



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Genetiska och epigenetiska samband mellan näringsförsörjning och fertilitet hos mjölkkor

Stina Hellman



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för husdjursgenetik

Genetiska och epigenetiska samband mellan näringsförsörjning och fertilitet hos mjölkkor

Genetic and epigenetic associations between metabolism and fertility in dairy cows

Stina Hellman

Handledare:

Britt Berglund, SLU, Institutionen för husdjursgenetik

Examinator:

Hossein Jorjani, SLU, Institutionen för husdjursgenetik

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Kandidatarbete i husdjursvetenskap

Kurskod: EX0553

Program: Agronomprogrammet–Husdjur

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2013

Serienamn, delnr: Examensarbete / SLU, Institutionen för husdjursgenetik, 410

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: epigenetik, fertilitet, NEB, hullpoäng, leptin, NEFA, BHB, IGF-1, urea

Key words: epigenetics, fertility, NEB, BCS, leptin, NEFA, BHB, IGF-1, urea

Sammanfattning

Mjölkkons förmåga att återuppta brunst efter kalvning och att bli dräktig på nytt påverkas av kons metaboliska tillstånd i samband med kalvning. Hos högmjolkande kor är det stor risk att foderintaget inte blir tillräckligt för att underhålla det ökade energibehovet efter kalvning, och kon kan då hamna i ett tillstånd av negativ energibalans. Energifalans kan mätas på olika sätt, till exempel genom hullpoäng eller plasmakoncentration av olika metaboliska hormoner och metaboliter. Efter kalvning stimulerar endokrina signalvägar vävnadsmobilisering; insulinsignaleringen blockeras, koncentrationen av insulinliknande tillväxtfaktor-1 (IGF-1) och leptin minskar, samt koncentrationen av tillväxthormon (GH) stiger. Detta leder till en ökning av olika metaboliter i blodet, såsom fria fettsyror (NEFA), beta-hydroxybutyrat (BHB) och urea. Alla dessa parametrar har blivit negativt associerade med flera fertilitetsegenskaper, och skulle potentiellt kunna användas som indirekta mått på fertilitet i avelsvärderingen. Forskning har även visat att vissa gener, som är sammankopplade med fertilitet och näringsförsörjning, är epigenetiskt reglerade. Epigenetik förklarar variationer i genuttryck som inte beror på DNA-sekvensen, vilket innebär att kunskap om epigenetisk reglering inom fertilitetsområdet skulle kunna förklara en större del av den genetiska variationen som i nuläget är okänd. Genetiken bakom metaboliska respektive epigenetiska parametrar är dock fortfarande litet utforskad hos mjölkkor och behöver studeras ytterligare för att praktiskt kunna tillämpas i avelsarbetet.

Abstract

The dairy cow's ability to resume estrus after calving and to conceive is affected by their metabolic status after calving. For high yielding cows there is a high risk that the feed intake will not be sufficient to cope with the increased energy demands after calving, and the cow will end up in a state of negative energy balance. Energy balance can be measured in various ways, for example by body condition score or by plasma concentration of several metabolic hormones and metabolites. After calving, endocrine pathways stimulate tissue mobilization; insulin signaling is blocked, the concentration of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and leptin decreases, and the concentration of growth hormone (GH) increases. This leads to an increase of various metabolites, for example non-esterified fatty acid (NEFA), beta-hydroxybutyrate (BHB) and urea. All these parameters have been negatively associated with several fertility traits, and can probably be used as indirect selection criteria of fertility in breeding programs. Research has also shown that certain genes, associated with fertility and metabolism, are epigenetically regulated. Epigenetics explains variations in gene expression that not originates from the DNA sequence, which implies that better knowledge of epigenetic regulation on fertility traits probably could explain a large part of the genetic variation that is currently unknown. The genetics of metabolic and epigenetic parameters is still only partially investigated in dairy cows and require further study in order to be practically applied in dairy cow breeding.

Introduktion

Mjölproduktionen per ko (*Bos Taurus*) har under de senaste 40 åren ökat drastiskt vilket är ett resultat av framsteg i avelsarbete, utfodring och driftsplanering. Selektion för mjölkavkastning har resulterat i problem med hälsa och fertilitet, särskilt i länder som inte tagit hänsyn till dessa egenskaper i avelsarbetet. Sverige har under de senaste 40 åren inkluderat hälso- och fertilitetsegenskaper i avelsprogrammet, vilket har resulterat i att man i

viss mån har kunnat dämpa denna negativa utveckling (Rodriguez-Martinez, 2008). För att i framtiden kunna avla fram friska, välmående och samtidigt högproducerande kor är det därför viktigt att ta hänsyn till andra parametrar än enbart mjölkproduktion, såsom hälso- och fertilitetsegenskaper (Pryce et al, 2001; Rodriguez-Martinez, 2008). En viktig faktor som påverkar fertiliteten är kons förmåga att reglera näringsbalansen under dräktighet och laktation (Wathes, 2012).

I slutet på dräktigheten och i början på laktationen har mjölkkon ett stort energibehov. Den ska inte bara underhålla mjölkproduktionen, utan också andra viktiga fysiologiska funktioner så som tillväxt och underhåll av olika vävnader (Grummer, 2007). Hos högmjölkanne kor kan energibehovet bli för stort för att kunna tillgodoseas med fodret, vilket gör att kon hamnar i ett tillstånd i negativ energibalans (NEB). Efter kalvning sker därför metaboliska och endokrina förändringar som leder till ökad mobilisering av näringsämnen, från framförallt fettvävnad och skelettmuskulatur, till förmån för mjölksyntesen (Bauman & Currie, 1980; Bell, 1995). Dessa anpassningar börjar generellt sett i slutet på dräktigheten och förstärks kraftigt efter kalvning (Bell, 1995). Den mest dramatiska minskningen i energibalans sker ungefär 1-2 veckor efter kalvning, där det finns risk att kon hamnar i ett allvarligt tillstånd av NEB som kan vara ungefär i 5-7 veckor efter kalvning (Grummer, 2007). I kommersiell mjölkproduktion rekommenderas att börja inseminera cirka två månader efter kalvning (Svensk Mjolk, 2012), under samma period som kon kan befinna sig i NEB. De metaboliska och endokrina förändringar som sker vid, eller strax efter kalvning påverkar kons förmåga att bli dräktig på nytt (Wathes et al, 2007c). NEB kan resultera i fördröjd ägglossning, utebliven dräktighet, och kastning (Bisinotto et al, 2012). Detta kan innebära en stor ekonomisk förlust för producenten som i värsta fall måste slakta kon om den inte blir dräktig. Kor kan gallras ut av olika anledningar, till exempel på grund av dålig hälsa, låg mjölmängd eller opassande lynne, men den vanligaste orsaken, tillsammans med mastiter, är problem som är kopplade till försämrad reproduktion. I Sverige blev under 2011 nästan 23 % av alla utgångna SLB kor utslagna på grund av nedsatt fruktsamhet eller infertilitet. Liknande statistik kan ses hos SRB där 24 % av alla utgångna SRB kor blev utslagna på grund av fertilitetsproblem (Svensk Mjolk, 2012).

Många studier har visat att det finns genetiska associationer mellan näringsbalans och olika fertilitetsegenskaper (Wathes, 2012). Nya upptäckter inom DNA-teknologin har möjliggjort DNA-sekvensering och identifiering av olika nyckelgener över hela genomet (VanRaden et al, 2009). Detta gör det möjligt att kartlägga specifika geners betydelse för till exempel reproduktion och metabolism (t.ex. Clempson et al, 2011). Ett nytt forskningsfält som är högaktuellt inom humanforskningen, men som ännu är relativt outforskat inom husdjursaveln är epigenetik. Epigenetik kan definieras som ärftliga förändringar i genuttryck som är oberoende av DNA-sekvensen. Epigenetiska parametrar kan i framtiden bli mycket användbara inom husdjursaveln då de sannolikt kan förklara en stor del av den fenotypiska variationen inom produktionsegenskaper och genetiska sjukdomar (Magee et al, 2010; González-Recio, 2012).

Syftet med detta arbete är att sammanställa aktuell forskning om genetiska och epigenetiska samband mellan näringsbalans och fertilitet, samt att studera hur det kan användas i framtida avelsarbete.

Genetiska samband mellan näringsförsörjning och fertilitet

Omfattningen av vävnadsmobiliseringen påverkas av födointag, kroppskondition och mjölkavkastning (Wathes et al, 2013). Det finns för nuvarande ingen vedertagen definition på kroppskondition, därför har man i forskning använt olika egenskaper som är relaterade till energibalans. Direkta mätningar av kroppskondition är ofta baserade på mängd intagen torrsubstans relaterat till mjölkavkastning, men eftersom detta kan vara svårt att mäta på kommersiella gårdar kan det vara mer lämpligt att basera olika selektionskriterium på indirekta egenskaper som till exempel hullpoäng (Banos & Coffey, 2009), olika metaboliska hormon eller metaboliter, till exempel insulin, insulinliknande tillväxtfaktor-1 (IGF-1), leptin, fria fettsyror (NEFA), beta-hydroxybutyrat (BHB) och urea. Alla dessa parametrar har dessutom visat samband med olika fertilitetsegenskaper (Wathes et al, 2007c). Förändringen av kons mjölkavkastning och hullpoäng, samt plasmakoncentrationen av insulin, IGF-1, leptin, NEFA och BHB under de första laktationsveckorna illustreras i figur 1.

Hullbedömning

Hullbedömning i form av hullpoäng är en metod som används för att mäta tjockleken på underhudsfettet hos framförallt kor och får. Metoden bygger på visuella och taktila uppskattningar av fettvävnaden längs ryggen på djuret, som poängsätts på en skala från 1 (låg) till 5 (hög) (McDonald et al, 2011). En hullminskning på mer än 0,5 poäng mellan kalvning och första brunst har visats påverka fertiliteten negativt (Buckley et al, 2003). Eftersom hullpoäng bygger på visuella och taktila uppskattningar, skulle det eventuellt vara säkrare att istället basera hullpoäng på ultraljudsmätningar, som är ett mer exakt mått på fettlagrets tjocklek. Men eftersom ultraljud är en dyr metod kan detta vara svårt att praktiskt tillämpa. Dock är korrelationen mellan ultraljudsmätningar och hullpoäng hög, vilket visar att hullpoäng kan vara en bra alternativ metod för att uppskatta tjockleken på ryggens underhudsfett (Hjertén, 2006). Genom att mäta kons hull de första veckorna under laktationen kan omfattningen av NEB skattas (Pryce et al, 2001). Enligt Pryce et al (2001) har kor med högt avelsvärde för mjölkavkastning lägre hullpoäng under tidig laktation, och förlorar alltså mer hull jämfört med kor som har ett sämre avelsvärde.

Fertilitet kan mätas på olika sätt, till exempel genom att mäta intervallet mellan kalvning och dräktighet, intervallet mellan kalvning och första ovulatoriska brunst, eller antal insemineringar per dräktighet. Egenskaper som är associerade med fertilitet kan vara svåra att mäta, och har ofta låga arvbarheter (Berry et al, 2003b; Banos & Coffey, 2009; Bastin et al, 2010). Hull har en arvbarhet som är högre än majoriteten av fertilitetsegenskaperna och är dessutom relativt okomplicerad att mäta, vilket gör att hull skulle kunna användas som en indirekt selektionsegenskap för fertilitet. Detta kan vara speciellt användbart för länder som inte har tillgång till ett omfattande registreringssystem, såsom de nordiska länderna haft (Rodriguez-Martinez, 2008). Arvbarheten för hull och den genetiska korrelationen mellan hull och fertilitetsegenskaper varierar beroende på när den mäts under laktationen, men gemensamt för alla mätningar är att korrelationen är ogynnsam och måttigt stark (Pryce et al, 2001; Berry et al, 2003a; Banos & Coffey, 2009; Bastin et al, 2010). Tabell 1 visar några skattningar på genetiska korrelationer mellan olika fertilitetsegenskaper och hullpoäng över laktationen. Ett lågt hullpoäng i tidig laktation är alltså ogynnsamt korrelerat med fertilitet, och verkar ha en större effekt hos kor med höga avelsvärden för mjölkavkastning.

Tabell 1. Genetiska korrelationer mellan hullpoäng och olika fertilitetsegenskaper baserat på mätningar skattade vid flera tillfällen under hela laktationen

| Dräktighet efter första inseminering | Intervall från kalvning till ny dräktighet | Intervall från kalvning till första ovulatoriska brunst | Antal insemineringar till dräktighet | Referenser |
|--------------------------------------|--|---|--------------------------------------|-----------------------|
| 0,34* | - | -0,37* | -0,42* | Berry et al (2003b) |
| - | -0,29 till -0,53 | -0,37 till -0,44 | - | Banos & Coffey (2009) |
| - | -0,19 till -0,03 | < -0,27 | - | Bastin et al (2010) |
| - | - | -0,41* | - | Pryce et al (2001) |
| 0,15-0,38 | - | -0,47 till -0,31 | -0,34 till -0,17 | Berry et al (2003a) |

* Skattning baserat på ett medelvärde av hullpoäng över laktationen

Olika skattningar på arvbarhet av hull överensstämmer relativt väl med varandra, till exempel varierar arvbarheten mellan 0.27-0.36 (Gallo et al, 2001), 0.23-0.37 (Koenen et al, 2001), 0.29-0.43 (Berry et al, 2003b), och 0.24-0.56 (Banos & Coffey, 2009). Det har också förmodats att arvbarheten för hull ökar ju längre in på laktationen kon befinner sig, för att förbli relativt konstant under den senare delen av laktationen (Koenen et al, 2001; Banos & Coffey, 2009). På liknande sätt verkar korrelationen mellan hull och vissa fertilitetsegenskaper, vara som starkast i mitten eller under den senare delen av laktationen (Gallo et al, 2001; Berry et al, 2003a). Dock finns det motstridiga resultat till detta. Andra studier har visat att hull som skattats under tidig laktation ger den starkaste korrelationen till fertilitet (Pryce et al, 2001; Banos & Coffey, 2009). Skattningar på arvbarhet och genetisk korrelation mellan hull och fertilitet när de är som störst skulle kunna användas i indirekt selektion för fertilitet (Berry et al, 2003a).

Olika metaboliska förändringar efter kalvning och dess samband med fertilitet

De metaboliska och endokrina förändringar som sker under NEB ger signaler till livmodern som förhindrar att kon blir dräktig (Wathes et al, 2012). NEB under tidig laktation förknippas med förändringar i metaboliska hormoner, bland annat med reducerad plasmakoncentration av insulin, IGF-1, och leptin, samt förhöjd plasmakoncentration av NEFA, BHB och tillväxthormon (GH) (Butler, 2003; Lucy, 2008; Wathes et al, 2013). Dessa hormoner och metaboliter antas sammankoppla reproduktion med förändringar i energibalans genom indirekt påverkan på fertilitetsegenskaper och genom direkt påverkan på hypotalamus, hypofys, och äggstockar (Kadokawa et al, 2006; Clempson et al, 2011).

Insulin

Fostertillväxten i slutet på dräktigheten och mjölksyntesens start innebär en stor förlust av tillgängligt glukos i kroppen (Garverick et al, 2013). Detta sänker insulinkoncentrationen i blodet (figur 1), som signalerar att kon har brist på näringsämnen. Insulinreceptorer i fettvävnad och skelettmuskulatur blir till en viss grad resistent, vilket aktiverar mobilisering av NEFA och aminosyror. Glukosupptag sker först och främst i de vävnader som är mest nödvändiga, i juver och livmoder (Bell, 1995). Selektion för mjölkavkastning har visat

samband med en minskning av cirkulerande insulinnivåer i kroppen (Wathes, 2012). Wathes et al (2007b) konstaterade att insulinkoncentrationen i blodet är negativt korrelerad med mjölkproduktion. Det innebär att kor med hög mjölkavkastning tenderar att ha lägre insulinnivåer i blodet, jämfört med kor som har låg mjölkavkastning. Dock verkar insulinkoncentrationen i blodet inte enbart påverkas av kons mjölkproduktion. Cummins et al (2012) jämförde två grupper av mjölkkor som alla hade liknande avelsvärden för mjölkproduktion men olika avelsvärden för fertilitet. Kor med bra avelsvärden för fertilitet hade 89 % högre plasmakoncentration av insulin under den första laktationsveckan jämfört med kor med sämre avelsvärden för fertilitet.

NEFA och BHB

Kroppens energireserver lagras framförallt i form av triglycerider i fettvävnad. När kroppen ska utvinna energi från fettvävnaden bryts triglycerider ner till en glycerolmolekyl och tre fria fettsyror, s.k. NEFA (Bauman & Currie, 1980). I slutet på dräktigheten frigörs alltså NEFA från fettvävnader och tas upp i levern där de antingen oxideras till koldioxid för fullständig energiutvinning, eller delvis oxideras för produktion av ketonkroppar och acetat. Ketonkroppar och acetat skickas ut i kroppen för att användas som energisubstrat. Alternativt kan NEFA esterifieras till triglycerider som kan lagras i levern, eller skickas till andra vävnader via lipoproteiner. NEFA kan alltså utnyttjas via beta-oxidationen som ett alternativt energisubstrat till glukos. Den vanligaste formen av ketonkroppar är BHB som till exempel kan användas till *de novo* fettsyrsyntes i mjölkkörtlarna. NEFA-koncentrationen i blodet reflekterar omfattningen av fettvävnadsmobiliseringen, och BHB-koncentrationen i blodet reflekterar fettsyraoxidationen i kroppen (Bell, 1995; Wathes et al, 2013). Efter kalvning ökar mobiliseringen av NEFA markant (figur 1), därför kan plasmakoncentrationen av NEFA fungera som en metabolisk indikator på när kon hamnar i NEB (Bell, 1995).

NEFA-koncentrationen i blodet kan alltså påverka fertiliteten indirekt, men NEFA kan även påverka genom direkt verkan på reproduktionsorganen. Jorritsma et al (2004) observerade i *in vitro* granulosaaceller att höga NEFA nivåer har samband med befruktningssvårigheter och problem i embryonalutvecklingen, egenskaper som i sin tur är sammankopplade med äggcells- och embryokvalitet. Enligt Garverick et al (2013) har kor med högre koncentration av NEFA i blodet svårare att bli dräktiga vid första insemineringsförsöket, jämfört med kor som har lägre koncentration av NEFA i blodet. Det har även observerats samband mellan NEFA, hull och återupptagande av brunstcykeln, där det konstaterades att kor som har en fördröjd brunststart också har lägre hullpoäng, allvarligare NEB, samt högre NEFA-nivåer i blodet (Giuliodori et al, 2011). Plasmakoncentrationen av BHB är positivt korrelerad med plasmakoncentrationen av NEFA, där BHB troligtvis kan fungera som en indikator på klinisk eller subklinisk ketos. Minst 50 % av alla mjölkkor förväntas hamna i ett tillstånd i subklinisk ketos under en period de första 4 veckorna på laktationen (Wathes et al, 2007c).

Leptin

Leptin är ett peptidhormon som utsöndras från fettvävnad (Sjaastad et al, 2010), men produceras även i många andra vävnader, till exempel i placenta och juver (Zieba et al, 2005). Leptingenen (*LEP*) hos nötkreatur är lokaliserad på kromosom 4 (Stone, 1995) och är en polymorfism som har många olika fysiologiska funktioner i kroppen (Van der Lende et al, 2005), men reglerar framförallt födointag och energibalans (Sjaastad et al, 2010; Wathes et al, 2013). Plasmakoncentrationen av leptin är en indikator på mängden lagrade triglycerider i fettvävnaden (Sjaastad et al, 2010) och är proportionell med kons hullpoäng (Leifers et al, 2005; Wathes et al, 2013). Djur som har större fettdepåer har högre plasmakoncentration av

leptin. Leptin har många olika funktioner i kroppen men reglerar framförallt aptit genom att den binder till receptorer på det aptitreglerande centrat i hypotalamus som, genom det centrala nervsystemet hämmar aptiten så att födointaget minskar. När kon efter kalvning befinner sig i ett tillstånd i NEB och fettreserver förbrukas, så minskar alltså leptinproduktionen (figur 1). En annan viktig funktion är dess påverkan på könsmognad. Leptin har en inverkan på när djuret blir könsmoget genom att signalera att det finns tillräckligt med kroppsreserver för att djuret ska klara av en dräktighet (Sjaastad et al, 2010). Hos mjölkkor ökar plasmakoncentrationen av leptin under slutet på dräktigheten för att sedan minska drastiskt vid kalvning (Leifers et al, 2005; Wathes et al, 2013).

Eftersom leptin reglerar födointag och näringsbalans har det en indirekt effekt på fertilitet, men det finns också belegg för att leptin kan ha en direkt effekt på framförallt äggstockar, då leptinreceptorer har observerats på både folliklar och gulkropp hos nötkreatur (Sarkar et al, 2010; Clempson et al, 2011). Enligt Leifers et al (2005) kan låga leptinnivåer leda till reducerad utsöndring av gonadotropiner, som i sin tur kan orsaka en fördröjning av den första ägglossningen efter kalvning. Hypotalamus reglerar gonadotropinsekretion genom adenohipofysen, som till exempel utsöndrar luteiniserande hormon (LH) som stimulerar ägglossning (Sjaastad et al, 2010). Leptin stimulerar sekretion av LH (Kadokawa et al, 2006), både genom påverkan på hypotalamus och på adenohipofysen (Zieba et al, 2005). När kon befinner sig i ett allvarligt tillstånd av NEB och alltså har mycket låga leptinnivåer, reduceras utsöndringen av LH vilket alltså kan leda till nedsatt fertilitet (Zieba et al, 2005; Kadokawa et al, 2006). En annan viktig komponent som är involverad i aptit och energibalans är en gen som kodar för neuropeptid Y (*NPY*). *NPY* reglerar framförallt leptinaktiviteten i hypotalamus, och förväntas därför också vara sammankopplad med fertilitet (Clempson et al, 2011).

Clempson et al (2011) fann genetiska kopplingar mellan fem olika single nucleotide polymorphisms (SNP), lokaliserade inom *LEP* och *NPY*, till mjölk- och fertilitetsegenskaper. Dessa är sammanfattade i tabell 2.

Tabell 2. Signifikanta samband mellan SNP, lokaliserade inom *LEP* och *NPY*, och olika fertilitetsegenskaper sammanfattade från Clempson et al (2011)

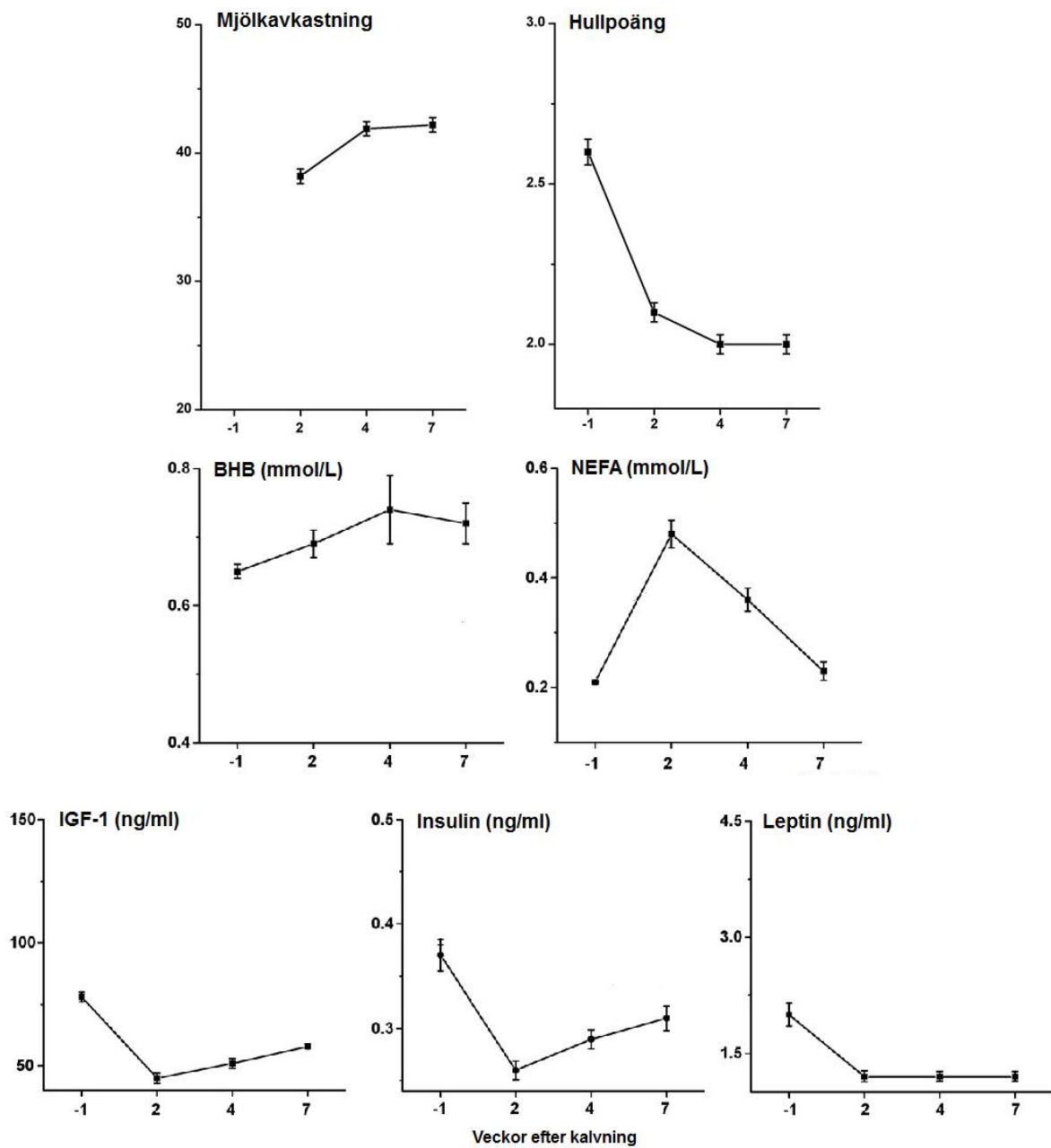
| Egenskap | SNP | Gen | Möjliga genotyper |
|---|--------|------------|-------------------|
| Ålder vid första inseminering | A59V | <i>LEP</i> | CC/TT/CT |
| Antal insemineringar till dräktighet | UASMS2 | <i>LEP</i> | CC/TT/CT |
| | A1457G | <i>LEP</i> | GG/AA/GA |
| Ålder vid kalvning | A59V | <i>LEP</i> | CC/TT/CT |
| Intervall mellan kalvning och ny dräktighet | UASMS1 | <i>LEP</i> | TT/CC/TC |
| | A1457G | <i>LEP</i> | GG/AA/GA |
| Kalvningsintervall | UASMS1 | <i>LEP</i> | TT/CC/TC |
| | A1457G | <i>LEP</i> | GG/AA/GA |
| Dräktig inom 100 dagar efter kalvning | UASMS1 | <i>LEP</i> | TT/CC/TC |
| | NPY1 | <i>NPY</i> | GG/AA/GA |
| Mjölkkavkastning per dag | A59V | <i>LEP</i> | CC/TT/CT |
| Mjölkkavkastning efter 305 dagar | A59V | <i>LEP</i> | CC/TT/CT |
| | NPY1 | <i>NPY</i> | GG/AA/GA |

Samtliga markörer var signifikant sammankopplade med en eller flera fertilitetsegenskaper. Endast två SNP kunde associeras med mjölkavkastning, varav den ena hade mycket svag association. Dessa resultat indikerar att genomisk markörbaserad selektion för att förbättra fertilitet, oberoende av mjölkavkastning, kan vara möjlig i framtida avelsprogram. Studien visade att selektion för specifika genotyper, till exempel för AA genotypen för A1457G SNP eller för TT genotypen för UASMS1 SNP, skulle kunna resultera i ett snabbt avelsframsteg med avseende på fertilitet (Clempton et al, 2011). I en liknande studie hittade Leifers et al (2005) tre SNP; RFLP1, Pro2 och Pro1, som var associerade med mjölkavkastning, energibalans och påbörjad luteal aktivitet efter kalvning, i angiven ordning. Utifrån dessa tre genetiska markörer kunde två genotypkombinationer definieras, som båda ger en relativt hög mjölkavkastning men samtidigt en god energibalans och fertilitet (Leifers et al, 2005).

IGF-1 och GH

IGF-1 produceras framförallt i levern och frigörs ut i blodbanan för att verka på andra vävnader (Zulu et al, 2002; Sjaastad et al, 2010). IGF-1 är ett peptidhormon som strukturellt liknar proinsulin, och vars funktion förmedlas av GH. GH är ett hormon som regleras av hypotalamus och utsöndras från adenohypofysen vars främsta funktion är att stimulera kroppstillväxt (Sjaastad et al, 2010). GH stimulerar IGF-1 produktion i levern via en specifik membranbunden receptor. Under normala omständigheter hålls systemet i jämvikt genom att höga IGF-1 koncentrationer inhiberar GH genom negativ feedback (Sjaastad et al, 2010). Men när kroppen förlorar mycket kroppskondition, blir de GH-specifika receptorerna okänsliga, vilket gör att syntesen av IGF-1 hämmas kraftigt (Lucy, 2008). När IGF-1 cirkulerar i blodet kan den binda till minst sex olika transportprotein (IGFBP-1-6), som ger den en stabil struktur med lång halveringstid (Sjaastad et al, 2010). Förutom att fungera som transportprotein kan IGFBP reglera bioaktiviteten av IGF-1 genom att binda till IGF-1 för att antingen stimulera eller inhibera den (Llewellyn et al, 2007). Plasmakoncentrationen av IGF-1 påverkas alltså starkt av kons energistatus. Cirkulerande IGF-1 koncentrationer i blodet minskar kraftigt omkring första veckan efter kalvning, om kon befinner sig i NEB (figur 1) (Zulu et al, 2002; Llewellyn et al, 2007). Minskade cirkulerande nivåer av IGF-1 har visat sig ha en negativ effekt på kons reproduktionsförmåga. Mjölkkor med låga koncentrationer av IGF-1 eller minskad aktivitet av IGF-1, har associerats med svårigheter att återuppta brunstcykeln efter kalvning och svårigheter att bli dräktiga (Zulu et al, 2002; Butler, 2003; Giuliadori et al, 2011). IGF-1-receptorer finns på olika vävnader som hypofys, äggstockar och reproduktionsorgan. Hög plasmakoncentration av IGF-1 kan förstärka LH och verka positivt på embryoutvecklingen (Adam et al, 2000; Block, 2007).

Cummins et al (2012), jämförde två grupper av mjölkkor, som alla hade liknande avelsvärden för mjölkproduktionsegenskaper, men hade olika avelsvärden för fertilitetsegenskaper. IGF-1-koncentrationen minskade hos samtliga kor efter kalvning, men minskningen var större hos korna med sämre avelsvärden för fertilitet. Mätt under hela laktationen, hade kor med bra fertilitetsvärden 34 % högre plasmakoncentration av IGF-1 jämfört med kor som hade sämre fertilitetsvärden. Eftersom mjölkproduktion, energibalans, och födointag var liknande för samtliga kor, beror olikheterna mellan grupperna mest sannolikt på genetiska skillnader. Studien visade också att de metaboliska mekanismer som orsakar ökningen av IGF-1 hos kor med bra fertilitet varierar under laktationen. Kor med höga avelsvärden för fertilitet visade dessutom större genuttryck av IGF-1-mRNA under mitten och slutet på laktationen (Cummins et al, 2012).



Figur 1. Förändring av mjölkkavkastning och hullpoäng, samt plasmakoncentrationen av BHB, NEFA, IGF-1, insulin och leptin under de första laktationsveckorna. Graferna är modifierade och baserade på data från Wathes et al (2007b). Resultaten från försöket stämmer väl överens med andra forskningsresultat och kan därför ses som en generell illustration på metaboliska förändringar under de första laktationsveckorna.

Urea

Mobilisering av aminosyror från skelettmuskulatur kan leda till att ureanivån i blodet hos mjölkkor stiger (Bell, 1995). Enligt Wathes et al (2007b) finns det hos mjölkkor en positiv korrelation mellan urea- och BHB-koncentrationen i blodet precis innan kalvning, vilket indikerar att det sker en mobilisering av aminosyror från skelettmuskulaturen i samband med

fettvävsmobiliseringen. I samma försök kunde en negativ korrelation mellan urea och hullpoäng observeras vilket antyder att plasmakoncentrationen av urea eventuellt skulle kunna användas som ett indirekt mått på NEB. Det finns flera studier som med motstridiga resultat, har undersökt sambandet mellan olika ureanivåer i blodet och flera fertilitetsegenskaper. Wathes et al (2007a) kunde observera signifikanta ogynnsamma samband mellan plasmakoncentrationen av urea och olika fertilitetsegenskaper. Dock varierade dessa samband mellan kor i olika åldrar och över tid. Flera andra studier har tvärtom hittat mycket svaga signifikanta samband eller inga alls (sammanfattat av Laven et al, 2007). Foderstatens proteininnehåll, beroende på när och hur utfodringen sker, har en stor effekt på ureakoncentrationen i blodet och kan därför förklara mycket av variationen i dessa studier. Förhöjda ureakoncentrationer kan, förutom genom mobilisering av skelettmuskulatur, uppkomma genom att proteininnehållet i foderstaten är högt. Då kor har en förmåga att anpassa sig till proteinrika foderstater över tid, är det sannolikt att en kombination av andra faktorer utöver proteininnehållet i fodret som till exempel ett tillstånd i NEB, måste förekomma för att urea ska påverka fertiliteten negativt (Laven et al, 2007; Wathes et al, 2007c).

Epigenetiska samband mellan näringsförsörjning och fertilitet

Vad är epigenetik?

Epigenetik förklarar ärftliga fenotypiska förändringar som inte härrör från förändringar i DNA-sekvensen. Genuttryck kan regleras på olika sätt, till exempel genom specifika transkriptionsfaktorer vars betydelse kan vara avgörande vid bland annat celldifferentiering. Förändringar i genuttryck kan också regleras genom posttranslationella modifieringar av histoner, samt genom DNA-metylering. Dessa modifieringar kan upprätthållas över flera celldelningar genom mitos, och i vissa fall nedärvas över generationer genom meios (Lodish et al, 2013). Det finns olika typer av epigenetiska mekanismer som har betydelse vid framförallt embryo- och fosterutveckling, till exempel celldifferentiering, X-inaktivering, och genomisk prägling (Attig et al, 2010; Nicholas et al, 2010). Den epigenetiska koden hos en individ brukar kallas individens epigenom (Lodish et al, 2013). Hos människan har avvikelser i epigenomet associerats med metaboliska och psykiska sjukdomar. Dessutom har studier på olika arter, framförallt råttan (*Rattus norvegicus*), visat att miljön som den dräktiga honan exponeras för precis innan betäckning eller under dräktigheten har effekt på utvecklingen av äggceller och embryo (Attig et al, 2010). Burdge et al (2011) kunde hos råttan konstatera att moderns fenotyp och näringsbalans under dräktighet och laktation, kunde reglera avkommans framtida näringsbalans och fertilitet genom DNA-modifieringar av specifika gener. Epigenetiska modifieringar fungerar alltså som ett minne av den miljöexponering som djuret har utsatts för tidigt i livet (Attig et al, 2010). Lee et al (2003) undersökte epigenetiska skillnader mellan foster som blivit till genom kloning och genom artificiell insemination hos mjölkkor. Klonade foster uppvisade större fenotypisk variation än kor som var halvsyskon. Ett resultat som tyder på att det inte bara är den genetiska koden som utgör fenotypen. Orsaken till variationen kunde i denna studie inte klargöras, men en möjlig förklaring föreslås vara att den artificiella miljö som skapades under kloningsprocessen ledde till nya eller ofullständiga epigenetiska modifikationer, som i sin tur gjorde att de klonade individerna uppvisade en större fenotypisk variation jämfört med de kor som var halvsyskon (Lee et al, 2003).

Metylering av DNA sker vid position 5 på kvävebasen cytosin, i så kallade CpG-öar (Nicholas, 2010). Med CpG-öar menas repetitiva DNA-sekvenser av kvävebasen C följt av G

(Lodish et al, 2013). Hos däggdjur finns det vissa DNA-sekvenser som innehåller en ovanligt hög frekvens av CpG-öar (Attig et al, 2010), där majoriteten finns i promotorer. DNA-metylering förändrar genuttrycket genom kromatinkondensation, vilket i sin tur inaktiverar genen. Därför innehåller aktiva promotorer CG-sekvenser som är ometylerade (Lodish et al, 2013). DNA-metyleringar nedärvs vid varje celledelning, där en replikerad DNA-sträng automatiskt metyleras på samma CpG-plats som på ursprungssträngen (Nicholas, 2010). DNA-metyleringar har visat sig reglera framförallt gener som är involverade i utveckling och differentiering, vilket tyder på att DNA-metylering har en cellprogrammerande funktion (Attig et al, 2010).

Modifiering av histoner innebär att olika DNA-reglerande proteiner binder till histonernas svansar, som i sin tur påverkar kromatinstrukturen (Lodish et al, 2013). Varje modifikation reglerar ensam, eller i kombination med andra modifikationer på närliggande histoner, en eller flera faktorer som påverkar genuttryck, till exempel transkription av en specifik gen. Denna interaktion mellan flera olika posttranslationella modifikationer på specifika regioner på kromatinet kallas "histonkod". Det finns många olika typer av modifikationer, till exempel acetylering, metylering, fosforylering, och ubiquitinerings (Attig et al, 2010; Lodish et al, 2013). Hur miljön i livmodern via histonmodifikationer, påverkar den embryonala utvecklingen är fortfarande oklart. Dock upptäckte VerMilyea et al (2009), genom att analysera histonmodifikationer i embryon från möss, att exponering av embryon för en avvikande miljö kan leda till förändringar i fosterutvecklingen som sedan kan nedärvas över generationer.

Moderns inverkan på avkommans hullpoäng, fertilitet och mjölkavkastning

Det har gjorts få studier, och med varierande resultat, på epigenetiska samband mellan olika produktions- och funktionsegenskaper hos mjölkkor (Singh et al, 2011). Banos et al (2007) undersökte epigenetiska samband mellan hullpoäng, mjölkavkastning och fertilitet hos mjölkkor. Hypotesen var att högmjölkkande kor som blev dräktiga under laktationen skulle, på grund av de metaboliska anpassningar som sker, påverka avkommans framtida produktion och fertilitet negativt. I detta försök kunde dessvärre inga signifikanta skillnader mellan moderns mjölkavkastning och dotterns mjölkavkastning iaktas. Däremot, kunde man observera samband mellan moderns hullpoäng under laktationen och dotterns fertilitet, där de döttrar vars mödrar hade bra hullpoäng krävde färre inseminationsförsök för att bli dräktiga. Döttrar till kor som kalvade vid tidig ålder, då energibehovet måste täcka både laktation, dräktighet och egen tillväxt, hade svårare att bli dräktiga och krävde fler inseminationsförsök (Banos et al, 2007). Tvärtemot Banos et al (2007) har det i liknande studier observerats ett negativt samband mellan moderns mjölkavkastning och dotterns mjölkavkastning, där högmjölkkande kors avkomor hade sämre avkastning än deras mödrar (Berry et al, 2008; González-Recio et al, 2012). González-Recio et al (2012) visade att kor vars mödrar var kvigor, som alltså inte lakterade under dräktigheten, producerade mer mjölk under den första laktationen jämfört med kor vars mödrar lakterade under dräktigheten. Dessa resultat indikerar att metabolisk påfrestning under dräktigheten kan ha en betydande negativ effekt på avkommans framtida mjölkavkastning och fertilitet (Banos et al, 2007; Berry et al, 2008; Singh et al, 2011; González-Recio et al, 2012). Även om det i dessa studier ges relativt starka indikationer på att kons fenotyp regleras genom förändrat genuttryck under embryo- och fosterstadiet, finns det dock inga direkta bevis på att den fenotypiska variationen beror på epigenetiska DNA-modifikationer (Singh et al, 2011; González-Recio et al, 2012).

Genomiskt präglade gener kan reglera den ärftliga variationen inom produktionsegenskaper

Genomisk prägling är en mekanism där uttrycket av en viss allel beror på vilken förälder den har ärvts från. I en präglad gen är den allel som ärvts från den ena föräldern aktiv och den allel som ärvts från den andra föräldern inaktiv. I detta fall styrs genuttrycket av DNA-metylering (Funk-Keenan & Atchley, 2005). Alltså, de alleler som nedärvt från föräldrarna kan komma att uttryckas i olika grad, vilket skiljer sig från den traditionella mendelska genetiken (Singh et al, 2011). Genomiskt präglade gener har hos däggdjur visats spela en avgörande roll i djurets tillväxt och utveckling (Magee et al, 2010). Detta gör präglade gener till en potentiell källa för variation inom egenskaperna fertilitet och tillväxt (Funk-Keenan & Atchley, 2005).

Produktionsegenskaper, såsom mjölkavkastning, tillväxt, samt funktionella egenskaper såsom fertilitet och hälsoegenskaper, är huvudsakligen kvantitativa egenskaper som till stor del styrs av miljön. Det finns stöd för att polymorfismer inom olika locus innehållande präglade gener, delvis eller helt reglerar den ärftliga variationen för produktionsegenskaper såsom fettdeposition, tillväxt, slaktkroppsvikt och mjölkproduktion (Ruvinsky, 1999; Berkowicz et al, 2011; Magee et al, 2010). I en studie av Magee et al (2010) analyserades olika SNP för ett antal kandidatgener som är förmodat präglade hos nötkreatur. Ett fåtal av dessa gener hade tidigare blivit identifierade som präglade gener hos mjölkkor, medan resten hade bevisats vara präglade i minst en annan däggdjursart. Signifikanta samband hittades mellan olika fenotyper och flera SNP som var lokaliserade nära eller inom sex av kandidatgenerna. Dessa gener var *CALCR*, *GRB10*, *PEG3*, *RASGRF1*, *ZIM2* och *ZNF215*. Ett flertal SNP inom *CALCR*, *GRBR10* och *ZNF215* kunde associeras med olika kroppskonstitutionsegenskaper, fettdeposition och tillväxt. Endast en SNP inom *RASGRF1* analyserades, men kunde associeras till mjölkproteinhalt och celltal i mjölken. Hos däggdjur bildar *PEG3* ett genkluster med *ZIM2* som är lokaliserad på kromosom 18. Ett flertal SNP inom detta genkluster visade fenotypiska samband mellan kalvningsegenskaper och dräktighet. Detta ger starka indikationer på att vissa präglade gener eller loci bidrar till den genetiska variationen som finns i mjölkkons produktions- och funktionsegenskaper, och därmed skulle kunna användas som genetiska markörer i framtida avelsarbete (Magee et al, 2010).

Husdjursaveln idag

De flesta av de egenskaper som är av ekonomisk betydelse för produktionen, så som mjölkproduktion, tillväxt och fertilitet är kvantitativa egenskaper. En kvantitativ egenskap påverkas oftast av flera gener och miljön. Med miljö menas till exempel foder, stallmiljö, eller sjukdomstryck. Ett djurs genotyp kan delas upp i additiva genetiska effekter som syftar på den kombinerade effekten av alla gener som kodar för egenskapen, och icke-additiva genetiska effekter som syftar på gener med dominanseffekt eller epistasieffekt. Traditionellt avelsarbete är framförallt baserat på selektion utifrån den additiva genetiska delen av genotypen, som vanligtvis kallas djurets avelsvärde, och förklarar alltså inte den genetiska variation som beror på dominans- eller epistasieffekter (Simm, 2010).

De tekniska framsteg som under de senaste åren skett inom molekylärbiologin har bland annat möjliggjort genomisk avelsvärdering. Med den ökande tillgängligheten av flera tusentals SNP i kombination med utveckling av nya genetiska metoder kan skattningen av avelsvärden bli säkrare, speciellt för egenskaper med låga arvbarheter. Genomisk avelsvärdering leder också till minskade generationsintervall, vilket i kombination med säkrare avelsvärden leder till större avelsframsteg (VanRaden et al, 2009). Quantitative trait loci (QTL) är en region på en

kromosom som innehåller en eller flera gener som påverkar en kvantitativ egenskap. Genom att identifiera QTL kan specifika geners effekt och inverkan på egenskaper skattas vilket, jämfört med traditionell avelsvärdering, kan förklara en större del av den genetiska variationen inom produktions- och funktionsegenskaper hos mjölkkor (Nicholas, 2010).

Epigenetiska effekter beaktas inte i dagens avelsarbete (González-Recio, 2012). Då det gäller präglade gener, som har visats stå för en betydande del av den genetiska variationen inom flera ekonomiskt viktiga egenskaper (t.ex. Magee et al, 2010), tas det i dagsläget inte hänsyn till att föräldrarnas alleler i vissa fall kan uttryckas olika. Detta kan få implikationer som innebär att olika effekter mellan två alleler döljs (Garg et al, 2012). Effekterna av genomisk prägling behöver därför införlivas i kvantitativa genetiska modeller för olika produktionsegenskaper (Spencer, 2002; Garg, 2012). Genomisk prägling leder till olika avelsvärden, dominansavvikelser och olika additiva genetiska variationer för hanar och honor. Avelsvärden och dominansavvikelser blir dessutom korrelerade, vilket gör att den genetiska variationen inte längre kan delas upp i dominanseffekter och additiva effekter (Spencer, 2002). Det har på senare år utvecklats flera olika statistiska modeller som kan beakta både präglade och X-bundna gener, samt epistasieffekter i olika QTL, men dessa är tekniskt komplicerade och behöver utvecklas ytterligare för att kunna användas i kommersiellt syfte (Wright et al, 2012).

Diskussion

Det kan konstateras att ett tillstånd i NEB i samband med kalvning påverkar kons förmåga att bli dräktig på nytt (Wathes, 2012). Detta kan resultera i ekonomiska förluster för producenten då det kan krävas många insemineringsförsök innan kon blir dräktig och i värsta fall måste kon gallras bort (Grummer, 2007). För att undvika problem med NEB har det traditionellt sett, varit mest fokus på olika utfodringsstrategier (Bisinotto et al, 2012). Aktuell forskning sammanfattad i detta arbete, har därutöver visat att det finns signifikanta genetiska associationer mellan näringsförsörjning och fertilitet hos mjölkkor. Dessutom har flera gener som är sammankopplade med fertilitet och näringsförsörjning blivit identifierade. Detta motiverar för ett framtida avelsarbete där energibalans relaterat till fertilitet väger tyngre än i dagens avelsprogram. De metaboliska förändringar som sker efter kalvning styrs i olika utsträckning av flera endokrina signalvägar som stimulerar vävnadsmobilisering: insulinsignaleringen blockeras, koncentrationen av IGF-1 och leptin minskar, samt koncentrationen av GH stiger. Detta leder till en ökning av olika metaboliter i blodet, såsom NEFA, BHB och urea. Hur dessa metaboliska förändringar är kopplade till fertilitet, och genetiken som ligger bakom är dock fortfarande bara delvis utforskat. Med molekylärgenetiska metoder har man hittills kunnat identifiera vissa fördelaktiga genotyper för olika SNP framförallt inom leptingenen, som i framtiden skulle kunna användas i genomisk avelsvärdering (t.ex. Clempson et al, 2011). Genomiska avelsvärden är säkrare än traditionella avelsvärden, och leder till att kons generationsintervall kan minskas avsevärt, vilket gör det möjligt att öka avelsframsteget ytterligare jämfört med traditionellt avelsarbete (Vanraden et al, 2009). De flesta produktions- och funktionsegenskaper har ofta låga arvbarheter, och i den traditionella avelsvärderingen kan en stor del av den ärftliga variationen inom dessa egenskaper inte förklaras (Simm, 2010). Med genomisk avelsvärdering kan däremot specifika geners inverkan på olika egenskaper identifieras, vilket potentiellt kan förklara mer av den genetiska variation som tidigare varit okänd (Nicholas, 2010), speciellt för egenskaper med låga arvbarheter (VanRaden et al, 2009). Med tanke på detta skulle fler egenskaper och dess interaktion mellan varandra kunna tas hänsyn till i avelsvärderingen. En ökad förståelse om hur fertilitet är genetiskt sammankopplat med näringsförsörjning och

mjölkproduktion skulle kunna ge bättre möjligheter till att avla mer långsiktigt för högproducerande, fertila, och friska mjölkkor.

Inom husdjursaveln är epigenetiska effekter relativt outforskade. I de fåtal studier som gjorts har man dock kunnat konstatera att moderns metaboliska tillstånd under tidig dräktighet påverkar avkommans framtida fertilitet och egen förmåga att anpassa sig metaboliskt under laktationen. Mödrar med ett bra hullpoäng under dräktigheten tenderar att ge fertila avkommor med god metabolisk anpassningsförmåga. Det förmodas att avkommans fenotyp, beroende på moderns metaboliska tillstånd under embryo- och fosterstadiet, regleras genom förändrat genuttryck. Dessa studier ger dock inga direkta bevis på att den fenotypiska variationen beror på DNA-modifikationer i genomet (Banos et al, 2007; Berry et al, 2008; González-Recio et al, 2012). Däremot har olika präglande gener kunnat associeras med olika kropps-konstitutions- och fertilitetsegenskaper (Magee et al, 2010), vilket visar att epigenetiska mekanismer har en genetisk inverkan på olika egenskaper som är av ekonomisk vikt. Det kan konstateras att mer forskning behövs för att få mer kunskap om hur epigenetiska mekanismer reglerar kons fertilitet, och för att kunna skilja genetiska och epigenetiska mekanismer åt behövs flera studier göras på ett större antal djur över fler generationer. Detta är både ett omfattande och tidskrävande arbete på grund av de långa generationsintervallen hos kor (Singh et al, 2011). Information om epigenomet kan ge ytterligare kunskaper om hur genotyp och fenotyp är sammankopplade. Det kommer i framtiden att bli allt viktigare att kunna identifiera genotyper som är associerade till både gynnsamma och ogynnsamma metyleringar, samt hur de påverkar olika egenskapers funktion (González-Recio, 2012). Eftersom miljön påverkar epigenetiska mekanismer kan det i framtiden komma att bli viktigt att kunna detektera specifika genotyper som är fördelaktiga i vissa miljöer, till exempel olika genotyper för olika utfodrings- eller inhysningssystem.

Slutsats

Olika mått på energibalans är negativt sammankopplade med fertilitet. Såväl indirekta som direkta mått såsom hullbedömning eller plasmakoncentrationen av olika metaboliska hormon och metaboliter, skulle i framtida avelsprogram kunna användas för att förbättra avelsvärderingen för fertilitet hos mjölkkor. Kunskap om epigenetisk reglering kan potentiellt förklara en stor del av den genetiska variation som i nuläget är okänd, vilket troligtvis skulle kunna effektivisera avelsarbetet ytterligare. Mer forskning om både epigenetiska och genetiska samband mellan näringsförsörjning och fertilitet behövs.

Referenser

- Adam, C.L., Gadd, T.S., Findlay, P.A., Wathes, D.C. 2000. IGF-1 stimulation of luteinizing hormone secretion, IGF-binding proteins (IGFBPs) and expression of mRNAs for IFGs, IGF receptors and IGFBPs in the ovine pituitary gland. *Journal of Endocrinology* 166, 247-254.
- Attig, L., Gabory, A., Junien, C. 2010. Early nutrition and epigenetic programming: chasing shadows. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 13, 284-293.
- Banos, G., Brotherstone, S., Coffey, M.P. 2007. Prenatal maternal effects on body condition score, female fertility and milk yield of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90, 3490-3499.
- Banos, G., Coffey, M.P. 2009. Genetic association between body energy measured throughout lactation and fertility in dairy cattle. *Animal* 4:2, 189-199.

- Bastin, C., Loker, S., Gengler, N., Sewalem, A., Miglior, F. 2010. Genetic relationships between body condition score and reproduction traits in Canadian Holstein and Ayrshire first-parity cows. *Journal of Dairy Science* 93, 2215-2228.
- Bauman, D.E., Currie, W.B. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science* 63, 1514-1529.
- Bell, A.W. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science* 73, 2804-2819.
- Berkowicz, E.W., Magee, D.A., Sikora, K.M., Berry, D.P., Howard, D.J., Mullern, M.P., Evans, R.D., Spillane, C., MacHugh, D.E. 2011. Single nucleotide polymorphisms at the imprinted bovine insulin-like growth factor 2 (IGF2) locus are associated with dairy performance in Irish Holstein-Friesian cattle. *Journal of Dairy Science* 78, 1-8.
- Berry, D.P., Buckley, F., Dillon, P., Evans, R.D., Rath, M., Veerkamp, R.F. 2003a. Genetic parameters for body condition score, body weight, and fertility estimated using random regression models. *Journal of Dairy Science* 86, 3704-3717.
- Berry, D.P., Buckley, F., Dillon, P., Evans, R.D., Rath, M., Veerkamp, R.F. 2003b. Genetic relationships among body condition score, body weight, milk yield, and fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86, 2193-2204.
- Berry, D.P., Lonergan, P., Butler, S.T., Cromie, A.R., Fair, T., Mossa, F., Evans, A.C.O. 2008. Negative influence of high maternal milk production before and after conception on offspring survival and milk production in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 91, 329-337.
- Bisinotto, R.S., Greco, L.F., Ribiero, N., Martinez, N., Lima, F.S., Staples, C.R., Thatcher, W.W., Santos, J.E.P. 2012. Influences of nutrition and metabolism on fertility of dairy cows. *Animal Reproduction* 3, 260-272.
- Block, J. 2007. Use of insulin-like growth factor-1 to improve post-transfer survival of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology* 68, 49-55.
- Buckley, F., O'Sullivan, K., Mee, J.F., Evans, R.D., Dillon, P. 2003. Relationships among milk yield, body condition, cow weight, and reproduction in spring-calved Holstein-friesians. *Journal of Dairy Science* 86, 2308-2319.
- Burdge, G.C., Hoile, S.P., Uller, T., Thomas, N.A., Gluckman, P.D., Hanson, M.A., Lillycrop, K.A. 2011. Progressive, transgenerational changes in offspring phenotype and epigenotype following nutritional transition. *PLoS ONE* 6(11): e28282. doi:10.1371/journal.pone.0028282.
- Butler, W.R. 2003. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Production Science* 83, 211-218.
- Clempson, A.M., Pollot, G.E., Brickell, J.S., Bourne, N.E., Munce, N., Wathes, D.C. 2011. Evidence that leptin genotype is associated with fertility, and milk production in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 94, 3618-3628.
- Cummins, S.B., Waters, S.M., Evans, A.C.O., Lonergan, P., Butler, S.T. 2012. Genetic merit for fertility traits in Holstein cows: III. Hepatic expression of somatotrophic axis genes during pregnancy and lactation. *Journal of Dairy Science* 95, 3711-3721.
- Funk-Keenan, J., Atchley, W.R. 2005. Maternal effects, genomic imprinting and evolution. In: *Mouse in animal genetics and breeding research* (ed: Eisen, E.J), 29-56. Imperial coll press, UK.
- Gallo, L., Carnier, P., Cassandro, M., Dal Zotto, R., Bittante, G. 2001. Test-day genetic analysis of condition score and heart girth in holstein friesian cows. *Journal of Dairy Science* 84, 2321-2326.
- Garg, P., Borel, C., Sharp, A.J. 2012. Detection of parent-of-origin specific expression quantitative trait loci by cis-association analysis of gene expression in trios. *PLoS ONE* 7(8): e41695. doi:10.1371/journal.pone.0041695.
- Garverick, H.A., Harris, M.N., Vogel-Bluel, R., Sampson, J.D., Bader, J., Lamberson, W.R., Spain, J.N., Lucy, M.C., Youngquist, R.S. 2013. Concentrations of nonesterified fatty acids and glucose

- in blood of periparturient dairy cows are indicative of pregnancy success at first insemination. *Journal of Dairy Science* 96, 181-188.
- Giuliodori, M.J., Delavaud, C., Chillard, Y., Becú-Villalobos, D., Lacau-Mengido, I., Luzbel de la Sota, R. 2011. High NEFA concentrations around parturition are associated with delayed ovulations in grazing dairy cows. *Livestock Science* 141, 123-128.
- González-Recio, O. 2012. Epigenetics: a new challenge in the post-genomic era of livestock. *Frontiers in Genetics* 2, article 106. doi: 10.3389/fgene.2011.00106.
- González-Recio, O., Ugarte, E., Bach, A. 2012. Trans-generational effect of maternal lactation during pregnancy: A Holstein cow model. *PLoS ONE* 7(12): e51816. doi:10.1371/journal.pone.0051816
- Grummer, R.R. 2007. Strategies to improve fertility of high yielding dairy farms: Management of the dry period. *Theriogenology* 68, 281–288.
- Hjertén, J. 2006. Samband mellan hull, underhudsfett, levande vikt och fruktsamhet hos SRB och SLB. Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjursgenetik, Husdjursagronomprogrammet. Examensarbete 281.
- Jorritsma, R., César, M.L., Hermans, J.T., Kruitwagen, C.L.J.J., Vos, P.L.A.M., Kruip, T.A.M. 2004. Effects of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells and developmental potential of oocytes in vitro. *Animal Reproduction Science* 81, 225-235.
- Kadokawa, H., Blache, D., Martin, G.B. 2006. Plasma leptin concentrations correlate with luteinizing hormone secretion in early postpartum Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 89, 3020-3027.
- Koenen, E.P.C., Veerkamp, R.F., Dobbelaar, P., De Jong, G. 2001. Genetic analysis of body condition score of lactating dutch holstein and red-and-white heifers. *Journal of Dairy Science* 84, 1265-1270.
- Laven, R.A., Scaramuzzi, R.J., Wathes, D.C., Peters, A.R., Parkinson, T.J. 2007. Recent research on the effects of excess dietary nitrogen on the fertility of dairy cows. *Veterinary record* 160, 359-362.
- Lee, R.S.F., Peterson, A.J., Donnison, M.J., Ravelich, S., Ledgard, A.M., Li, N., Oliver, J.E., Miller, A.L., Tucker, F.C., Breier, B., Wells, D.N. 2003. Cloned cattle fetuses with same nuclear genetics are more variable than contemporary half-siblings resulting from artificial insemination and exhibit fetal and placental growth deregulation even in the first trimester. *Biology of Reproduction* 70, 1-11.
- Leifers, S.C., Veerkamp, R.F., Te Pas, M.F.W., Chilliard, Y., Van der Lende, T. 2005. Genetics and physiology of leptin in periparturient dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology* 29, 227-238.
- Llewellyn, S., Fitzpatrick, R., Kenny, D.A., Scaramuzzi, R.J., Wathes, D.C. 2007. Effect of negative energy balance on the insulin-like growth factor system in pre-recruitment ovarian follicles of post partum dairy cows. *Reproduction* 133, 627-639.
- Lodish, H., Kaiser, C.A., Bretcher, A., Amon, A., Berk, A., Krieger, M., Ploegh, H., Scott, P.S. 2013. *Molecular cell biology*, 327-329. Macmillan higher education, Houndmills, Basingstoke. England.
- Lucy, M.C. 2008. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: Implications for post-partum nutrition and reproduction. *Reproduction of Domestic Animals* 43, 31-39.
- Magee, D.A., Sikora, K.M., Berkowicz, E.W., Berry, D.P., Howard, D.J., Mullen, M.P., Evans, R.D., Spillane, C., MacHugh, D.E. 2010. DNA sequence polymorphisms in a panel of eight candidate bovine imprinted genes and their association with performance traits in Irish Holstein-Friesian cattle. *BMC Genetics* 11:93.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A., Sinclair, L.A., Wilkinson, R.G. 2011. *Animal nutrition*, 387-388. Pearson Education, Essex. UK.
- Nicholas, F.W. 2010. *Introduction to veterinary genetics*, 32-35, 224-227. Wiley-Blackwell, West sussex, UK.

- Pryce, J.E., Coffey, M.P., Simm, G. 2001. The relationship between body condition score and reproductive performance. *Journal of Dairy Science* 84, 1508-1515.
- Rodriguez-Martinez, H., Hultgren, J., Båge, R., Bergqvist, A-S., Svensson, C., Bergsten, C., Lidfors, L., Gunnarsson, S., Algers, B., Emanuelson, U., Berglund, B., Andersson, G., Lindhé, B., Stålhammar, H., Gustafsson, H. 2008. Reproductive performance in high-producing dairy cows: can we sustain it under current practice? *IVIS Reviews in Veterinary Medicine, I.V.I.S.* (Ed.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), Last updated: 12-Dec-2008; R0108.1208
- Ruvinsky, A. 1999. Basics of gametic imprinting. *Journal of Animal Science* 77, 228-237.
- Sarkar, M., Schillfarth, S., Schams, D., Meyer, H.H.D., Berisha, B. 2010. The expression of leptin and its receptor during different physiological stages in the bovine ovary. *Molecular Reproduction & Development* 77, 174-181.
- Simm, G. 2010. Genetic Improvement of Cattle and Sheep, 38-40. CABI International, Wallingford, Oxon, UK.
- Singh, K., Molenaar, A.J., Swanson, K.M., Gudex, B., Arias, J.A, Erdman, R.A., Stelwagen, K. 2011. Epigenetics: a possible role in acute and transgenerational regulation of dairy cow milk production. *Animal* 6:3, 375-381.
- Sjaastad, Ø. V., Hove, K., Sand, O. 2010. Physiology of Domestic Animals. 220-258. Scandinavian Veterinary Press, Oslo.
- Spencer, H .G.2002. The correlation between relatives on the supposition of genomic imprinting. *Genetics*, 161, 411–417.
- Stone, R.T., Kappes, S.M., Beattie, C.W. 1995. The bovine homolog of the obese gene maps to chromosome 4. *Mammalian Genome* 7, 399-400.
- Svensk Mjölk. 2012. Husdjursstatistik 2012. <http://www.svenskmjolk.se/Global/Dokument/Dokumentarkiv/Statistik/Husdjursstatistik%202012.pdf>
- Van der Lende, T., Te Pas, M.F.W., Veerkamp, R.F., Leifers, S.C. 2005. Leptin gene polymorphisms and their phenotypic associations. *Vitamins and Hormones* 71, 373-404.
- VanRaden, P. M., Van Tassel, C.P., Wiggans, G.R., Sonstegard, R.D., Schnabel, R.D., Taylor, J.F., Schenkel, F.S. 2009. Invited review: Reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. *Journal of Dairy Science* 92, 16-24.
- VerMilyea, M.D., O'Neill, L.P., Turner, B.M. 2009. Transcription-independent heritability of induced histone modifications in the mouse preimplantation embryo. *PLoS ONE* 4(6): e6086. doi:10.1371/journal.pone.0006086.
- Wathes, D.C., Bourne, N., Cheng, Z., Taylor, V.J., Mann, G.E., Coffey, M.P. 2007a. Multiple correlation analyses of metabolic and endocrine profiles with fertility in primiparous and multiparous cows. *Journal of Dairy Science* 90, 1310-1325.
- Wathes, D.C., Cheng, Z., Bourne, N., Taylor, V.J., Coffey, M.P., Brotherstone, S. 2007b. Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. *Domestic Animal Endocrinology* 33, 203-225.
- Wathes, D.C., Fenwick, M., Cheng, C., Bourne, N., Llewellyn, S., Morris, D.G., Kenny, D., Murphy, J., Fitzpatrick, R. 2007c. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology* 68, 232-241.
- Wathes, D.C. 2012. Mechanisms linking metabolic status and disease with reproductive outcome in the dairy cow. *Reproduction in Domestic Animals* 47, 304-312.
- Wathes, D.C., Clempson, A.M., Pollott, G.E. 2013. Associations between lipid metabolism and fertility in the dairy cow. *Reproduction Fertility and Development* 25, 48-61.

- Wright, F.A., Shabalin, A.A., Rusyn, I. 2012. Computational tools for discovery and interpretation of expression quantitative trait loci. *Pharmacogenomics* 13(3), 343-352.
- Zieba, D.A., Amstalden, M., Williams, G.L. 2005. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: A comparative review. *Domestic Animal Endocrinology* 29, 166-185.
- Zulu, V.C., Nakao, T., Sawamukai, Y. 2002. Insulin-like growth factor-I as a possible hormonal mediator of nutritional regulation of reproduction in cattle. *Journal of Veterinary Medical Science* 64, 657-665.