

پویش ژنوم و post GWAS در برخی صفات تولیدمثلی در تلیسه‌های

هلستاین ایران

GWAS and post GWAS in some reproductive traits in Iranian Holstein heifers

مصطفی صادقی^{۱*}، نرگس مداحی^۱، اردشیر نجاتی جوارمی^۱، سید رضا میرایی آشتیانی^۱، علی جلیل سرقله^۱

^۱ - به ترتیب دانشیار، دانشجوی دکتری، استاد، دانش آموخته دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، دانشگاه تهران، تهران، ایران

Sadeghi M^{*1}, Maddahi N¹, Nejati-javaremi A¹, Miraei Ashtiani SR¹, Jalil Sarghale A¹

1- Associate Professor, PhD Student, Professor, Professor, PhD Graduate,
Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources,
University of Tehran, University of Tehran, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sadeghimos@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۰۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۷)

چکیده

بهبود صفات تولیدمثلی علاوه بر تأثیری که بر روی تولیدمثل گله دارند، می‌توانند بر هزینه‌های درمان و دامپزشکی، رفاه حیوان و از همه مهم‌تر بر سودآوری مؤثر باشند. در حالی که امروزه مشکلات تولیدمثلی از جمله دلایل اصلی عدم سودآوری در گله‌های گاو شیری می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه پویش کل ژنوم (GWAS) صفات سن اولین تلقیح (AFS) و سن اولین زایش (AFC) و تعداد تلقیح به ازای آبستنی در تلیسه‌ها هلستاین بود، که به منظور انجام این مطالعه از رکورد ۱۵۰ راس تلیسه که بین سال‌های ۱۳۹۲-۱۳۹۰ متولد شده بودند بر اساس ارزش اصلاحی تولید شیر استفاده شد. نتایج نشان داد برای صفت سن اولین تلقیح ۵ SNP معنی‌دار بود ($p\text{Value} < 0.04$) که به ترتیب در مناطق BTA15(2), BTA5(2), BTA3(2), BTA28, BTA23, BTA21 و BTA30 مشاهده شد. برای صفت سن اولین زایش تعداد ۱۰ SNP همبستگی بالایی ($p\text{Value} < 0.04$) داشته، که به ترتیب در مناطق BTA15 (2), BTA5 (2), BTA3 (2), BTA21 و BTA28, BTA30 مشاهده شد و ۱۱ SNP برای صفت تعداد تلقیح به ازای آبستنی همبستگی بالایی ($p\text{Value} < 0.04$) داشته و توانستند بالاتر از خط آستانه معنی‌داری قرار بگیرند که در BTA11, BTA8, BTA28, BTA6(5), BTA13, BTA18 و BTA14 واقع شده بودند. QTL‌های شناسایی شده در حواشی SNP‌های معنی‌دار، با صفت وزن بدن، سخت‌زایی، اندازه وزن گوساله و سن بلوغ تلیسه در ارتباط بود. در نهایت QTL‌های شناسایی در حواشی SNP‌های معنی‌دار تأیید کننده این واقعیت است که سن اولین تلقیح و سن اولین زایش می‌تواند بر صفات تولیدی، تولیدمثلی، طول عمر و در نهایت بر سودآوری گله مؤثر باشد در این شرایط می‌توان گفت مدیریت گله نقش به‌سزایی در پیشبرد اهداف اصلاحی دارد.

واژه‌های کلیدی

تعداد تلقیح به ازای آبستنی
تولیدمثل
سن اولین تلقیح
سن اولین زایش
GWAS

مقدمه

بهبود صفات تولیدمثلی علاوه بر تأثیری که بر روی تولیدمثل گله دارند، می‌توانند بر هزینه‌های درمان و دامپزشکی، رفاه حیوان و از همه مهم‌تر بر سودآوری مؤثر باشند. در حالی که امروزه مشکلات تولیدمثلی از جمله دلایل اصلی عدم سودآوری در گله‌های گاو شیری می‌باشد، از این رو توجه به صفات تولیدمثلی از اهمیت بالایی برخوردار است. افت راندمان تولیدمثلی در سال‌های گذشته در برخی از مطالعات مشاهده شده است، تحقیقات نشان می‌دهند که نرخ مرده‌زایی و مرگ و میر در گاوها به‌ویژه در نژادهای شیری رو به افزایش است (Mc-Connel et al. 2008). این موضوع نه تنها موجب افزایش نگرانی در مورد سلامت و آسایش حیوانات، بلکه باعث تحمیل خسارت اقتصادی فراوان به صنعت گاو شیری شده است. بنابراین باید اهمیت باروری در برنامه‌های اصلاح نژاد بیشتر مورد توجه قرار گیرد. اما در کشورهای توسعه یافته بهبود ژنتیکی صفات تولیدمثلی در دام در نیمه دوم قرن بیستم با استفاده از شجره نامه و داده‌های عملکرد به‌ویژه در جمعیت گاوهای شیری بسیار موفق بوده است. سن اولین تلقیح^۱ (AFS) از جمله صفات اثرگذار در بهبود شرایط اقتصادی گله است، زیرا تعداد زایش‌ها در طول عمر اقتصادی گاو افزایش یافته و این باعث افزایش سود اقتصادی می‌شود. در حقیقت کاهش سن اولین تلقیح روزهای غیر تولیدی را کاهش می‌دهد. سن اولین زایش^۲ (AFC) از مهم‌ترین عوامل در بازگشت سرمایه و کاهش هزینه‌های گوساله جایگزین در گله است. کاهش سن در هنگام اولین زایش هزینه نگهداری (تغذیه، بهداشت و غیره) را کاهش می‌دهد. تعداد تلقیح به ازای آبستنی^۳ از جمله عوامل مهم بیانگر وضعیت عملکرد تولیدمثلی یک گله است، این عامل به‌طور مستقیم و غیرمستقیم، میانگین تعداد زایش در گله، هزینه‌های تلقیح، درآمد حاصل از گوساله‌های متولد شده، جایگزینی و حذف غیراختیاری، ترکیب سنی گله، فاصله نسل، شدت انتخاب و صحت انتخاب مؤثر است. همچنین تلیسه‌ها به دلیل باروری بهتر نیازمند تعداد تلقیح کمتری به ازای آبستنی هستند (Mc-Connel et

¹ Age at first Insemination² Age at first calving³ Number of services per conception

al. 2008). این مساله می‌تواند ناشی از عدم تأثیر تولید شیر بر باروری باشد. معکوس تعداد تلقیح به ازای آبستنی را نرخ گیرایی نامیده می‌شود. افزایش یک درصد نرخ گیرایی سود سالیانه را ۱/۲۲ یورو افزایش می‌دهد (Sorensen JT and Ostergaard 2003). نرخ گیرایی همبستگی فنوتیپی بالایی با باروری دارد و بهبود این صفت می‌تواند نرخ آبستنی را افزایش دهد (Sorensen JT and Ostergaard 2003). در طی سال‌های گذشته مطالعات بسیاری بر روی شناسایی جایگاه‌های کمی مؤثر (QTLs) بر صفات مختلف در گاوشیری صورت گرفته است که سبب شناسایی تعداد زیادی QTL برای این صفات بر روی کروموزوم‌های مختلف شده است. ظهور فناوری‌های توالی‌یابی جدید فرصتی تازه برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با ژن‌های مهم اقتصادی و صفات تولیدمثلی پدید آورده است که پویش کل ژنوم^۴ (GWAS) با هدف یافتن محتمل‌ترین نقاط مرتبط ژنومی کنترل‌کننده صفات کمی، یکی از راهبردهای کارآمد برای یافتن ژن‌های کاندیدا و نشانگرهای مرتبط با صفات کمی است. هدف از انجام این مطالعه بررسی SNP‌های مؤثر بر صفات تولید مثلی در تلیسه‌های هلشتاین ایران و همچنین بررسی QTL‌های حواشی این SNP‌ها بود.

مواد و روش‌ها

به‌منظور انجام این پروژه از رکورد ۱۵۰ رأس تلیسه که بین سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۹۲ متولد شده بودند استفاده شد. که در مرحله اول گاوها بر اساس ارزش اصلاحی صفت تولید شیر از بزرگ به کوچک مرتب شده و در مرحله بعد ۷۵ رأس گاو دارای بالاترین ارزش اصلاحی و ۷۵ رأس با کمترین ارزش اصلاحی انتخاب شده بود.

سپس کارت موی ۱۵۰ حیوان جهت ژنوتایپینگ برای شرکت GeenSeek در کشور آمریکا فرستاده شد. به‌طوری که ۱۵۰ حیوان مربوط با GGP-LD v4 SNP panel (حاوی ۳۰/۱۰۸ SNP) ژنوتایپ شد (Jalil Sarghale et al. 2020). جهت کنترل کیفیت ژنوتایپینگ از چهار معیار در نرم‌افزار PLINK 2.0 استفاده شد که

⁴ Genome-Wide Association Studies

جهت انجام آنالیزهای Post-GWAS و بررسی QTLهای گاوی در حاشیه ۱MB که در همبستگی با SNPهایی معنی دار بر صفات مورد مطالعه بودند، از (www.animalgenome.org/cgibin/QTLdb/BT/index) استفاده شد.

نتایج و بحث

به طور کلی میانگین سن اولین تلقیح در این مطالعه ۱۵/۱ ماه بوده. برای صفت سن اولین تلقیح ۵ SNP همبستگی بالایی ($p\text{Value} < 0.04$) را نشان دادند. که در مناطق BTA5، BTA13(2)، BTA21 و BTA23 واقع شده بودند (شکل ۱). یک SNP در منطقه BTA29 مؤثر بر این صفت در گاو نژاد برون سوئیس گزارش نمودند (Frischknecht et al. 2017). در حاشیه SNP شناسایی شده در BTA5، یک QTL بر صفت وزن بدن و دیگری بر زاویه کپل مؤثر بود، وزن بدن از جمله شاخصهای اثر گذار بر انتخاب تلیسه‌ها جهت انجام اولین تلقیح می‌باشد. در BTA13، QTLهایی مشاهده شد که بر صفات زنده‌مانی گوساله، آسان‌زایی و اندازه گوساله مؤثر است. همچنین در BTA21، QTLهایی مشاهده شد که بر صفت آسان‌زایی، وزن لاشه، اتصالات و عمق پستان، طول سر پستانک و صفات تیپ اثرگذار بوده است.

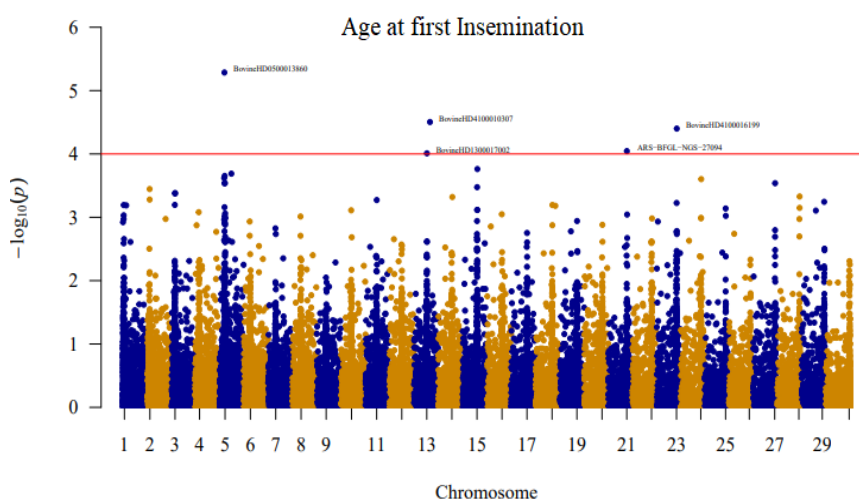
شامل: Animal call rate: در این معیار حیوانات با بیش از ۵ درصد ژنوتایپ از دست رفته حذف می‌شوند، فراوانی آللی کمیاب (MAF): SNPهایی با MAF کمتر از ۲ درصد حذف می‌شوند. SNP call rate: SNPهایی که برای بیش از ۵ درصد حیوانات ژنوتایپ نشده حذف می‌شوند. تعادل هاردی-واینبرگ: چون در طی ژنوتایپینگ ممکن است بعضی از ژنوتایپ‌های هتروزیگوت در اثر عدم خوانش درست به عنوان ژنوتایپ هموزیگوت خوانده می‌شوند، تا جایگاه‌های یا عدم خوانش صحیح حذف شود.

جهت شناسایی عوامل ثابت مؤثر بر صفات تولیدمثلی در GWAS، داده‌ها با استفاده از روش تجزیه واریانس حداقل مربعات با استفاده از رویه (Generalized Linear Model) GLM در نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ مورد آنالیز قرار گرفت. معادله مورد استفاده در GWAS به صورت زیر است (۱):

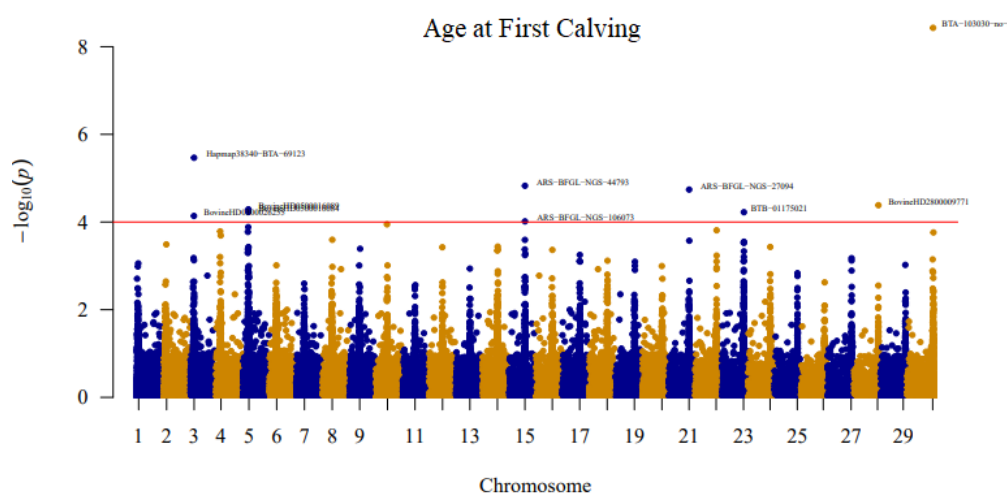
$$y = X\beta + Zu + e$$

در این مدل y بردار مشاهدات، X ماتریس ضرایب برای عوامل ثابت شامل میانگین، کورایت‌ها و اثرات SNP می‌باشد، β بردار اثرات ثابت، Z ماتریس ضرایب اثرات تصادفی ژنتیک افزایشی، u بردار اثرات تصادفی ژنتیکی افزایشی و e بردار اثرات باقی‌مانده می‌باشد.

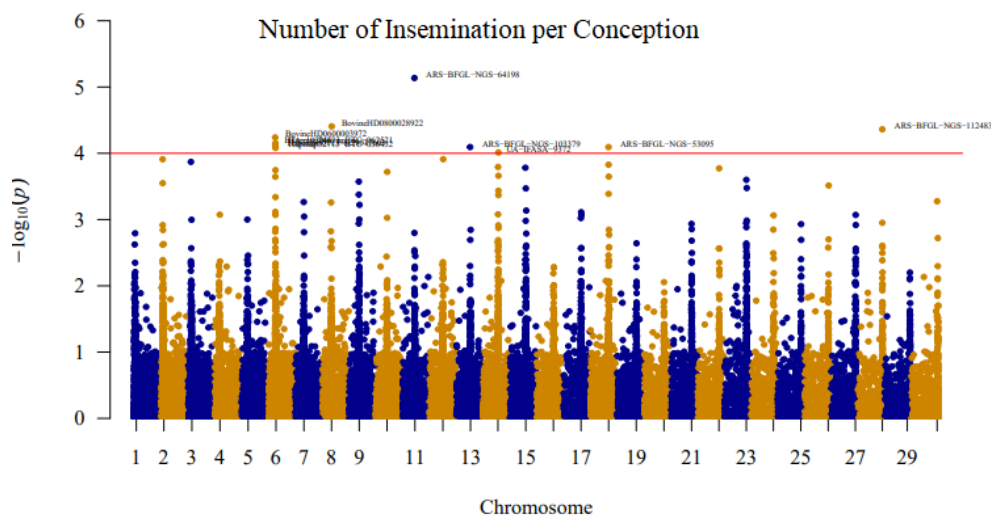
¹ Minor Allele Frequency



شکل ۱- نمودار منتهن صفت سن در اولین تلقیح، محور X مکان نشانگرها روی کروموزوم، محور Y منفی لگاریتم بر مبنای ۱۰ معیار Pvalues و خط قرمز رنگ نشانه آستانه معنی داری 10^{-4} می‌باشد.



شکل ۲- نمودار منهن صفت سن در اولین زایش، محور X مکان نشانگرها روی کروموزوم، محور Y منفی لگاریتم بر مبنای ۱۰ معیار Pvalues و خط قرمز رنگ نشانه آستانه معنی داری 10^{-4} می باشد.



شکل ۳- نمودار منهن صفت تعداد تلقیح به ازای آبستنی محور X مکان نشانگرها روی کروموزوم، محور Y منفی لگاریتم بر مبنای ۱۰ معیار Pvalues و خط قرمز رنگ نشانه آستانه معنی داری 10^{-4} می باشد.

هلاشتاین انجام گرفت مشخص شد که ۱۹ SNP بر روی صفت سن در اولین زایش مؤثر بودند که اکثر این SNPها در منطقه BTA13 واقع شده بودند. گروهی از ژنهایی که بر این صفت مؤثر بودند بر روی صفات دیگر از جمله ستر پروتئین و انتقال پروتئین، ذنجیره انتقال پروتئین و رشد استخوانها اثر گذار بوده و به عبارتی همبستگی بالایی با این صفت مجموع این موارد می تواند بر صفت سن در اولین زایش مؤثر باشند همچنین ژنهایی که بر صفاتی از جمله چرخه فعلی، گیرایی و آبستنی مؤثر هستند می توانند به طور مستقیم این صفت را تحت تأثیر قرار

در BTA21 یک QTL بر صفت آسانزایی اثرگذار بوده. به طور کلی و به صورت تجربی وزن بدن تلیسه، شرایط امتیاز بدنی (BCS)، اندازه گوساله، زاویه کپل و سن در اولین تلقیح می تواند بر صفت آسانزایی مؤثر باشد. نتایج مطالعه ای گواه بر همبستگی ژنتیکی متوسط بین صفات آسانزایی، وزن تولد و زنده ماندی جنین بود (Junior et al, 2021). برای صفت سن در اولین زایش (AFC) تعداد ۱۰ SNP که به ترتیب در مناطق BTA3(2)، BTA30، BTA21، BTA23، BTA28، BTA5(2)، BTA15(2) مشاهده شد (شکل ۲). در مطالعه ای که بر روی تلیسه های

صفات تولیدی، تولیدمثلی، طول عمر و در نهایت بر سودآوری گله مؤثر باشد در این شرایط می‌توان گفت مدیریت گله نقش به‌سزایی در پیشبرد اهداف اصلاحی دارد.

میانگین تعداد تلقیح به ازای آبستنی در تلیسه‌های مورد بررسی ۲/۶۱ بود که کمی بالاتر از میانگین مشاهده شده در سایر مطالعات می‌باشد. زیرا از آنجایی که تلیسه‌ها تحت تأثیر شیردهی نمی‌باشند، تعداد تلقیح به ازای آبستنی پایین تری نسبت به گاوهای چند شکم زایش دارند. از طرفی تعداد ۱۱ SNP ارتباط معنی‌داری با صفت مورد نظر داشت که در BTA8، BTA11، BTA28، BTA6(5)، BTA13، BTA18، BTA14 و BTA1 واقع شده بودند. نتایج مطالعه‌ای نشان داد که بیشترین SNP‌های اثر گذار بر این صفت در BTA6 واقع شده بودند (Liang et al. 2023)، که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد. همچنین نتیجه مطالعه دیگر نشان داد SNP اثر گذار بر صفت نرخ گیرایی در تلیسه‌ها به‌طور مشترک بر صفت سن اولین زایش اثرگذار بوده که دور از ذهن نمی‌باشد (Prakapenka et al. 2023). در مطالعه‌ای دیگر تعداد ۶۷ SNPs همبسته با این صفت مشاهده شد که اکثر این SNP‌ها در BTA4 واقع شده بودند (Parker Gaddis et al. 2015). در مطالعه (Parker Gaddis et al. 2015) در BTA8 یک منطقه با صفت نرخ باروری در تلیسه‌ها در ارتباط معنی‌دار بود که با نتایج به‌دست آمده در این مطالعه مطابقت دارد.

دهند. در مطالعه مینوزی و همکاران بر روی گاوهای هلشتاین درایتالیا ۱ SNP معنی‌دار واقع در منطقه BTA2 همبستگی بالایی با صفت AFC داشت (Minozzi et al. 2013). در مطالعه دیگر که بر روی گاوهای هلشتاین در ژاپن انجام شد ۱ SNP که بر روی کروموزوم شماره ۲ واقع شده بود همبستگی بالایی با صفت AFC داشت (Sasaki et al. 2017). همچنین در مطالعه‌ای دیگر یک SNP مؤثر بر صفت AFC در منطقه BTA10 مشاهده شد. پس از انجام تجزیه و تحلیل Post-GWAS مشخص شد که در حاشیه SNP‌های معنی‌دار در BTA3 و BTA15 جایگاه‌هایی بر وزن بدن و افزایش وزن روزانه اثرگذار بود. در BTA21، چند جایگاه مختلف بر صفت اتصالات پستان، عمق پستان، اندازه سرپستانک، وزن لاشه و آسان‌زایی اثرگذار بوده که در مطالعات بسیاری بر این نکته که سن اولین زایش بر آسان‌زایی مؤثر است اشاره شده است. در BTA28، یک جایگاه بر صفت فاصله زایش تا اولین تلقیح و فاصله بین اولین و آخرین تلقیح و در همان اطراف QTL دیگری با صفت باروری در تلیسه‌ها در ارتباط بود. در BTA5، جایگاه‌هایی بر صفات تولید شیر (مقدار شیر، چربی، پروتئین) اثرگذار بود. در BTA23 یک QTL بر صفت چندقلو زایی مؤثر بود. از طرف دیگر در BTA3، چند QTL با صفت وزن بدن؛ سخت‌زایی، اندازه وزن گوساله و سن بلوغ تلیسه در ارتباط بود. در نهایت QTL‌های شناسایی در حواشی SNP‌های معنی‌دار تأیید کننده این واقعیت است که سن اولین تلقیح و سن اولین زایش می‌تواند بر

جدول ۱- QTL‌هایی که در نزدیک‌ترین فاصله (1MB) با SNP‌هایی که همبستگی معنی‌داری با صفت سن اولن تلقیح (AFS)، سن اولین زایش (AFC) و تعداد تلقیح به ازای آبستنی (NSPC) در تلیسه‌ها

Trait	SNP name	QTL trait	QTL symbol
AFI	۵/۴۷۹۳۱۹	Body weight	BW
		Rump length	RUMLGT
AFI	۱۳/۶۳۲۴۳	Scrotal circumference	SCRCIR
AFI	۲۳/۳۹۹۷۲	Body weight	BW
AFI	۲۱/۳۶۱۸۶	Udder width	UWDT
AFC		Teat placement - front	FTPL
		Udder attachment	UA
		Teat length	TLGTH
		Carcass weight	CWT
		Calving ease	CALEASE
		Stillbirth	SB
		Calving ease	CALEASE
		Calf size	CALFSZ
		Stillbirth	SB
AFI	۱۳/۵۹۴۱۳	Clinical mastitis	CM
AFC	۳۰/۵۹۳۸۲۳۳	NON	NON

AFC	۳/۱۰۲۹۴۳۹۷۷	Milk yield	MY
		Meat color score	MCOLOR
		Average daily gain	ADG
		Body weight	BW
AFC	۱۵/۲۸۲۳۳۹۰۹	Feed conversion ratio	FCR
		Milk protein percentage	PP
		Arachidonic acid content	FA-C20:4
		Milk capric acid content	MFA-C10:0
		Average daily gain	ADG
		Body weight (weaning)	WWT
AFC	۲۸/۲۵۹۱۳۳۱۹	Pelvic area	PELAR
		Interval to first estrus after calving	CALEST
		Interval from first to last insemination	INSINT
		Heifer pregnancy	HPG
AFC	۵/۵۶۷۲۰۵۶۳	Somatic cell score	SCS
		Milk fat percentage	FP
		Milk fat yield	FY
AFC	۵/۵۶۶۹۹۳	Longissimus muscle area	LMA
		Retail product yield	YIELD
		Milk protein yield	PY
		Somatic cell score	SCS
AFC	۲۳/۴۸۳۰۹۰۹۷	Multiple birth	TWIN
		Carcass weight	CWT
AFC	۳/۹۱۲۸۷۸۵۳	Clinical mastitis	CM
		Calf size	CALFSZ
		Body weight	BW
		Structural soundness	SOUND
		Stillbirth	SB
		Age at puberty	PUBAGE
AFC	۱۵/۲۹۸۲۱۹۵۵	Milk protein yield	PY
NIPC	۱۱/۳۳۹۳۲۷	Multiple birth	TWIN
		Milk protein percentage	PP
NIPC	۸/۹۷۴۵۵۳۱۷	Milk capric acid content	MFA-C10:0
		Milk myristic acid content	MFA-C14:0
		Udder swelling score	USS
NIPC	۲۸/۹۲۸۳۴	Pregnancy rate	PREGRATE
		Udder cleft	UC
		Milk protein yield	PY
		Antral follicle number	AFOLN
		Fat thickness at the 12th rib	FATTH
		Longissimus muscle area	LMA
		Body weight	BW
NIPC	۶/۱۴۲۱۰۲۵۳	Body weight	BW
		Milk protein yield	PY
NIPC	۶/۴۱۱۶۱۴۹۰	Body weight	BW
NIPC	۶/۲۶۲۹۹۲۷۶	Calving ease	CALEASE
NIPC	۶/۴۰۴۸۳۹۱۳	Body weight	BW
		Calving ease	CALEASE
NIPC	۱۳/۳۲۶۴۲۲۳	NON	NON
NIPC	۱۸/۱۵۵۲۸۸۰۳	Residual gain	RGAI
NIPC	۶/۴۱۲۵۲۶۱۳	Body weight	BW
NIPC	۱۴/۷۹۴۷۲۴۷۳	Meat color L	MCIEL

آبستنی در تلیسه‌ها تنها ۱۱ درصد (۲ SNP مشترک) مشاهده شد (Abdollahi-Arpanahi et al. 2019).

۴ QTL در BTA6 با صفت وزن بدن در ارتباط معنی‌دار بودند. نتایج آنالیزهای Post-GWAS نشان داد در BTA5 در حاشیه SNP معنی‌دار بر صفت AFI یک QTL بر صفت وزن بدن اثرگذار بود. در طی سال‌های گذشته افزایش وزن بدن جزو برنامه‌های اصلاح نژادی در برخی از کشورها از جمله کشور

در BTA11 در اطراف SNP مرتبط با صفت تعداد تلقیح به ازای آبستنی، یک QTL بر صفت چندقلو‌زایی اثرگذار بود. یک QTL در BTA28 بر صفت نرخ باروری مؤثر بود. نرخ باروری حاصل ضرب نرخ گیرایی در نرخ فحلیابی است و از آنجایی که نرخ گیرایی معکوس صفت تعداد تلقیح به ازای آبستنی است، لذا ارتباط این دو صفت دور از انتظار نیست. بر اساس مطالعه‌ای همبستگی SNP‌های مشترک این صفت با تعداد تلقیح به ازای

به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد تعدادی SNP در ارتباط معنی‌دار با صفات مورد نظر وجود دارد که در حواشی این SNPها، QTLهایی وجود دارد که می‌توانند بر این صفات اثرگذار باشند.

آمریکا بود (Veerkamp et al. 1998) که این افزایش وزن بدن تاثیر مناسبی بر صفات ماندگاری و آبستنی نداشت علاوه بر این افزایش وزن بدن هزینه‌های نگهداری دام را افزایش می‌دهد (Veerkamp et al. 1998).

از طرفی کاهش وزن در زمان اولین تلقیح نیز مشکلات خود را به دنبال خواهد داشت. پس در این صورت رسیدن دام به وزن مطلوب در زمان اولین تلقیح باید مورد توجه قرار بگیرد.

منابع

Abdollahi-Arpanahi R, Carvalho, MR, Eduardo RS and Peñagaricano 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.

Frischknecht M, Bapst FR, Seefried H, Signer-Hasler D, Garrick C, Stricker, R Fries, Russ J and Sölkner, Bieber (2017) Genome-wide association studies of fertility and calving traits in Brown Swiss cattle using imputed whole genome sequences. *BMC Genomics*. 18:910-923.

Hansen LB, Cole JB, Marx GD and Seykora AJ (1999) Productive life and reasons for disposal of Holstein cows selected for large versus small body size *Journal of Dairy Science*. 82:795-801.

Jalil Sarghale A, Moradi Shahrehabak M, Moradi Shahrehabak H, Nejati Javaremi A, Saatchi M, Khansefid M and 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.

Junior G, Schenkel FS, Alcantara L, Houlihan K, Baes C.F (2021) Estimated genetic parameters for all genetically evaluated traits in Canadian Holsteins. *Journal of Dairy Science*. 104:9002-9015.

Liang Z, Prakapenka D, VanRaden PM, Jiang J, Ma L and Da YA (2023) Million-Cow Genome-Wide Association Study of Three Fertility Traits in U.S. Holstein Cows. *International Journal of Molecular Science*. 24:10496.

Mc-Connel, CS, Lombard JE, Wagner BA and Garry FB (2008) Evaluation of factors associated with increased dairy cow mortality on United States dairy operation. *Journal of Dairy Science*. 91:1423-1432.

Minozzi GEL, Nicolazzi A, Stella S, Biffani R, Negrini B, Lazzari P, Ajmone-Marsan, J and Williams L (2013) Genome wide analysis of fertility and production traits in Italian Holstein cattle. *PLoS on Journal*. 8:80-92.

Nishida S, Aziz MA and Suzuki K (2006) Modeling number of services per conception of Japanese Black cattle by random regression. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 123:56-63.

Parker Gaddis KL, Null DJ and Cole JB (2015) Explorations in genome-wide association studies and network analyses with dairy cattle fertility traits. *Journal of Dairy Science* 99:6420-6435.

Peters SO, Kizilkaya KDJ, Garrick RL, Fernando JM, Reecy RL, Weaber GA, Silver M and Thomas M G (2013) Heritability and Bayesian genome-wide association study of first service conception and pregnancy in Brangus heifers. *Journal of Animal Science* 91:605-612.

Prakapenka D, Liang. Z, Da Y (2023) Genome-wide association study of age at first calving in US Holstein cows. *International Journal of Molecular Science* 24:7109.

Sasaki S, Takayuki T, Ikeda S, Sugimoto Y (2014) A genome-wide association study reveals a quantitative trait locus for age at first calving in delta/notch-like EGF repeat containing on chromosome 2 in Japanese Black cattle. *Journal of Animal genetic* 45:285-287

Sorensen JT and Ostergaard S (2003) Economic consequences of postponed first insemination cows in the dairy cattle herd. *Livest Production Science* 79: 145-53.

Veerkamp RF (1998) Selection for economic efficiency of dairy cattle using information on live weight and feed intake: A review. *Journal of Dairy Science* 81:1109-1119.