

ינואר 2025

דו"ח מדעי מסכם לתכנית 362-576 # במימון מועצת החלב

מיפוי ואפיון אתרים כמותיים גנומיים הנמצאים בתאחיזה ליעילות ניצול מזון בפרות חלב מגזע הולשטיין.

### Mapping and characterization of quantitative trait loci (QTLs) associated with feed efficiency in lactating Holstein cows.

מירי כהן- צינדר - חוקרת ראשית, מנהל המחקר החקלאי, המכון לבע"ח, בקר נווה יער, המעבדה ליצרנות מקיימת של מע"ג. [mirico@volcani.agri.gov.il](mailto:mirico@volcani.agri.gov.il)

ד"ר מורן גרשוני – מנהל המחקר החקלאי, המכון לבע"ח [g Moran@vilcani.agri.gov.il](mailto:g Moran@vilcani.agri.gov.il)

ד"ר איל סרוסי – מנהל מחקר החקלאי, המכון לבע"ח. [seroussi@volcani.agri.gov.il](mailto:seroussi@volcani.agri.gov.il)

ד"ר אריאל שבתאי – מנהל מחקר החקלאי, המכון לבע"ח, בקר נווה יער, המעבדה ליצרנות מקיימת של מע"ג [shabtay@volcani.agri.gov.il](mailto:shabtay@volcani.agri.gov.il)

#### תקציר

ייעול היצרנות של חיות משק מהווה אתגר עולמי ראשון במעלה. הגידול המתמיד באוכלוסייה, תחרות על מזון בין חיות משק לאדם, ושינויים גלובליים אקלימיים, דמוגרפיים וסוציאוקונומיים, מכתבים גידול ניכר בדרישה למוצרים מן החי. מכיוון שעלויות המזון הן המרכיב העיקרי מסך כל ההוצאות, שיפור ניצול המזון מהווה בשנים האחרונות יעד מרכזי במחקר החקלאי.

בישראל מונה עדר החלב הארצי כ-120 אלף פרות, עם עלות הזנה יומית של כ-25 ₪ לראש. שיפור יעילות ניצול המזון בכ-10% (שווה ערך להפחתת צריכה יומית בכ-0.9 ק"ג), יכול לחסוך כ-110 מיליון ₪ בשנה. אולם, במשקי החלב בארץ קיים נכון להיום קושי לאסוף נתוני ניצול המזון, בשל עלויות הגבוהות ומורכבות בתפעול של מערכות הזנה פרטניות. כתוצאה מכך לא קיים בעדרי החלב המסחריים בישראל כלי יישומי למדידה פרטנית של ניצול המזון בפרות חלב. טיפוח גנטי הוא אמצעי יעיל לשיפור ניצול המזון, על בסיס הבדלים גנומיים בין בע"ח שונים פנוטיפית. הטיפוח הגנטי ממונף בשנים האחרונות בין היתר הודות להתפתחות טכנולוגיות מתקדמות לקביעת גנוטיפים בהיקף גדול, במהימנות גבוהה ובעלויות נמוכות יחסית.

בעבודה הקדמית אותה ביצענו לפני מספר שנים, מיפנו אתרים גנומיים כמותיים (את"כים; QTL) שנמצאו באסוציאציה עם מדדי ניצול המזון, התנהגות אכילה ותחלובה בפרות חלב מעדר בית דגן. המיפוי בוצע באמצעות שבב ייעודי של בקר המכיל 777K סמנים גנטיים מסוג SNPS אשר נקבעו על גבי דנ"א של 19 פרות יעילות ביותר ו-20 הכי פחות יעילות עפ"י מדדי RFI ו-FCR. במסגרת המחקר הנוכחי, הממומן ע"י מועצת החלב, ביקשנו על בסיס אותם ממצאים ראשוניים (Cohen-Zinder et al., 2016) להמשיך ולאפיין אתרים קיימים לצד חדשים הנמצאים בתאחיזה למדד יעילות ניצול המזון, באוכלוסיית הפרות החולבות של רפת בית דגן (נוסף על 19 ו-20 פרות יעילות ושאינן יעילות בהתאמה, שכבר מופו). לשם כך, ביקשנו לנצל את המערכת לניטור

צריכת מזון פרטנית הקיימת בבית דגן, בעלת 42 עמדות, ולסרוק את גנום הבקר למיפוי סמנים הנמצאים בתאחיזה לתכונות הקשורות ביעילות ניצול המזון. שני המדדים העיקריים לנצילות מזון הינם: *residual feed intake* (RFI) ו-*feed conversion ratio* (FCR).

במסגרת המחקר הנוכחי, קבענו גנוטיפים באמצעות השבב של הבקר (המכיל 777K סמנים גנטיים מסוג SNPS) לפרות חלב מעדר בית דגן (N=205). לפרות אלה אופיינו נדדי נצילות מזון, RFI ו-FCR ובוצעו מבחני תאחיזה אשר הצביעו על QTL מרכזי למדד נצילות מזון RFI הממוקם בכרומוזום 14 אשר מוקם בסביבת הגן *Fatty acid binding protein 4* (FABP4). בהינתן RFI הינה תכונה מורכבת הן מבחינת ניטור צריכת מזון פרטנית והן מבחינת הפרופיל הגנטי, ביקשנו לבחון את מהימנות השיטה בה השתמשנו לקביעת גנוטיפים בקנ"מ רחב עבור פולימורפיזמים בגן זה. מתוך מספר פולימורפיזמים להם נקבעו גנוטיפים בעבר (Cohen-Zinder et al., 2019) בחרנו את *FABP4\_4* הממוקם באקסון 2 של הגן ומשנה חומצה אמינית בעמדה 74 מ ל *L* (missense mutation). פולימורפיזם נוסף, *FABP4\_5* הממוקם באיזור הפרומוטור (-373bp) באתר המקודד לפקטור שיעתוק C/EBP המעורב בתהליכים הקשורים במטבוליזם האנרגיה ואדיפוגנזה (אלל A) או פקטור שעתוק המעורב בתהליכי עקת חמצון (אלל G) נבחו אף הוא; הגנוטיפים של פולימורפיזמים *FABP4\_4* ו-*FABP4\_5* אלה נקבעו באמצעות טכנולוגיית HRM ו-*allelic discrimination assay* בהתאמה. לשם כך, ביצענו הערכה מחדש באמצעות *imputation* (אימפוטציה) המתבססת על נתוני ריצוף גנומי שמקורם ב *BeadChip* של הבקר וב *Whole Genome Sequencing* (WGS). ובאמת מצאנו כי השיטת ה-*imputation*, המתבססת על הפלוטיפים שנצפו באוכלוסיות ייחוס יתרון ניכר על פני השיטות האחרות לקביעת גנוטיפים (Gershoni et al., 2022). התוצאות שהתקבלו אכן תמכו בהשקפה כי RFI הינו תכונה מורכבת וכי החיפוש אחר וריאציית הרצף הסיבתית (*causing polymorphism*) שבבסיס התכונה, דורש להמשיך ולפתח שיטות סטטיסטיות נוספות אשר לוקחות בחשבון אינטראקציות אדפטיביות של יותר משני אתרים (*loci*) המשפיעים על התכונה. באמצעות ה-*imputation* מצאנו חוסר הסכמה בין הגנוטיפים שנקבעו במקרים מסויימים עבור חלק מהפרות, בין השיטות הקודמות (HRM, *Allelic discrimination*) ובין השיטה הנוכחית (Gershoni et al., 2022). עוד מצאנו כי לאותם וריאנטים גנומיים בגן *FABP4* אשר נמצאו בתאחיזה למדד ה- RFI בעגלי הולשטיין ובפרות אפקט נמוך יותר מזה שהוערך בתחילה. אפקט גבוה יותר התקבל באמצעות שיטת ה-*imputation* עבור פולימורפיזם שנמצא בגן *ZHX2* הממוקם אף הוא בכרומוזום 14, עליו נמצאים מספר QTLs לנצילות. בטבלה 5 מוצגים כלל הפולימורפיזמים אשר מופו בקרבת הגן או בתוכו על פני מקטע של 115Kbp כפי שנקבע על בסיס הגנום של 19 פרי עלית מהעדר הישראלי.

ממצאי עבודתנו מאשרים את הקביעה כי מעבר להיותה תכונה מורכבת ביותר למדידה, RFI הינה תכונה מורכבת גם מבחינה גנומית, ואינה מבוססת ע"י מופע של גן יחיד (*major gene*) בדומה למתקבל בתכונות אחרות, למשל תכולות חלבון ושומן בחלב. בשל כך, עלינו להמתין עם שילובה באינדקס הטיפוח עד הופעתן של שיטות סטטיסטיות-גנומיות מתאימות יותר של קביעת גנוטיפים בקנ"מ רחב. עם הופעתן של אלה (בעתיד הקרוב עם התקדמות השימוש בטכנולוגיות AI), יכולים ממצאי עבודה זו לשמש בסיס למיפוי הקדמי של מרכיבים גנומיים הקשורים ליעילות ניצול המזון ולטיפוח עתידי מבוסס סמנים בעדר ההולשטיין הישראלי.

- 1) סריקה גנומית באמצעות שבב דנ"א ייעודי לבקר של הפרות שנבדקו למדדי היעילות, למיפוי Quantitative trait Loci הנמצאים בתאחיזה עם ממדי נצילות מזון (RFI ו FCR).
- 2) קביעה פרטנית של יעילות ניצול מזון : חישוב מדדי RFI ו-FCR בפרות חלב מבית דגן.
- 3) ניטור התנהגות האכילה של הפרות באמצעות מערכת ההאבסה הפרטנית, למציאת מתאמים בינה ובין יעילות ניצול המזון.
- 4) קביעת גנוטיפים דומה של גנום אבות וסבים מצד האם של הפרות הנבחנות, לאיתור כוון האפקט (מעלה או מוריד) של האללים של האת"כים שימופו, וחישוב ערך טיפוחי חזוי.
- 5) איתור גנים מועמדים באיזורי האת"כים, המעורבים במסלולים ביולוגיים שיכולים להשפיע על יעילות ניצול מזון (למשל מסלולים מטבוליים שונים).

## תוצאות

קביעת גנוטיפים. עד כה, נקבעו גנוטיפים באמצעות שבב הדנ"א של אילומינה הכולל 777 אלף סמנים גנטיים ל 205 פרות במצטבר מרפת בית דגן (מתוך 300 – 350 פרות אליהן כיוונו). קביעת הגנוטיפים בוצעה ע"י חברת Neogene שבארה"ב, בעלות של כ 600 ש"ח לדוגמה. (סך העלות עומד עד כה על 123 אלף ש"ח. בשל המימון הנמוך יחסית של תכנית המחקר, 63 אלף ש"ח לשנה (47 אלף ש"ח בלבד בניכוי 25% תקורה), נאלצנו לממן את היתרה ששולמה עבור genotyping, כ 76 אלף ש"ח מכספי מחקר אחרים שלא דרך התכנית הנוכחית).

בוצעה בקרת איכות לגנוטיפים שהתקבלו מ Neogene. פרות עם גנוטיפים בפחות מ 90% מהסמנים וסמנים עם גנוטיפים בפחות מ-90% מהפרות הוחרגו מהאנליזה (מעל 10% גנוטיפים חסרים מעוררים חשד לגבי איכות הדנ"א). בשלב השני, הוחרגו מתוך הסמנים שנשמרו, סמנים עם שכיחות אלל משני קטנה מ-1%, ועם סטייה מובהקת מאד משווי המשקל של הרדי-ווינברג ( $P \leq 0.001$ ).

איסוף ועיבוד פנוטיפים. במקביל לקביעת הגנוטיפים, בוצעה עבודה מעמיקה של בקרת איכות על הנתונים הפנוטיפיים אשר התקבלו ממאגר הנתונים של רפת בית דגן (יהושב בן מאיר, עוזי מועלם ושמאי יעקובי), והוכנה רשימה מפורטת של הניסויים שבהם השתתפה כל אחת מהפרות לה בוצע מיפוי גנטי, לבדיקת השפעת ההיסטוריה על תוצאות הניסויים (אהוד ליפקין ושמאי יעקובי). הפרות שויכו לחמישה מחקרים שונים, כולל 2-3 טיפולי הזנה למחקר. הנתונים הפנוטיפיים שנאספו עבור מגוון תכונות של יעילות ניצול מזון, תכונות איכות חלב והתנהגות אכילה שימשו למיפוי QTLים ראשוני של RFI ו-FCR (אהוד ליפקין), במודל מתוקן להיסטוריה של הפרה במידת הצורך, לתחלובה ולקבוצת הזנה.

אפיון QTLים - באנליזה גנטית ראשונית (אודי ליפקין) בוצע מבחן מגמה (Trend test) לתאחיזה בין כל סמן ששרד את בקרת האיכות לכל תכונה, בהתחשב בתחלובה, גיל ותקופת הניסוי. מתוך כלל הסמנים שנבחנו, 1,134 ו-578 סמנים היו מובהקים מאד ל-RFI ו-FCR בהתאמה ( $P \leq 0.001$ ). מספר QTLים נמצאו בתאחיזה לתכונות אלו (טבלה 1), 70 ו 36 עבור RFI ו FCR בהתאמה, כאשר 12 חפיפות נמצאו בין ה QTLים של

שתי תכונות אלה. הללו הצטרפו לסדרת QTLים נוספים שהתקבלו עבור פנוטיפ צריכת מזון (DMI), התנהגות אכילה ותכונות איכות ותנובת חלב כמתואר (טבלה 2). בטבלה 3 מוצגים QTLים חופפים לתכונות השונות בחלוקה לכרומוזומים.

**טבלה 1.** פיזור QTLים למדדי נצילות מזון – RFI ו FCR בפרות חלב (n=203) מרפת בית דגן בחלוקה לפי כרומוזומים. Chr – chromosome; RFI – residual feed intake; FCR –Feed conversion ratio.

Chr	RFI	FCR	Chr	RFI	FCR	Chr	RFI	FCR
1	16	1	11	2	1	21	2	
2	14	8	12	1	4	22	2	3
3	2		13	5	3	23	1	1
4	2	2	14	4		24	1	
5			15	2	1	25		
6	5	4	16			26		4
7	6	1	17	1	1	27	1	
8			18	1	1	28		
9	3	5	19	1		29	1	
10	2		20	1		X	1	

**טבלה 2.** מספרי QTLים למדדי נצילות מזון – RFI ו FCR בפרות חלב (n=203) מרפת בית דגן.

Trait	Units	Details	QTLs
DMI	Dry matter intake	Kg/day	41
Eating rate	Eating rate	g DM/min	38
Rumination	Rumination	Min./day	78
Feeding duration	Feed time	Min./day	21
Lying	Recumbence	Min./day	32
MY	Milk yield	kg/d	47
PP	Milk protein	%	153
FP	Milk fat	%	107
LP	Milk lactose	%	123
ECM	Energy corrected milk	Kg/day	45
FCM	Fat corrected milk	Kg/day	50

RFI	Residual feed intake		70
FCR	Feed conversion ratio	ECM/DMI	36

**טבלה 3.** QTLים חופפים לתכונות השונות בחלוקה על פי כרומוזומים, פרות חלב (n=203) מרפת בית דגן.

Chromosome	Trait	Start	End
1	DMI	74,441,512	74,819,051
1	FCM	74,459,840	74,822,552
1	LP	74,502,396	74,681,634
1	Eating rate	74,523,253	74,751,227
3	FCM	100,222,223	100,613,088
3	ECM	100,256,034	100,613,088
3	Eating rate	100,366,807	100,615,337
6	FCM	63,137,386	63,425,495
6	ECM	63,160,626	63,425,495
6	Eating rate	63,285,757	63,404,222
7	ECM	63,980,619	64,220,654
7	FCM	63,994,320	64,279,395
7	FCR	64,008,482	64,180,062
12	Eating rate	31,615,734	31,810,178
12	LP	31,777,676	32,015,769
12	FP	32,011,052	32,459,611
12	PP	56,835,613	57,138,580
12	FP	56,836,362	57,155,219
12	LP	56,993,517	57,185,444
16	RFI	17,252,444	17,496,227
16	DMI	17,261,170	17,444,548
16	FCR	17,297,013	17,450,767
16	RFI	48,225,948	48,502,816
16	DMI	48,236,697	48,495,385
16	FCR	48,378,358	48,496,948
16	MY	55,745,143	56,112,399
16	FCM	55,793,101	56,082,175

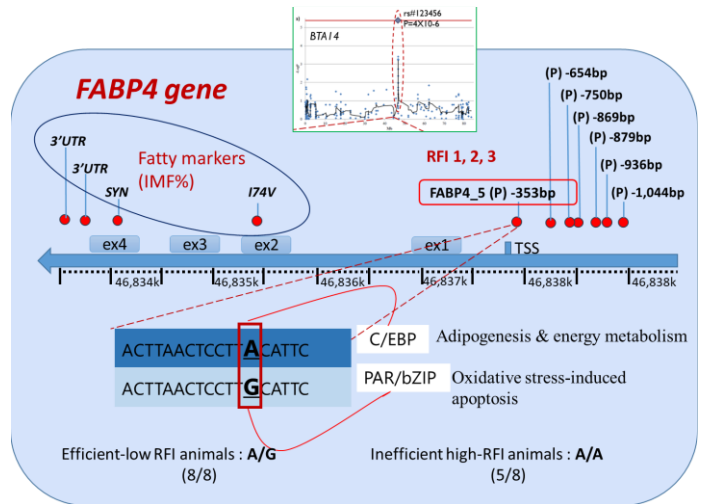
16	ECM	55,793,101	56,095,068
21	ECM	11,985,670	12,393,497
21	FCM	12,031,340	12,393,497
21	DMI	12,085,719	12,386,252
25	DMI	19,760,068	20,039,102
25	ECM	19,793,465	20,019,116
25	FCM	19,828,087	20,020,205

קואורדינטות פיסיקליות (start & end points) נקבעו על בסיס build UCD1.2Q/bosTau9.

אימות קיומו של QTL בגן Fatty acid binding protein 4 (FABP4).

בעבר דיווחנו על מיקומו של QTL הנמצא בתאחיזה ל RFI כמדד לנצילות מזון בעגלים (Cohen Zinder et al., 2016) ובפרות חלב מרפת בית דגן (Cohen Zinder et al., 2019). ספציפית מצאנו כי וריאנטים גנומיים מסוג SNP הממוקמים בגן FABP4, ובאיזור הפרומוטור שלו, אחוזים למדד ה RFI (איור 1). האנליזה הנוכחית, (טבלה 1 – כרומוזום 14), אישרה את מיקומו של ה QTL ל RFI בפרות החלב מעדר בית דגן (מיקום פיסיקלי 44,676,559 - 44,680,947).  
באמצעות השלמת יעד #5 נאתר גנים מועמדים בכלל איזורי ה QTLים שנמצאו אחוזים בתכונות נצילות מזון (RFI ו FCR), המעורבים במסלולים ביולוגיים שיכולים להשפיע על יעילות ניצול מזון (למשל מסלולים מטבוליים שונים).

**איור 1.** אילוסטרציה. וריאנטים גנומיים בגן FABP4 אשר נמצאו בתאחיזה למדד ה RFI בעגלי הולשטיין ובפרות חלב מרפת בית דגן. מיקום הסמן FABP4\_5 באיזור הפרומוטור - מתחילת אתר השיעתוק (TSS). 353bp

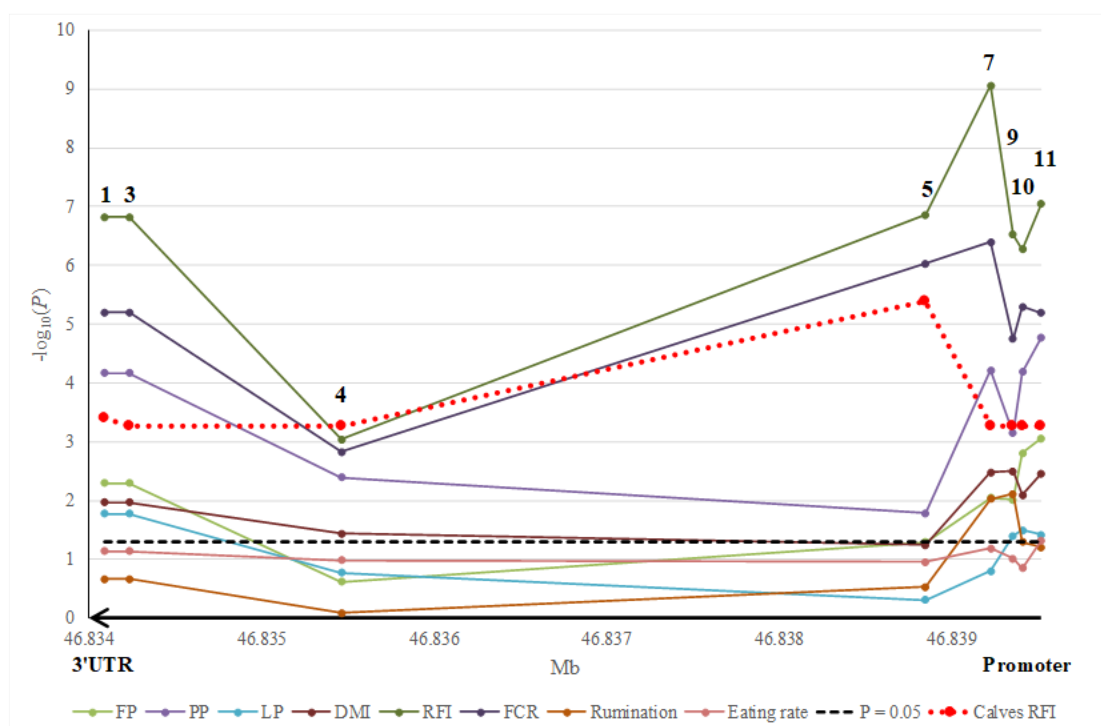


**טבלה 4.** וריאנטים גנומיים מסוג SNPs הממוקמים בגן FABP4 או באיזור הפרומוטור שלו. מרחק הסמנים באיזור הפרומוטור (Distance, bp) הינו מאתר תחילת שיעתוק, \*TSS

SNP	RefSNP	Position	*Distance; bp	Alleles	Location	Effect	Minor MAF
FABP4_1	rs110266999	46,833,693		A <sup>+</sup> /G	3' UTR	G	0.437
FABP4_3	rs110370032	46,833,834		C/T <sup>+</sup>	Exon 4	Sense	C
FABP4_4	rs110757796	46,835,065		A <sup>+</sup> /G	Exon 2	I74V	A
FABP4_5	rs133198078	46,838,452	-353	A <sup>+</sup> /G	Promotor	PTFBS	G

<i>FABP4_7</i>	rs109945001	46,838,829	-750	<b>A/G</b> <sup>+</sup>	Promotor	PTFBS	G	0.489
<i>FABP4_9</i>	rs135761067	46,838,958	-869	<b>C</b> <sup>+</sup> /G	Promotor	PTFBS	G	0.440
<i>FABP4_10</i>	rs135159663	46,839,015	-936	<b>A</b> <sup>+</sup> /G	Promotor		G	0.468
<i>FABP4_11</i>	rs110242361	46,839,123	-1,044	<b>C</b> <sup>+</sup> /T	Promotor	PTFBS	T	0.468

RefSNP, NCBI dbSNP number; Position, bp on chromosome 14 (UMD3.1); Distance, bp between the marker and the previous one; + bold letter, allele improving FE; PTFBS, SNP creates one or more putative transcription factor binding sites (Table 4 in Cohen-Zinder 2016); Minor, minor allele; MAF, minor allele frequency.



**איור 2.** (מתוך Cohen Zinder et al., 2019) - התפלגות אסוציאציות סמן-תכונה בפרות הולשטיין מרפת בית דגן. הסמנים ממוקמים באיזור ה QTL של הגן *FABP4* (ראה מספרי סמנים בטבלה מספר 4 המופיעה מעלה). מוצגות תכונות עם סמן מובהק אחד לפחות ( $P \leq 0.05$ ). מספרי סמן *FABP4* המוצגים מעל השורה העליונה (RFI) חלים על כל הנקודות שמתחתיו. סף מובהקות ( $P = 0.05$ ) מוצג על ידי הקו המקווקו השחור. הקו המקווקו האדום לתוצאות שהתקבלו עבור עגלי הולשטיין זכרים (Cohen Zinder et al., 2016). חץ שחור בציר ה-X מציין כיוון anti-sense.

**FP**, milk fat percentage; **PP**, milk protein percentage; **LP**, milk lactose percentage; **DMI**, daily dry matter intake (kg/d); **RFI**, residual feed intake; **FCR**, feed conversion ratio (ECM/DMI); Ruminations and Eating, minutes/day; Eating rate, g DM/minute.

בחלקו השני של המחקר, ביקשנו לבחון את מהימנותה של קביעת הגנוטיפים (באמצעות HRM ו allelic discrimination) שביצענו בחלק הראשון. לשם כך, ביצענו הערכה מחדש באמצעות imputation (אימפוטציה) המתבססת על נתוני ריצוף גנומי שמקורם ב BeadChip של הבקר וב whole genome Sequencing (WGS). ובאמת מצאנו כי לשיטת ה imputation, המתבססת על הפלוטיפים שנצפו באוכלוסיות

ייחוס יתרון ניכר על פני השיטות האחרות לקביעת גנוטיפים (Gershoni et al., 2022). התוצאות שהתקבלו אכן תמכו בהשקפה כי RFI הינו תכונה מורכבת וכי החיפוש אחר וריאציית הרצף הסיבתית (causing polymorphism) שבבסיס התכונה, דורש להמשיך ולפתח שיטות סטטיסטיות נוספות אשר לוקחות בחשבון אינטראקציות אדפטיביות של יותר משני אתרים (loci) המשפיעים על התכונה.

הערכת הגנוטיפים באמצעות imputation מצאה חוסר הסכמה בין הגנוטיפים שהתקבלו עבור חלק מהפרות (Gershoni et al., 2022). עוד מצאנו כי לאותם וריאנטים גנומיים בגן *FABP4* אשר נמצאו בתאחיזה למדד ה RFI בעגלי הולשטיין ובפרות חלב (איור 1; טבלה 4, איור 2) אפקט נמוך יותר מזה שהוערך בתחילה (Cohen-Zinder et al., 2019). אפקט גבוה יותר התקבל באמצעות שיטת ה imputation עבור פולימורפיזם שנמצא בגן *ZHX2* (טבלה 5) הממוקם אף הוא בכרומוזום 14 (יחסית בתחילת הכרומוזום). בטבלה 5 מוצגים כלל הפולימורפיזמים אשר מופו בקרבת הגן או בתוכו על פני מקטע של 115Kbp כפי שנקבע על בסיס הגנום של 19 פרי עלית מהעדר הישראלי.

**טבלה 5.** פולימורפיזמים הממוקמים בתוך ובסמיכות לגן *ZHX2* על פני מקטע שאורכו 115Kb בגנום של 19 פרי עלית מעדר ההולשטיין הישראלי. (מתוך Gershoni et al., 2022)

#	SNP	Position <sup>1</sup>	REF <sup>2</sup>	ALT	QUAL
1	BovineHD1400005257	16,732,918	A	G	10298
2	BovineHD1400005258	16,734,878	G	T	9563
3	BTB-00553789	16,736,646	A	G	NA <sup>3</sup>
4	BovineHD1400005260	16,744,026	T	G	12295
5	BovineHD1400005266	16,763,059	G	A	15497
<b>6</b>	<b><i>ZHX2</i> (V163M)</b>	<b>16,791,868</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>3672</b>
7	BovineHD1400005274	16,793,140	T	C	16850
8	BovineHD1400005275	16,797,515	A	G	4502
9	BovineHD1400005278	16,805,570	T	G	7660
10	BovineHD1400005279	16,806,608	T	C	6181
11	BovineHD1400005280	16,808,205	T	G	7005
12	BovineHD1400005283	16,820,652	C	T	14207
13	BovineHD1400005285	16,826,488	G	A	14906
14	BovineHD1400005288	16,834,500	A	G	11416
15	BovineHD1400005291	16,843,796	A	G	13662



<sup>1</sup> Allele position and orientation comply with the plus strand of ARS-UCD1.2 reference build.

<sup>2</sup> Following GATK's VCF format, REF, ALT, and QUAL are the reference or alternative allele, and the Phred-scaled quality score indicates the confidence in the variant called, respectively.

<sup>3</sup> Not Applicable.

**בטבלה 6** מופיעים הפלוטיפים שנקבעו ב *imputation*, עבור המקטע של האתר לגן *ZHX2* בכרומוזום 14, תדירותם במוערכת באוכלוסייה והאפקט שלהם על מדד נצילות המזון RFI. ההפלוטיפ השכיח ביותר הינו GTAGACCATTTTAGGG (תדירות 0.615) ואילו ההפלוטיפ GGATGTTGGCGCAAAT בעל המובהקות האמפירית הגבוהה ביותר  $7.46E-04$ .

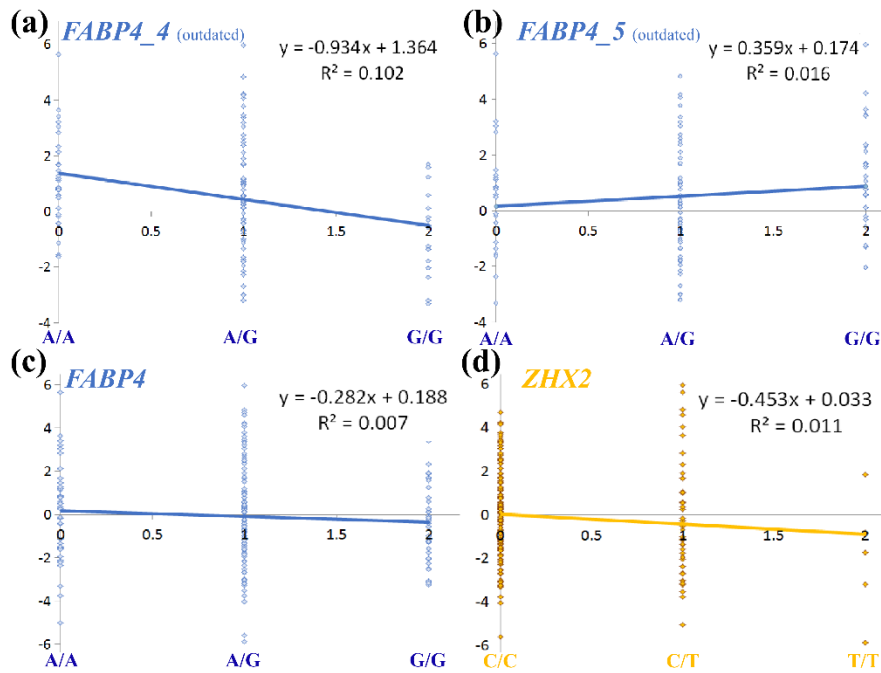
**טבלה 6.** הפלוטיפים שנקבעו ב *imputation* באתר הגן *ZHX2* (מתוך Gershoni et al., 2022)

Haplotype (SNPs 1-16) <sup>1</sup>	Frequency	BETA <sup>2</sup>	STAT	P	EMP2
GTAGACCATTTTAGGG	0.615	0.269	1.29	0.258	0.889
AGATAACCATTTTAGGG	0.103	0.351	0.902	0.343	0.954
AGGTACTGGCGCAAAT	0.072	-0.801	3.37	0.068	0.414
GGATGTTGGCGCAAAT	0.062	-1.8	15.9	9.59E-05	7.46E-04
AGATAATTAGCGCGAAT	0.048	1.17	5.47	0.020	0.148
GGATAATTGTTTCGAGG	0.034	-0.346	0.296	0.587	0.998
AGGTACCATTTTAGGG	0.029	1.16	3.12	0.079	0.464
AGATGCCGGCGCAAAT	0.019	-1.32	1.75	0.187	0.785

<sup>1</sup> SNP order follows Table 5: bold-underscored position 6 is of the *ZHX2* (V163M) SNP.

<sup>2</sup> Following the terminology of PLINK's output for the --hap-linear and --mperm 1000000 options, BETA, STAT, P and EMP2 are the regression coefficient, the coefficient t-statistic, the asymptotic p-value for t-statistic, and the empirical p-value, respectively (after 1,000,000 bootstrapping and correction for multiple testing).

**איור 3.** ממחיש את התרומה המתקבלת מהשיטות השונות לקביעת גנוטיפים בניתוח ה QTL לנצילות מזון שאריתית בכרומוזום 14 עבור הגנים FABP4 (+מוטציות 4,5 בנפרד) ו *ZHX2* (בצהוב). השיפוע החד למשל במוטציה 4 של הגן FABP4 ממחיש את הפער אל מול המתקבל באסוציאציה של הגן עצמו (c) עם RFI כפי שנקבעה ב *imputation*.



**איור 3.** האפקט הנובע מההבדלים בשיטות קביעת גנוטיפים בניתוח ה QTL לנצילות מזון שאריתית RFI בכרומוזום 14. רגרסיה לינארית משמשת לייצור קו המגמה של המתאם בין פרופיל הגנוטיפים בציר ה X ו RFI בציר ה Y. (מתוך Gershoni et al., 2022 – איור 2).

לסיכום, בהיותה מתודולוגיה סטטיסטית, imputation של גנוטיפים יכולה לנבא גנוטיפים של פולימורפיזם בנוקלאוטיד יחיד (SNP) בהתבסס על הפלוטיפים שנצפו באוכלוסיית ייחוס. באמצעות כללי ההורשה המגדלית ועקרונות בסיסיים של גנטיקת אוכלוסיות. מודלים כדוגמת imputation לבניית הפלוטיפים מסתמכים על העובדה שבעלי חיים עם אבות משותפים חולקים הפלוטיפים המשתרעים על פני מרחקים כרומוזומליים משתנים. אם לאוכלוסיית ייחוס יש נתוני ריצוף גנום שלם (WGS) ואוכלוסיית המבחן הקרובה גנוטיפית עבור תת-קבוצה של SNP, סביר להניח שלשתי אוכלוסיות אלו יש דפוסי קשר לא-אקראיים (LD); ולכן ניתן להשתמש בהן כאסטרטגיה גנומית חסכונית להסקת הגנוטיפים במדגם המבחן.

ממצאי עבודתנו מאשרים את הקביעה כי מעבר להיותה תכונה מורכבת ביותר למדידה, RFI הינה תכונה מורכבת גם מבחינה גנומית, ואינה מבוטאת ע"י מופע של גן יחיד (major gene) בדומה למתקבל בתכונות אחרות, למשל תכולות חלבון ושומן בחלב. בשל כך, עלינו להמתין עם שילובה באינדקס הטיפוח עד הופעתן של שיטות סטטיסטיות-גנומיות מתאימות יותר של קביעת גנוטיפים בקנ"מ רחב. עם הופעתן של אלה (בעתיד הקרוב עם התקדמות השימוש בטכנולוגיות AI), יכולים ממצאי עבודה זו לשמש בסיס למיפוי הקדמי של מרכיבים גנומיים הקשורים ליעילות ניצול המזון ולטיפוח עתידי מבוסס סמנים בעדר ההולשטיין הישראלי.

עוד עולה מממצאי עבודה זו כי RFI הינה תכונה מורכבת מבחינה גנומית, ועלינו להמתין עם שילובה באינדקס הטיפוח עד הופעתן של שיטות סטטיסטיות-גנומיות מתאימות יותר של קביעת גנוטיפים.

Cohen-Zinder M., Asher A., Lipkin E., Feingresh R., Karasik D., Agmon R., Brosh A., & Shabtay A. (2016b). FABP4 is a leading candidate gene associated with residual feed intake in growing Holstein calves. *Physiological Genomics*. 48(5):367-76.

Cohen-Zinder, M., Shor-Shimoni, E., Lipkin, E., Ben-Meir, Y., Asher, A., Miron, J., Shabtay Ariel. (2019). *FABP4* gene has a very large effect on feed efficiency in lactating Israeli Holstein Cows. *Physiological Genomics*. 51(10):481-487.

Gershoni M, Shirak A, Ben-Meir Y, Shabtay A, Cohen-Zinder M, Seroussi E. Reevaluation of genotyping methodologies in cattle: The proficiency of imputation. *Genes* 2023, 14(3), 547; <https://doi.org/10.3390/genes14030547>