

Estudio del polimorfismo de los genes GH e IGF-1 en vacas Holando en Uruguay

Study of GH and IGF-1 genes' polymorphism in Holstein cows in Uruguay

Rupprechter G^{1*}, Nicolini P¹, Carriquiry M²,
Meikle A¹, Armstrong E

Recibido: 21/2/2014
Aprobado: 7/4/2014

RESUMEN

En este trabajo se determinaron frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos *AluI* y *SnabI* de los genes que codifican para hormona de crecimiento (GH) y factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) en 308 vacas Holando de cuatro rodeos del Uruguay. El alelo L del gen GH presentó la mayor frecuencia en los tres tambos analizados (0,821, 0,853 y 0,947), mientras que el alelo V se encontró en muy baja frecuencia (0,179, 0,147 y 0,053) en los tambos 1, 2 y 4, respectivamente, determinando la mayor frecuencia para el genotipo LL. El gen IGF-I presentó una distribución más equitativa de alelos: alelo A = 0,609, 0,592, 0,554 y 0,547 y alelo B

SUMMARY

In this study, 308 cows were genotyped for *AluI* (GH) and *SnabI* (IGF-I) polymorphisms and allelic and genotypic frequencies were determined in Holstein cows from four farms of Uruguay. For the GH gene, the L allele was the most frequent in the three dairies sampled (0.821, 0.853 and 0.947), while the V allele was found in low or very low frequency in farms 1, 2 and 4 (0.179, 0.147 and 0.053), leading to a high frequency of the LL genotype. The IGF-I gene showed a more balanced distribution of alleles: allele A = 0.609, 0.592, 0.554 and 0.547; allele B = 0.391, 0.408, 0.446 and 0.453, for farms 1, 2, 3 and 4, respectively. Low and moderate values of heterozygosis

¹ Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Lasplacas 1620, Montevideo, Uruguay. ² Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay. ³ Área Genética, Depto. Genética y Mejora Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay. *Autor para correspondencia. Correo electrónico: gruprechter@adinet.com.uy

= 0,391, 0,408, 0,446 y 0,453 para los tambos 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Se obtuvieron índices bajos o medios de heterocigosidad (H_o mínima = 0,105 para GH en el tambo 4; H_o máxima = 0,554 para IGF-I en la misma población). Los índices F_{IS} fueron bajos a medios, no detectándose desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg. Los valores F_{ST} globales fueron cercanos a cero ($F_{ST} < 0,009$) argumentando a favor de similitud genética entre las poblaciones, siendo las más distantes entre sí las de los tambos 1 y 4 con un F_{ST} de 0,022.

Palabras claves:

polimorfismos - GH-IGF-I - vacas Holando.

were obtained (minimum value $H_o = 0.105$ for GH in farm 4; maximum value $H_o = 0.554$ for IGF-I in the same population). In addition, F_{IS} values were low to moderate and no deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were detected. Global F_{ST} values were very close to zero ($F_{ST} < 0.009$) arguing in favor of observed genetic similarity between populations, being farm 1 and 4 the most distant populations with a F_{ST} 0.022.

Keywords:

polymorphism - GH-IGF-I - Holstein cows.

INTRODUCCIÓN

Uno de los genes más estudiados en producción lechera es el que codifica para la hormona de crecimiento (GH), ya que es conocido su rol en el desarrollo mamario, lactación y regulación del metabolismo (Etherton y Bauman, 1998). Cambios en la secuencia de ADN del gen pueden provocar cambios en la acción hormonal que resulte en diferentes comportamientos productivos. Se ha identificado una variante de este gen: el polimorfismo C/G, que es detectado por la enzima *AluI* (Lucy y col., 1993). Este polimorfismo im-

plica un cambio en la codificación del aminoácido leucina (*Leu*¹²⁷ alelo L) por valina (*Val*¹²⁷ alelo V) en la posición 127 de la molécula de GH (Lucy y col., 1993). La información en relación a la asociación de este polimorfismo con producción/composición de leche es contradictoria. Varios autores han documentado asociaciones positivas (Grochowska y col., 2001; Lucy y col., 1993; Shariflou y col., 2000; Zwierzchowski y col., 2002), mientras que en otros trabajos no se encontró asociación (Balogh y col., 2009; Rupprechter y col., 2011; Yao y col., 1996).

Por otro lado, y en menor grado, se han investigado marcadores moleculares en el gen que codifica para el factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-I) por ser el mediador de la acción de la GH en varios tejidos, incluyendo la glándula mamaria (Schoenle y col., 1982). En este sentido, fue reportado un polimorfismo T/C detectado por *SnaBI* en la región promotora del gen bovino IGF-I, siendo el nucleótido T correspondiente al alelo A y el C al alelo B. Los reportes sobre el efecto de este polimorfismo en la producción y composición de leche también son contradictorios: se han encontrado asociaciones positivas (Ruprechter y col., 2011; Siadkowska y col., 2006) o no se encontró asociación (Hines y col., 1998; Mullen y col., 2011), entre este polimorfismo y variables productivas.

Un paso fundamental para realizar estudios de asociación de polimorfismos con características de importancia productiva es describir las frecuencias génicas y genotípicas y analizar la variabilidad del polimorfismo de interés en las poblaciones a estudiar. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos *AhuI* (GH) y *SnaBI* (IGF-I), analizando su variabilidad en vacas Holando de cuatro tambos de Uruguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se extrajeron al azar muestras de sangre (n = 308) de vacas Holando (Uruguay) clínicamente sanas en tubos BD Vacutainer® (Becton Dickinson, NJ, USA) con anticoagulante (K₂ EDTA), por venopunción coccígea. Las vacas provenían de cuatro tambos: 1 (n = 110), 2 (n = 76) 3 (n = 46) y 4 (n = 76), con una población total de 700, 450, 200 y 110 vacas en ordeño, respectivamente. Los criterios de selección para la compra del semen en cada tambo y su procedencia (nacional o importado) fueron registrados (Cuadro 1).

Las muestras de sangre fueron almacenadas a 4 °C hasta su procesamiento, realizándose la extracción de ADN según el protocolo de Kawasaki (1990). La determinación de los polimorfismos *AhuI* del gen GH y *SnaBI* del gen IGF-I se realizó por PCR-RFLP según Lucy y col. (1993) y Ge y col. (1997), respectivamente. Brevemente, se amplificó un fragmento del gen GH de 427 pares de bases (pb) utilizando los cebadores: 5'-CCGT-GTCTATGAGAAGC-3' (sentido) y 5'-TTCTT-GAGCAGCGCGT-3' (antisentido). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 30 uL conteniendo aproximadamente 100 ng de ADN genómico, 18 pmol de cada cebador, 0,2 mM dN-

Cuadro 1. Número de vacas en ordeño (vacas muestreadas), origen del semen y criterios de selección de cada rodeo

Tambo	Vacas totales (Vacas muestreadas)	Origen del semen	Criterios de selección del semen
1	700 (110)	Nacional (Uruguay) Canadiense Estadounidense	Sólidos totales + en ubre
2	450 (76)	Neocelandés	Sólidos totales Bajo tamaño corporal + en ubre y patas Fertilidad Longevidad + en proteína
3	200 (46)	Estadounidense	Facilidad de parto Menor tamaño
4	110 (76)	Canadiense Estadounidense	Facilidad de parto Precio

TPs, 1,5 mM de $MgCl_2$ y 0,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies, CA, USA). Dicho PCR se llevó a cabo en un termociclador Multi-gene (Labnet Internacional Inc., NJ, USA) y las condiciones de amplificación fueron: 8 min a 95 °C y 32 ciclos de 35 seg a 95 °C, 1 min a 60 °C y 45 seg a 72 °C. Posteriormente, se digirió el producto amplificado (15 μ L) por 3,5 h a 37 °C con 6 U de *A*luI (Fermentas Inc., MD, USA). La separación de los fragmentos de restricción se realizó en gel de agarosa al 2 % con tinción de bromuro de etidio (EtBr) y su visualización se realizó en un transiluminador UV (Cleaver Scientific, Inglaterra). Para el gen IGF-I se amplificó un fragmento de 249 pb utilizando los cebadores: 5'-ATTACAAAGCTGCCTGCCCC-3' (sentido)

y 5'-ACCTTACCCGTATGAAAGGAATATACGT-3' (antisentido). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 10 uL conteniendo aproximadamente 100 ng de ADN genómico, 0,30 uM de cada cebador, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$ y 0,8 U de Taq polimerasa (Invitrogen). La reacción de PCR se llevo a cabo en el termociclador Multigene y el perfil de amplificación fue: 31 ciclos de 94 °C 1 min, 64 °C 1 min y 72 °C 1 min. Posteriormente se digirió el producto amplificado (10 μ L) por 3 h a 37 °C con 5 U de *S*nabI (Fermentas Inc.). La separación de los fragmentos de restricción se realizó en gel de agarosa al 3% con tinción de EtBr y su visualización se realizó en un transiluminador UV (Cleaver Scientific).

Para cada gen se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas, se realizaron pruebas de equilibrio Hardy-Weinberg y de diferenciación génica y genotípica, se calculó la heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) y los índices de fijación o estadísticos F (F_{IS} y F_{ST} , Weir y Cockerham, 1984) utilizando el programa Genepop v4 (Rousset, 2008). Se realizó un análisis de desequilibrio gamético mediante el programa Haploview 4.2 (Barrett y col., 2005). Se consideró $\alpha \leq 0,05$ como nivel de significancia. Debido a problemas de calidad de la reacción de PCR (presencia de una banda inespecífica) para el gen GH en las muestras del tambo 3, éste no fue considerado para el análisis estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se determinó, para cuatro tambos de vacas Holando del Uruguay, las frecuencias alélicas y genotípicas, así como la variabilidad de los polimorfismos *AluI* y *SnabI* de los genes GH e IGF-I, respectivamente, del eje somatotrófico, responsables de la partición de nutrientes para producción de leche (Etherton y Bauman, 1998). El análisis poblacional de los polimorfismos es un paso previo fundamental para realizar posteriores estudios de asociación de po-

limorfismos con características de importancia productiva en las poblaciones de interés.

Para el gen GH, los tres tambos analizados revelan que el alelo de mayor frecuencia fue el L mientras que el alelo V se encontró en muy baja frecuencia. Esto origina una mayor frecuencia del homocigoto LL seguido por el heterocigoto LV, mientras que el homocigoto VV fue de escasa o nula frecuencia (Cuadro 2).

Las frecuencias genotípicas difirieron entre tambos ($P = 0,005$), ya que la frecuencia del homocigoto LL del tambo 4 fue significativamente mayor que la del tambo 1 (0,894 vs. 0,669; $P = 0,001$) y mostró una tendencia a ser mayor que la del 2 (0,894 vs. 0,720; $P = 0,066$). Sin embargo, los tambos 1 y 2 no presentaron diferenciación genotípica. Estos resultados determinaron muy bajos índices de heterocigosidad en el tambo 4 y bajos a medios en los tambos 1 y 2 (Cuadro 3).

Los índices F_{IS} negativos indicarían una leve tendencia hacia el exceso de heterocigotas para este gen en las tres poblaciones analizadas, sin que eso genere desviaciones de lo esperado para el equilibrio Hardy-Weinberg (Cuadro 4).

Los índices F_{ST} son bajos y reflejan la mayor diferencia en las frecuencias alélicas entre los tambos 1 y 4 así como entre los tambos 2 y 4. (Cuadro 5).

Cuadro 3. Heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) para los 2 marcadores analizados en los 4 tambos

Marcador	Tambo	H_o	H_e
<i>AluI</i> (GH)	1	0,302	0,295
	2	0,264	0,252
	4	0,105	0,100
<i>SnabI</i> (IGF-I)	1	0,527	0,478
	2	0,526	0,486
	3	0,413	0,500
	4	0,554	0,498

Cuadro 4. Pruebas de equilibrio Hardy-Weinberg para los polimorfismos *AluI* (GH) y *SnabI* (IGF-I) en cuatro tambos lecheros del Uruguay. Se muestran los resultados (p-valor y error estándar: e.e) correspondientes a cada una de las pruebas estadísticas realizadas: prueba U para deficiencia de heterocigotas y prueba de probabilidad, con 5000 iteraciones en cada caso. Se consideró $\alpha=0.05$ como nivel de significación estadística.

Polimorfismo por población	Prueba estadística			
	Déficit de heterocigotas		Prueba de probabilidad	
	p-valor	e.e.	p-valor	e.e.
<i>AluI</i> (GH)				
1	0.7087	0.0036	1.0000	(-)
2	0.8043	0.0021	1.0000	(-)
4	1.0000	0.0000	1.0000	(-)
<i>SnabI</i> (IGF-I)				
1	0.9026	0.0045	0.3196	(-)
2	0.8363	0.005	0.4868	(-)
3	0.1925	0.0034	0.3682	(-)
4	0.8871	0.0039	0.3578	(-)

Cuadro 5. Matrices de estadísticos FIS y FST de los tambos analizados (FIS en la diagonal, en negrita para cada locus y para todos los loci (Global)

<i>AluI</i> (GH)	1	2	4	
1	-0.025			
2	-0.002	-0.047		
4	0.064	0.043	-0.049	
<i>SnabI</i> (IGF-I)				
	1	2	3	4
1	-0.102			
2	-0.004	-0.083		
3	-0.001	-0.006	0.174	
4	0.022	0.001	-0.008	-0.111
Global				
	1	2	3	4
1	-0.073			
2	-0.003	-0.071		
3	-0.001	-0.006	0.174	
4	0.022	0.009	-0.008	-0.111

Para el gen GH, existen varios reportes internacionales, en sistemas de producción basados en estabulación y alimentación con raciones totalmente mezcladas (TMR), que documentan la asociación positiva entre el genotipo LL y producción y/o composición de leche y/o mérito genético para producción de leche (Furu y col., 1998; Lucy y col., 1993; Shariflou y col., 2000). Asimismo, en un trabajo previo realizado por nuestro grupo de investigación (Ruprecht y col., 2011), que tuvo como objetivo iniciar estudios de asociación de estos marcadores con parámetros productivos y reproductivos, perfiles endocrinos y metabólicos en sistemas de producción basados en pastoreo controlado, se observó que la producción de leche corregida por grasa al 4% (LCG) fue mayor en vacas multíparas con el genotipo LL al inicio de la lactancia. En el presente trabajo observamos una clara predominancia del alelo L en todos los rodeos estudiados, si bien existen diferencias entre los tambos. La frecuencia del alelo L en el tambo 4, se aproxima a los resultados obtenidos en rodeos lecheros norteamericanos (0,92, Lucy y col., 1993) y húngaros (0,89, Balogh y col., 2009). Como este tambo utiliza semen congelado de origen norteamericano y canadiense, es esperable que la frecuencia de dicho alelo se asemeje a la reportada en dichos rodeos. La frecuencia de este alelo encontrada en los tambos 1 y 2 se asemeja

más a la encontrada en rodeos de Australia, Japón y Alemania (0,80, Shariflou y col., 2000). Shariflou y col. (2000) compararon las frecuencias alélicas en diferentes razas de distintos países y argumentaron que la fuerte selección a favor de la producción lechera en rodeos norteamericanos ha provocado una selección indirecta a favor del alelo L y por lo tanto el aumento de su frecuencia, sin embargo nuestros resultados muestran que las poblaciones estudiadas están en equilibrio HW para este gen. Por otro lado, en el tambo 2 se utiliza exclusivamente semen congelado de origen neocelandés, lo que explicaría la menor frecuencia del alelo L en este tambo en comparación con el 4. Esto refleja las diferencias en los objetivos de selección lechera entre estos dos países, Estados Unidos vs. Nueva Zelanda (Harris y Kolver, 2001; Shook, 2006). Estos comentarios estarían apoyados por los índices F_{ST} que reflejan una mayor divergencia genética entre el tambo 4 y las otras poblaciones. En ningún caso estos factores afectan las frecuencias alélicas y genotípicas lo suficiente como para causar desvíos de lo esperado según la hipótesis de equilibrio Hardy-Weinberg.

En el caso del gen IGF-I se observó una distribución más similar de la frecuencia de los alelos A y B siendo, en todos los casos, A de mayor frecuen-

cia que B (Cuadro 2). El genotipo más frecuente fue el heterocigoto AB seguido del AA y por último el BB, no difiriendo sus frecuencias entre tambos ($P = 0,562$). Las frecuencias halladas en este trabajo concuerdan tanto con las reportadas recientemente por nuestro grupo (alelos A y B: 0.59 y 0.41; genotipos AA, AB y BB: 0.31, 0.54 y 0.14, respectivamente) en otras poblaciones Holando de nuestro país (Nicolini y col., 2013), como con las descritas en la literatura (0,55, 0,56 y 0,52 para el alelo A y 0,45, 0,44 y 0,48 para el alelo B) en rodeos Holando estadounidenses (Hines y col., 1998; Li y col., 2004) y polacos (Siadkowska y col., 2006), respectivamente. Se observaron valores medios de heterocigosidad con valores observados y esperados similares, excepto para el tambo 3 (Cuadro 3). En este tambo existió una diferencia notoria entre los valores de heterocigosidad observados y esperados, lo que se refleja en el índice F_{IS} para ese rodeo (Cuadro 5), con un valor medio y positivo, indicando un déficit de heterocigotos en esta población. Sin embargo, este déficit no generó desviaciones de lo esperado para el equilibrio Hardy-Weinberg (Cuadro 4). En los otros tres tambos (1, 2 y 4), los índices F_{IS} también son medios para este gen, pero negativos, indicando una tendencia hacia el exceso de heterocigotos, aunque esto tampoco determina desvíos de lo esperado bajo una situación

de equilibrio génico (Cuadro 4). Los valores de F_{ST} son cercanos a cero, reflejando la alta similitud observada entre las poblaciones muestreadas (Cuadro 5). Los reportes de la asociación del genotipo IGF-I con producción de leche son escasos y no concluyentes. Siadkowska y col. (2006) argumentan a favor del genotipo AB que tendió a ser superior a los genotipos AA y BB en producción de LCG y de sólidos totales, mientras que Hines y col. (1998) y Mullen y col. (2011) no encontraron asociaciones entre este polimorfismo y variables productivas. En un estudio previo de nuestro grupo de investigación realizado en los 2 tambos 1 y 2 analizados en el presente trabajo (Ruprechter y col., 2011) se encontró una tendencia ($P = 0,09$) a mayor producción de LCG en vacas del genotipo AB respecto a las de genotipo AA en promedio durante toda la lactancia y respecto a las de genotipo BB en lactancia media (120 días de lactancia). Asimismo, en dicho trabajo también encontramos una asociación entre *SnabI*-IGF-I y el intervalo parto-primer servicio, siendo las vacas portadoras del genotipo AB las del menor intervalo en relación a las del genotipo BB. Estos hallazgos, sumados a los resultados reportados por nuestro grupo en otras poblaciones Holando de nuestro país (Nicolini y col., 2013), que indican que vacas con genotipo AA reinician antes la ciclicidad posparto, sostienen

la importancia del gen IGF-I en producción y reproducción en vacas lecheras.

El número de individuos de acuerdo a las com-

binaciones alélicas de los dos marcadores moleculares presentes en cada tambo se detalla en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Número de animales para cada combinación posible de los genotipos de los genes GH (LL, LV y VV) e IGF-I (AA, AB y BB) en tres tambos

Población		LL	LV	VV
1	AA	32	5	0
	AB	30	23	1
	BB	11	3	0
2	AA	17	4	0
	AB	23	14	0
	BB	9	0	1
4	AA	19	1	0
	AB	36	5	0
	BB	11	2	0

Debido a la escasa (tambos 1 y 2) o nula (tambo 4) frecuencia de homocigotas VV en las distintas poblaciones, se observa la ausencia de los individuos VVAA y VVBB en el tambo 1, y de los individuos VVAA, VVAB y LVBB en el tambo 2. El estudio de la frecuencia de combinaciones genotípicas no indicó evidencia de la existencia de desequilibrio gamético entre los alelos de ambos loci ($D' = 0,322$, $LOD = 1,12$, $r^2 = 0,027$), es decir, no se puede afirmar que estas combinaciones

alélicas son heredadas en forma dependiente o no.

Aparte del presente trabajo y otro estudio reciente de nuestro grupo (Nicolini y col., 2013), no hemos encontrado reportes del estudio de estos polimorfismos en vacas Holando en Uruguay. Sí existen reportes de caracterización génica de la raza Holando Uruguayo utilizando los grupos sanguíneos como marcadores moleculares (Kelly y col., 2002). En dicho trabajo se concluyó que

existiría una disminución de la variabilidad genética en la siguiente generación y una gran similitud entre las poblaciones de Holstein Norteamericano y Holando Uruguayo. En el presente estudio los índices F_{IS} fueron en general bajos a moderados en las distintas poblaciones, no registrándose una deficiencia de heterocigotos, excepto en el caso del tambo 3 para IGF-I. Por otra parte, para el gen GH la elevada frecuencia del alelo L y del genotipo LL indicarían pérdida de diversidad genética para este marcador. Los valores de F_{ST} globales son muy cercanos a cero argumentando a favor de la similitud genética entre las poblaciones, siendo el tambo 4 el más divergente de todos debido probablemente al origen del semen y al menor número de padres utilizados. La población del tambo 4 tendería a ser más semejante a la población norteamericana, estando de acuerdo con lo reportado por Shariflou y col. (2000) y Kelly y col. (2002), tendencia lógica teniendo en cuenta el origen del semen utilizado en este tambo.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se desprende que la casi fijación del alelo L del polimorfismo *AluI* (GH) en los cuatro tambos estudiados, limitaría el espacio para su utilización en estudios de aso-

ciación con miras a aplicarlo como marcador en un posible programa de selección asistida. En el caso del marcador *Snabi* (IGF-I), dadas las frecuencias génicas y genotípicas obtenidas en el presente trabajo, sería posible realizar estudios de asociación con parámetros de interés productivo en las poblaciones analizadas.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio recibió la financiación del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA FPTA 214).

BIBLIOGRAFÍA

1. Balogh O, Kovács K, Kulcsár M, Gáspárdy A, Zsolnai A, Kátai L, Pécsi A, Fésüs L, Butler WR, Huszenicza Gy. (2009). *AluI* polymorphism of the bovine growth hormone (GH) gene, resumption of ovarian cyclicity, milk production and loss of body condition at the onset of lactation in dairy cows. *Theriogenology* 71:553–559.
2. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263-265.
3. Etherton TD, Bauman DE. (1998). Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic

- animals. *Physical Rev* 78:745-761.
4. Furu LM, Katzmer GW, Zinn SA, Rycroft H. (1998). Somatotropin Mspl and Alul polymorphism's relative to indicators of the genetic merit of Holstein AI sires. *J Anim Sci* 76:75-78.
 5. Ge W, Davis ME, Hines HC. (1997). Two SSCP alleles detected in the 5'-flanking region of bovine IGF1 gene. *Anim Genetics* 28:155-156.
 6. Grochowska R, Sorensen P, Zwierzchowski L, Snochowski M, Lovendahl P. (2001). Genetic variation in stimulated GH release and in IGF-I of young dairy cattle and their associations with the leucine/valine polymorphism in the GH gene. *J Anim Sci* 79: 470-476.
 7. Harris BL, Kolver ES. (2001). Review of Holsteinization on intensive pastoral dairy farming in New Zealand. *J Dairy Sci (Suppl.)* 84: E56-E61.
 8. Hines HC, Ge W, Zhao Q, Davis ME. (1998). Association of genetic markers in growth hormone and insulin like growth factor I loci with lactation traits in Holstein. *Anim. Genetics* 29 (suppl 1): 69.
 9. Kawasaki ES. (1990). Simple preparation from blood, cells and others fluids. In: MA Innis, DH Gelfand, JJ Snisky, TJ White (ed) *PCR Protocols. A guide to Methods and application*. New York: Academic Press pp 3-12.
 10. Kelly EL, Mortari N, De Andrés D, Postiglioni A. (2002). Estudio de la estructura genética de la raza Holando Uruguayo mediante marcadores genéticos. *Comparación intraracial*. *Veterinaria* 37:7-14.
 11. Li C, Basarab J, Snelling WM, Benkel B, Murdoch B, Hansen C, Moore SS. (2004). Assessment of positional candidate genes *myf5* and *IGF1* for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of *Bos taurus*. *J Anim Sci* 82:1-7.
 12. Lucy MC, Hauser SD, Eppard PJ, Krivi GG, Clark JH, Bauman DE, Collier RJ. (1993). Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. *Domest Anim Endocrinol* 10:325-333.
 13. Mullen MP, Berry DP, Howard DJ, Diskin MG, Lynch CO, Giblin L, Kenny DA, Magee D A, Meade KG, Waters SM. (2011). Single nucleotide polymorphisms in the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) gene are associated with performance in Holstein-Friesian dairy cattle. *Front Gene* 2:3. doi: 10.3389/fgene.2011.00003.
 14. Nicolini P, Carriquiry M, Meikle A. (2013). A polymorphism in the Insulin-like growth factor-1 gene is associated with postpartum resumption of ovarian cyclicity in Holstein-Friesian dairy cows under grazing conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica* 55:1-8.
 15. Rousset F. (2008). Genepop v4: a complete re-implementation of the genepop software for Win-

- dows and Linux. *Mol Ecol Res* 8:103-106.
16. Ruprechter G, Carriquiry M, Ramos JM, Pereira I, Meikle A. (2011). Metabolic and endocrine profiles and reproductive parameters in dairy cows under grazing conditions: effect of polymorphisms in somatotropic axis genes. *Acta Veterinaria Scandinavica* 53:35-44.
 17. Schoenle E, Zapf J, Humbel RE, Froesch ER. (1982). Insuline like growth factor I stimulates growth in hypophysecomized rats. *Nature* 296:252-253.
 18. Shariflou MR, Moran C, Nicholas FW. (2000). Association of the Leu (127) variant of the bovine growth hormone (bGH) gene with increased yield of milk, fat, and protein in Australian Holstein-Friesians. *Australian J Agric Res* 51:515-522.
 19. Shook GE. (2006). Major advances in determining appropriate selection goals. *J Dairy Sci* 90:1349-1361
 20. Siadkowska E, Zwierzchowski L, Oprzadek J, Strzalkowska N, Bagnicka E, Kryzyzewski J. (2006). Effect of polymorphism in IGF-I gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle. *Anim Sci Pap Rep* 3: 225-236.
 21. Weir BS, Cockerham CC. (1984). Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evol* 38:1358-1370.
 22. Yao J, Aggrey SE, Zadworny D, Hayes JF, Kuhnlein U. (1996). Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk protein traits in Holsteins. *Genetics* 144:1809-1816.
 23. Zwierzchowski L, Krzyzewski J, Strzalkowska N, Siadkowska E, Ryniewicz Z. (2002). Effects of polymorphism of growth hormone (GH), Pit-1, and leptin (LEP) genes, cow's age, lactation stage and somatic cell count on milk yield and composition of Polish Black-and-White cows. *Anim Sci Pap Rep* 20: 213-227.