO	١١/٢٣٩٣٢٧	Multiple birth	TWIN
IFL		Scrotal circumference	SCRCIR
NSPC		Body weight	BW
DO	٢/٥٤٢٥٧٨٤	Somatic cell score	SCS
IFL		Abomasum displacement	AD
NSPC		Milk protein percentage	PP
		Interval from first to last insemination	INSINT
		Myristic acid content	FA-C14:0
		Milk fat yield	FY
DO	٣٠/٨٤١٠٣٤١٥	Not Available	
IFL			
DO	٣٠/١٣٤٤٢١٠١٨	Not Available	
IFL			
NSPC			
DO	٨/٣٨٢٧٢٥١٤٥	Residual feed intake	RFI
IFL			
DO	٨/٩٧٩٥٥٣١٧	Milk capric acid content	MFA-C10:0
IFL		Milk myristic acid content	MFA-C14:0
NSPC		Udder swelling score	USS
DO	٢٨/٤٠٧١٧٤٤	Pregnancy rate	PREGRATE
IFL		Udder cleft	UC
NSPC		Milk protein yield	PY
		Antral follicle number	AFOLN
DO	٢/٨٤٧٤٩٧٥	Body weight	BW
IFL		Perinatal mortality	PNMOR
IFL	٢/٤٨٧٥٠٠٤	Semitendinosus muscle weight	STMWT
NSPC		Shear force	SF
		Silverside weight	SLVWT
		Perinatal mortality	PNMOR
		Tick resistance	TICKR
		Carcass weight	CWT
		Meat-to-bone ratio	MTBR
		Bone percentage	BONEP
		Fat percentage	FATP
NSPC	٤/٤١٤٤١٤٩	Milk fat percentage	FP
		Milk alpha-S1-casein percentage	MAS1CP
		Body weight (weaning)	WWT
		Stearic acid content	FA-C18:0
		Longissimus muscle area	LMA
		Milk protein percentage	PP
		Body weight	BW
NSPC	٤/١٢٥٣٤٨٣	Milk protein yield	PY
		Calving ease	CALEASE
		Calving ease (maternal)	CALEASE
		Milk fat percentage	FP
		Body weight	BW
		Milk protein percentage	PP
NSPC	٢١/٣٣٧٩٠٩٢	Heifer pregnancy	HPG
		Body weight	BW
		Somatic cell score	SCS
		Age at puberty	PUBAGE

نتایج آنالیز هستی‌شناسی ژن^{۱۳}، تعداد ۴۹ ژن را در اطراف (Kb ۵۰۰ بالاتر از تغییر تک‌نوکلئوتیدی و Kb ۵۰۰ پایین‌تر از موقعیت تغییر تک‌نوکلئوتیدی) تغییرات تک‌نوکلئوتیدی معنی‌دار با صفات مورد مطالعه نشان داد (جدول ۲). از جمله ژن‌های مشاهده شده می‌توان به ژن ACTBL2 در BTA20 (در اطراف تغییر تک‌نوکلئوتیدی مورد نظر در همان منطقه) که بر رشد عضلات و ساختار استخوان‌ها مؤثر است اشاره نمود. در مطالعه Costa *et al.* (2015)، ژن LOC782601 در BTA27 بر صفات باروری گاو شیریه مؤثر بوده که با نتایج بدست آمده مطابقت دارد. این ژن همچنین در روند اسپرماتوژنز مؤثر بوده است (Costa *et al.*, 2015). در BTA6 ژن ELOVL6 بر متابولیسم اسیدچرب موجود در شیر و همچنین بر رشد و افزایش وزن بدن مؤثر است (Iqbal *et al.*, 2022). PITX2 ژن دیگر شناسایی شده در منطقه BTA6 بر تولید شیر اثرگذار بوده، این ژن همچنین در توسعه برخی ارگان‌های بدن از جمله غده هیپوفیز نقش دارد. علاوه بر این، ژن PITX2 بر تولید گونادوتروپین و در نهایت بر باروری اثرگذار است (Charles *et al.*, 2008). در BTA20 یک ژن به نام DAB2 یافت شد که در فرایند متابولیسم و پاسخ به محرک‌ها در چند سلولی مؤثر است (Cheng *et al.*, 2023).

در کروموزوم شماره ۱۱ در اطراف تغییر تک‌نوکلئوتیدی معنی‌دار، ژن ANAPC1 دیده شد، که بر صفات باروری گاوهای نر و جنمایی اسپرم اثرگذار است (Greither *et al.*, 2023). به طور کلی نتایج نشان داد ژن‌های مشاهده شده بر روی کروموزوم ۱۱ (ANAPC1، TMEM87B، FBLN7، LOC112448914، MERTK) بر صفات باروری مؤثر هستند. ژن NUF2 در کروموزوم ۳، اثر منفی بر تکامل سلول تخم در گاو ماده و همچنین بر تولید LH داشته است (Labrecque *et al.*, 2013). ژن NUF2 در اتصال کینه توکور، جفت شدن کروموزوم و مونتاژ دوک در فرایند تقسیم میتوز اثرگذار است (Dong *et al.*, 2020). در کروموزوم ۸، ژن IL33 در دسته ژن‌های اثرگذار بر سیستم ایمنی گزارش شد (Kommadath *et al.*, 2011)، این ژن همچنین بر هم‌کنش‌های سلولی را تسهیل نموده و از طرفی می‌تواند با اثرگذاری بر سلول‌های مغذی رفتارهای فحلی را ایجاد نماید (Kommadath *et al.*, 2011)، ژن RHO در کروموزوم ۲۸ می‌تواند بر تخم‌گذاری، طول چرخه تولیدمثلی و در نهایت بر باروری مؤثر باشد (McMullan and Nurrish, 2011). در اطراف همین ژن، ژن دیگری (OR5A51) مشاهده شد که بر صفت بویایی اثرگذار است، توسعه حس بویایی در جانوران می‌تواند جهت جلوگیری از مسمومیت و احتمالاً سقط جنین به دلیل وجود انگل، باکتری، سموم یا مواد شیمیایی موجود در جیره دام مؤثر باشد (Jang *et al.*, 2021). ژن CALCRL در منطقه BTA2، بر عملکرد سیستم ایمنی اثرگذار بوده و همچنین باعث بیماری‌های تغییر شکل لنفوی و تغییر انقباض عروق، عضله صاف، افزایش مایع بافت و تورم می‌شود (Garvey, 2018). ژن UGGT1 و دیگر ژن‌های مشاهده شده در اطراف این ژن (SAP130 و WDR33) بر عملکرد متابولیسم پروتئین و همچنین بر صفت افزایش وزن بدن مؤثر هستند (Serão *et al.*, 2013). ژن KCNIP4 و ADGRA3 در BTA6 باعث رشد و تکامل بافت‌های مختلف، از جمله عضله، چربی و استخوان شده و بر صفت وزن بدن اثرگذار هستند (Son *et al.*, 2021). بر اساس مطالعه Salilew-Wondim *et al.* (2010) ژن CAMK2D در کروموزوم ۶، با صفت تعداد تلقیح مصنوعی^{۱۴} و تکنیک‌های باروری ارتباط داشت، که با نتایج بدست آمده مطابقت دارد. در BTA21، ژن GABRB3 بر شروع و پایان شیردهی در گاو شیریه در ارتباط بود (Suárez-Vega *et al.*, 2015)، که شیرواری از جمله صفات مؤثر به تعداد تلقیح به ازای آبستنی است. نتایج نهایی و مطالعات تکمیلی نشان داد که اکثر ژن‌های مشاهده شده با صفات مورد مطالعه در ارتباط یا اثرگذار بوده‌اند (جدول ۲).

جدول ۲. ژن‌های کاندیدا یا نزدیک‌ترین (IMB) ژن‌های اطراف SNPs مرتبط با صفت فاصله زایش تا اولین تلقیح (DFS)، روزهای باز (DO)، فاصله اولین و آخرین

تلقیح (IFL) و تعداد تلقیح به ازای آبستنی (NSPC)

Trait	SNP name	SNP position	Ensembl gene ID	Gene start	Gene end	Gene name
DFS		۲۱۴۰۲۲۳۱	ENSBTAG00000051426	۲۱۸۲۳۴۷۸	۲۱۸۲۳۳۹۰	MIR2285F-2

¹³ Gene ontology

¹⁴ Artificial Insemination

	20/21402231		ENSBTAG00000046468	21199446	211998316	ACTBL2
DFS	27/4013131	4013131	ENSBTAG00000048648	4284458	4284678	LOC782601
DO	6/14710253	14710253	ENSBTAG00000049611	15159225	15159369	LOC112447187
IFL			ENSBTAG00000010564	15199666	15360477	ELOVL6
NSPC			ENSBTAG00000044354	15046306	15046613	LOC112447232
			ENSBTAG00000008332	14912679	14992464	ENPEP
DO	20/25334580	25334580	ENSBTAG00000009059	14831302	14851254	PITX2
IFL			ENSBTAG00000016152	25003821		DAB2
					25062931	
			ENSBTAG00000016149	25077205	25144035	C9
			ENSBTAG00000043592	24850899	24851077	U2
DO	11/2393227	2393227	ENSBTAG00000043758	24893222	24893418	5S_rRNA
IFL			ENSBTAG00000045153	502247	503380	LOC112448914
NSPC			ENSBTAG00000009230	245530	202203	FBLN7
			ENSBTAG00000005828	280816	516486	MERTK
			ENSBTAG00000027991	528774	626099	ANAPC1
			ENSBTAG00000012099	219215	261708	TMEM87B
DO	2/5635786	5635786	ENSBTAG00000007247	5960360	5998691	NUF2
IFL						
NSPC						
DO	20/86103415	86103415	ENSBTAG00000005042	85929321	85929826	SYN1
IFL			ENSBTAG00000016772	85604710	85619691	USP11
			ENSBTAG00000005039	85918875	85943558	ARAF
			ENSBTAG00000002113	8577092	85773115	ZNF41
DO	20/136621018	136621018	ENSBTAG00000038589	8521574	8528770	ZNF157
IFL			ENSBTAG00000042737	136660405	136660506	LOC112445214
NSPC			ENSBTAG00000027841	136366606	136696634	NLGN4X
DO	8/28725165	28725165	ENSBTAG00000012168	28675449	28678766	RANBP6
IFL			ENSBTAG00000020815	28320192	28392701	UHRF2
			ENSBTAG00000047550	28683243	28791351	KIAA2026
			ENSBTAG00000025903	28219989	28208310	GLDC
			ENSBTAG00000011160	28427521	28440175	TPD52L3
DO	8/97955317	97955317	ENSBTAG00000018347	28472459	28566405	IL33
IFL			ENSBTAG00000048201	98008208	98008315	U6-201
NSPC						
DO	14/79972473	79972473	Not Available			
IFL						
NSPC						
DO	28/4071766	4071766	ENSBTAG00000018691	697339	706882	RHO
IFL						
NSPC			ENSBTAG00000011707	227515	228453	OR5AS1
DO	2/8476975	8476975	ENSBTAG00000008483	8891734	9020442	CALCRL
IFL			ENSBTAG00000049919	8776893	8875333	TFPI
			ENSBTAG00000042939	7996304	7996608	LOC112443605
IFL	2/4875004	4875004	ENSBTAG00000008089	460102	462102	AMMECR1L
NSPC			ENSBTAG00000005987	4676998	4785534	WDR33
			ENSBTAG00000053244	4623473	4636767	POLR2D
			ENSBTAG00000005444	430416	4299011	UGGT1
			ENSBTAG00000006003	4454874	453094	SAP130
NSPC	6/4166149	4166149	ENSBTAG00000004653	41984735	42116814	ADGRA3
			ENSBTAG00000047743	4025033	41576485	KCNIP4
NSPC	6/12534883	12534883	ENSBTAG00000014463	1180357	12107600	CAMK2D
NSPC	21/2379092	2379092	ENSBTAG00000013422	2866347	4146641	GABRB3
			ENSBTAG00000043450	2920775	2920877	LOC112443372
			ENSBTAG00000027081	2758172	2940408	ATP10A

نتیجه گیری

این مطالعه با هدف شناسایی تغییرات تک نوکلئوتیدی موثر بر صفات تولیدمثلی در گاوهای هلشتاین ایران انجام گرفت و در نهایت منجر به شناخت ۲ تغییر تک نوکلئوتیدی معنی‌داری برای هر یک از صفت فاصله زایش تا اولین تلقیح (DFS)، روزهای باز (DO)، فاصله اولین و آخرین تلقیح (IFL) و تعداد تلقیح به ازای آبستنی (NSPC) مورد مطالعه گردید. در صفت فاصله اولین و آخرین تلقیح و روزهای باز تعداد زیادی از تغییرات تک نوکلئوتیدی مشترک بودند که می‌تواند ناشی از ساختار مشابه ژنتیکی هر دو صفت باشد. در حاشیه تغییرات تک نوکلئوتیدی شناسایی شده، بیشتر QTL‌هایی وجود دارند که با صفات تولید شیر، تولیدمثل، شاخص بدنی و سلامت همبستگی دارند. به نظر می‌رسد کروموزوم شماره ۳، ۶ و ۱۱ اثر مهم‌تری بر صفات تولیدمثلی داشته‌است. نتایج هستی‌شناسی ژن همچنین نشان دهنده وجود ژن‌های مشابهی در اطراف تغییرات تک نوکلئوتیدی شناسایی شده بود، که هر یک از این ژن‌ها می‌تواند به خودی خود مورد مطالعه قرار گیرد. از جمله این ژن‌ها می‌توان به ژن NUF2 در کروموزوم ۳ که بر تکامل سلول تخم، ژن ANAPC1 در کروموزوم ۱۱ که بر جنبانی اسپرم، ژن PITX2 در کروموزوم ۶ که بر تولید شیر، ژن ELOVL6 در کروموزوم ۶ که بر افزایش وزن بدن، ژن CAMK2D در کروموزوم ۶ با صفت تعداد تلقیح مصنوعی و تکنیک‌های باروری موثر است اشاره نمود.

منابع

- 1- Abdollahi-Arpanahi, R., Carvalho, M. R., Eduardo, S., Ribeiro, E. S. & Francisco Peñagarican, F. (2019). Association of lipid-related genes implicated in conceptus elongation with female fertility traits in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 102, 10020–10029
- 2- Ahlman, T., Berglund, B., Rydhmer, R. & Strandberg, E. (2011). Culling reasons in organic and conventional dairy herds and genotype by environment interaction for longevity. *Journal of Dairy Science*, 94, 1568–1575.
- 3- Almeida, T. P., Kern, E. L., Daltro, D. D., Neto, J. B., McManus, C., Neto, A. T. & Cobuci, J. A. (2017) Genetic associations between reproductive and linear-type traits of Holstein cows in Brazil. *Brazilian Journal of Animal Science*, 46, 91–98.
- 4- Bordbar, F., Mohammadabadi, M., Jensen, J., Xu, L., Li, J. & Zhang, L. (2022). Identification of candidate genes regulating carcass depth and hind leg circumference in simmental beef cattle using Illumina Bovine Beadchip and next-generation sequencing. *Animals*, 12, 1103-1116.
- 5- Brooks, M. A., DePristo, R. M., Durbin, R. E., Handsaker, H. M., Kang, G., Marth, T., & McVean, G. A. (2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*, 491, 56–65.
- 6- Charles, M. A., Amanda, Y., Mortensen H., Mary Anne Y., Potok, Y. & Camper, S. A. (2008). Pitx2 Deletion in Pituitary Gonadotropes is Compatible with Gonadal Development, Puberty, and Fertility. *Genesis*, 46, 507–514.
- 7- Chen, S. Y., Schenke, F. S., Melo, A. L. P., Oliveira, H. R., Pedrosa, V. B., Araujo, A. C., Melka, M. G., & Brito, L. F. (2022). Identifying pleiotropic variants and candidate genes for fertility and reproduction traits in Holstein cattle via association studies based on imputed whole-genome sequence genotypes. *BMC Genomic*, 23, 331-356.
- 8- Cheng, Z., McLaughlin, D. L., Little, M. W., Ferris, C., Salavati, M., Ingvarsten, K. L., Crowe, M. A. & Wathes, D. C. (2023). the GplusE Consortium. Proportion of concentrate in the diet of early lactation dairy cows has contrasting

- effects on circulating leukocyte global transcriptomic profiles, health and fertility according to parity. *International Journal of Molecular Science*, 24, 39-52
- 9- Costa, R. B., Camargo, G. M.F., Diaz, I. D., Irano, N., Dias, M. M., Carvalheiro, R., Boligon, A. A., Henrique F. B., Tonhati, O. H. & Albuquerque, L. G. (2015). Genome-wide association study of reproductive traits in Nellore heifers using Bayesian inference. *Genetics Selection Evolution*, 2015, 47:67.
- 10- Daetwyler, H. D., A. Capitan, H. Pausch, P. Stothard, R. Van Binsbergen, R. F. Brøndum, X. Liao, A. Djari, S. C. Rodriguez., & C. Grohs. (2014). Whole-genome sequencing of 234 bulls facilitates mapping of monogenic and complex traits in cattle. *Nature Genetics*, 46, 858–865.
- 11- Dong, W. S., Liu P. F., Liu, Y., Du, Y., Bi, Y. H & Zhou, G. H. (2016). Immunocytochemical localization of the kinetochore protein Nuf2p on the gametophyte chromosomes of a cultivar of saccharina (Phaeophyta). *Frontiers in Marine Science*, 7, 539260
- 12- Druet, T., I. Macleod, & B. Hayes. (2014). Toward genomic prediction from whole-genome sequence data: Impact of sequencing design on genotype imputation and accuracy of predictions. *Heredity*, 112, 39–47.
- 13- Fenwick, M. A., Fitzpatrick, R., Kenny, D.A., Diskin, M.G., Patton, J., Murphy, J. J. & Wathes, D. C. (2008) Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology*, 34, 31–44.
- 14- Fonseca, P. A. S., Schenkel, F. S., & Cánovas, A. (2022). Genome-wide association study using haplotype libraries and repeated-measures model to identify candidate genomic regions for stillbirth in Holstein cattle. *American Dairy Science*. 105, 1314–1326
- 15- Galliou, J. M., Kiser, J. N., Oliver, K. F., Seabury, C. M., Moraes, J. G., Burns, G.W. (2020). Identification of loci and pathways associated with heifer conception rate in US Holsteins. *Genes (Basel)*, 11, 767-787
- 16- Garvey, M. (2018). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis: a possible causative agent in human morbidity and risk to public health safety. *Open Veterinary Journal*. 8, 172–181.
- 17- Giasi, H., Pakdel, A., Nejati-Javaremi, A., Mehrabani-Yeganeh, H., Honarvar, M., Gonzales-Ricio, O., Carabano, M.J. & Alend, R. (2011). Genetic variance component for female fertility in Iranian Holstein. *Livestock Science*, 139, 277-280.
- 18- Greither, T., Behre, H. M. & Herlyn, H. (2023). Genome-wide association screening determines eripheral players in male fertility maintenance. *International Journal of Molecular Science*, 24, 524-539.
- 19- Guo, J., Jorjani, H. & Carlborg, Ö. A. (2012) genome-wide association study using international breeding-evaluation data identifies major loci affecting production traits and stature in the Brown Swiss cattle breed. *BMC Genetic*. 2012, 13-82.
- 20- Hammoud, M.H., El-Zarkouny, S.Z. & Oudah, E.Z.M. (2010). Effect of sire, age at first calving, season and year of calving and parity on reproductive performance of Friesian cows under semiarid conditions in Egypt. *Archive Zoot*, 13, 60-82.
- 21- Høglund, J.K., Sahana, G., Guldbandsen, B & Lund, M.S. (2014). Validation of associations for female fertility traits in Nordic Holstein, Nordic Red and Jersey dairy cattle. *BMC Genetic*, 15, 8-15.
- 22- Iqbal, A., Ziyi, P., Yu, H., Jialing, L., Haochen, W., Jing, F., Ping, J. & Zhihui, Z. (2022). C4BPA: A novel co-regulator of immunity and fat metabolism in the bovine mammary epithelial cells. *Frontiers in Genetics*, 31, 1-16.
- 23- Jalil Sarghale, A., Moradi Shahrehabak, M., Moradi Shahrehabak, H., Nejati Javaremi, A., Saatchi, M., Khansefid, M., & Miar, Y. (2020) Genome-wide association studies for methane emission and ruminal volatile fatty acids using Holstein cattle sequence data. *BMC Genetic*, 21, 129-143.
- 24- Jang, J., Terefe, E., Kim, K., Lee, Y. H., Belay, G., Tijjani, A., Han, J. L., Hanotte, O., & Kim, H. (2021). Population differentiated copy number variation of *Bos taurus*, *Bos indicus* and their African hybrids. *BMC Genomics*, 22, 531-542.
- 25- Kandel, P., Vanderick, S., Vanrobays, M. L., Vanlierde, A., Dehareng, F. & Froidmont, E., (2014). Consequences of selection for environmental impact traits in dairy cows. Vancouver: *Proceedings of the 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*; 2014.
- 26- Kommadath, A., Woelders, H., Beerda, B., Mulder, H. A., Wit, A.C., Veerkamp, R. F., Pas S. W. & Smits, M. A. (2011). Gene expression patterns in four brain areas associate with quantitative measure of estrous behavior in dairy cows. *BMC Genomics*, 12: 200-210.
- 27- Liu, A., Wang, Y., Sahana, G., Zhang, Q., Liu, L., Lund, M. S., & Su, G. (2017). Genome-wide association studies for female fertility traits in Chinese and Nordic Holsteins. *Scientific Reports*, 7, 8487-8499.
- 28- McMullan, R. & Nurrish, S.J. (2011) The RHO-1 RhoGTPase modulates fertility and multiple behaviors in adult Cow. *elegans. PLoS ONE* .6(2): e17265

- 29- Mohammadi, A., Alijani, S., Rafat, S. A. & Abdollahi-Arpanahi, R. (2020). Genome-wide association study and pathway analysis for female fertility traits in Iranian Holstein cattle. *Annals of Animal Science*, 20,825–851.
- 30- Moradi, M. H., Nejati-Javaremi, A., Moradi-Shahrbabak, M., Dodds, K. G. and McEwan, J.C. (2012). Genomic scan of selective sweeps in thin and fat tail sheep breeds for identifying of candidate regions associated with fat deposition. *BMC Genetics*, 13,10-25.
- 31- Muller, C.J.C., Potgieter, J.P., Cloete, S.W.P. and Dzama, K. (2014). Non genetic factors affecting fertility traits in South African Holstein cow. *South African Journal of Animal Science*, 44,54-65.
- 32- Nayeri, S., Sargolzaei, M., Abo-Ismael, M.K. & May, N. (2016). Genome-wide association for milk production and female fertility traits in Canadian dairy Holstein cattle. *BMC Genetic*, 17, 75-87.
- 33- Olson, T. A. (1993) Reproductive efficiency of cows of different sizes. Available from: http://animal.ifas.ufl.edu/beef_extension/bcsc/1993/docs/olson.pdf
- 34- Sahana, G., Guldbrandtsen, B., Bendixen, C. & Lund, M.S. (2010). Genome-wide association mapping for female fertility traits in Danish and Swedish Holstein cattle. *Animal Genetic*, 41,579–588.
- 35- Sahana, G., Guldbrandtsen, B., Thomsen, B., Holm, L-E, Paniz, F., brondum, R.F., Bendixen, C. & Lund, M.S. (2014). Genome-wide association study using high-density single nucleotide polymorphism arrays and whole-genome sequences for clinical mastitis traits in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 97, 7258-7275.
- 36- Salilew-Wondim, D., Holker, M., Rings, F., Ulas-Cinar, M., Peippo, J., Tholen, E., Looft, C., Schellander, K. & Tesfaye, D. (2010) Bovine pretransfer endometrium and embryo transcriptome fingerprints as 2 predictors of pregnancy success after embryo transfer. *Physiol Genomics*. doi:10.1152/physiolgenomics.00047.2010
- 37- Serão, N.V.L., González-Peña, D., Beever, J. E., Bollero, G.A., Southey, B. R. & Faulkner, D.B. (2013). Bivariate genome-wide association analysis of the growth and intake components of feed efficiency. *PLoS One*. 8,78530.
- 38- Son, H., Park, M.R., Kim, N., Jang, G.W. & Park J. E. (2021). Genome-wide association study identifies 12 loci associated with body weight at age 8 weeks in korean native chickens. *Genes*, 12, 1170-1183
- 39- Suárez-Vega, A., Gutiérrez-Gill, B., Klopp, C., Robert-Granie, C., Tosser-Klopp, G & JoséArranz, J. (2015). Characterization and comparative analysis of the milk transcriptome in two dairy sheep breeds using RNA sequencing. *Scientific Reports*, 10, 1038-1049.
- 40- Van den Berg, I., Boichard, D. & Lund, M. S. (2016). Comparing power and precision of within-breed and multi breed genome wide association studies of production traits using whole-genome sequence data for 5 French and Danish dairy cattle breeds. *Journal of Dairy Science*, 99, 8932-8945.
- 41- Widmer, S., Seefried F. R., Rohr, P. v., Häfiger, I. M., Spengeler, M., & Drögemüller, C. (2021). A major QTL at the LHCGR/FSHR locus for multiple birth in Holstein cattle. *Genetic Selection Evolution*. 2021, 53-57.
- 42- Zhang, H., Liu, A., Wang, Y., Luo, H., Yan, X., Guo, X., Li, X., Liu, L. & Su, G. (2021). Genetic Parameters and Genome-wide association studies of eight longevity traits representing either full or partial lifespan in chinese holsteins. *Journal of Frontiers in Genetics*.25, 1-12.
- 43- Zhang, Q., Guldbrandtsen, B., Thomasen, J. R., Lund, M. S. & Sahana, G. (2016). Genome-wide association study for longevity with whole-genome sequencing in 3 cattle breeds. *Journal of Dairy Science*, 99, 7289-7298.
- 44- Zhou, C., Li, C., Cai, W., Liu, S., Yin, H., Shi, S., Zhang, Q. & Zhang, S. (2019). Genome-wide association study for milk protein composition traits in a Chinese Holstein population using a single-step approach. *Frontiers in Genetic*, 10, 72-84.

Abstract

Introduction

The main goal in dairy industry is to achieve maximum profitability and the goal of animal breeding is to increase the economic efficiency of the system. Today, with vast advances in the field of molecular methods and the identification of a large number of genetic markers, including Single Nucleotide Polymorphic (SNP) markers, livestock breeders can investigate and find QTLs affecting these traits with higher accuracy. Genome-Wide Association Studies (GWAS) as a procedure might be used to find loci correlated with reproductive traits in Iranian Holstein cows.

Materials and methods

For this purpose, the hair samples of 150 cattle, born between 2012-2014 in one of the cattle farms of Ferdous Pars company, were used for genotyping based on 30.108 SNPs chip. The data were analyzed using the least square variance analysis method using the GLM. GWAS analysis was performed after controlling the quality of the data.

Results and Discussion

The results showed that 2 SNPs associated with the Days to first services and 12 SNPs associated with Interval from First to Last Insemination ($p < 0.04$). 11 SNPs in the Days Open and 5 SNPs for the Number of Services per Conception showed significant correlation ($p < 0.04$) with these traits. In the Post-GWAS stage, some Quantitative Trait Loci and various genes were identified that affected or controlled the traits. QTLs, were observed near the SNPs related to IFL, DO and NSPC traits, they are related to body weight traits. So the heifer must have reached optimal weight at insemination time. In BTA20, near the SNP association on day to the first insemination, 1 QTL was associated with the stillbirth trait and 1 QTL with high correlation Rump angle trait was observed. Stillbirth and suitable Rump angle can be effective in returning the uterus to normal conditions and improving reproductive traits. Several QTLs affected on mamma structure traits (Udder width, Udder attachment, Udder height), milk production (Milk yield, Milk fat percentage) were observed in BTA20 and BTA27 in the vicinity of SNPs related to DFS traits. So in the near the SNPs identified, there are most QTLs that are correlated with milk production, reproduction, physical index and health traits. Out of the related genes, RHO gene on chromosome 28 is effected on ovulation, the length of the reproductive cycle and fertility. CAMK2D gene in chromosome 6 was related to the number of insemination per conception and fertility techniques. In BTA21, GABRB3 gene was related to the beginning and end of lactation in cows, and lactation is one of the effective traits for the number of inseminations per conception. NUF2 gene on chromosome 3 that affects the development of the oocyte, ANAPC1 gene on chromosome 11, which affects sperm motility, PITX2 gene in chromosome 6, affected on milk production, ELOVL6 gene in chromosome 6 affects increases body weight, CAMK2D gene in chromosome 6 is effective artificial insemination number trait and fertility techniques.

Conclusion

it can be concluded that chromosomes 3, 6 and 11 have SNPs that are more strongly related to reproductive traits.

Key word: *Days open, Day to first insemination, interval from first to last insemination*