

Marcadores moleculares de hormona de crecimiento y factor de crecimiento similar a la insulina-I como predictores del desempeño productivo en vacas Holando bajo condición pastoril*

Ruprechter, G.¹; Nicolini, P.¹; Meikle, A.¹; Carriquiry, M.²

RESUMEN

El uso de marcadores moleculares de ADN para el mejoramiento genético asistido en lechería ha aumentado significativamente a nivel mundial y es incipiente en nuestro país. Sin embargo no existen reportes sobre la validación de los mismos en condiciones pastoriles. En este estudio se determinan las frecuencias de variantes génicas de hormona de crecimiento (GH) y factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I) y su asociación con variables productivas (producción y composición láctea) en sistemas de base pastoril. Se genotipean 161 vacas Holando de una, dos y tres lactancias, provenientes de dos tambos comerciales, para variantes de los genes GH e IGF-I, utilizando la técnica de PCR-RFLP. La frecuencia del alelo L del gen GH fue 0.84 y la del alelo V de 0.16. Para el gen IGF-I las frecuencias fueron 0.60 y 0.40 para los alelos A y B, respectivamente. Las variantes de GH e IGF-I no se asocian con ninguna variable relacionada con producción o composición de leche, a diferencia de estudios a nivel internacional, sugiriendo que los marcadores moleculares deben ser validados en los sistemas de producción de leche donde serán utilizados.

Palabras Clave: SNP, producción de leche, vaca

SUMMARY

The use of DNA molecular markers for genetic improvement has substantially increased in the dairy industry worldwide and is increasing in Uruguay. Nevertheless, there are no reports regarding the validation of these markers under grazing conditions. In this study, genotype frequencies of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its association with productive parameters (milk production and composition) under grazing conditions were investigated. Holstein cows (n=161) of one, two, and three lactations from two commercial farms were genotyped for GH and IGF-I using PCR-RFLP. Frequency for L allele of GH gene was 0.84 and for allele V was 0.16. For IGF-I gene frequencies were 0.60 and 0.40 for A and B alleles, respectively. Variants of GH and IGF-I were not associated with any variable of milk production or composition, in contrast to international studies, suggesting that molecular markers should be validated in the production system in which they will be utilized.

Key words: SNP, milk production, cow

INTRODUCCIÓN

A nivel internacional los avances relativamente recientes en las áreas de genética molecular, estadística y bioinformática han permitido mejorar el entendimiento de los factores genéticos que controlan la producción. Los marcadores genéticos constituyen posiciones físicas en un cromosoma que permiten determinar el genotipo animal y monitorear su herencia, siendo ejemplo de ellos los SNP (polimorfismos en un solo nucleótido) y los RFLP (polimorfismos del largo de fragmentos de restricción). Si bien el uso de polimorfismos de genes específicos asociados a la productividad del ganado lechero es utilizado en varios países para la selección genética, en nuestro país es incipiente.

Uno de los genes más estudiados es el gen que codifica para la hormona de crecimiento (GH) ya que es conocido su rol en el desarrollo mamario, lactación y regulación del metabolismo (Bauman y Currie, 1980; Etherton y col., 1998). Los reportes sobre la asociación de marcadores moleculares de GH con producción y/o composición de leche son abundantes (Furu y col., 1998; Lucy y col., 1993; Lee y col., 1996; Shariflou y col., 2000). Se han encontrado diferentes variantes del gen GH, siendo una de las más importantes el cambio del nucleótido citosina (C) por guanina (G), que es reconocido por la enzima de restricción *Arthrobacter luteus* I (*AluI*) (Lucy y col., 1993). Esto determina un cambio en la codificación del aminoácido leucina (*Leu*¹²⁷) por

valina (*Val*¹²⁷) en la posición 127 de la molécula de GH (Seavey y col., 1971). En ganado Holando en Estados Unidos y Australia, se encontró una asociación del alelo L (leucina) con caracteres de mayor producción láctea, kg proteína y/o kg grasa y/o aumento de mérito genético en vacas seleccionadas (Lucy y col., 1993; Lee y col., 1996; Shariflou y col., 2000). De forma opuesta, otros reportes han favorecido al alelo V (valina) (van der Werf y col., 1996) o no han encontrado asociación entre los genotipos y algún carácter productivo de interés (Balogh y col., 2009). Los reportes respecto a los mecanismos propuestos de esta acción diferencial son contradictorios: Schlee y col. (1994) observaron que el genotipo LL se asociaba con concentra-

¹Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay.

²Departamento de Producción animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.

ciones de GH en sangre más altas que el genotipo LV en vacas frisón alemán. Por otro lado, vacas Holstein inyectadas con la forma recombinante Val-127 bST (hormona de crecimiento bovina) producían más leche que las inyectadas con la forma Leu-127 bST (Eppard y col., 1992).

El factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I) es mediador de la acción de GH en varios tejidos, incluyendo la glándula mamaria (Schoenle y col., 1982). Un polimorfismo identificado como una transición de timina (T) a citosina (C) fue reportado en la región promotora del gen bovino IGF-I, siendo el nucleótido T el correspondiente al alelo A y el nucleótido C el correspondiente al alelo B. En ganado de carne (Aberdeen Angus) se reportó que el genotipo BB se asoció con menores niveles de IGF-I en sangre (Ge y col., 2001). A nivel internacional los datos reportados sobre polimorfismos de IGF-I son contradictorios: Siadkowska y col. (2006) reportaron que el genotipo AB produce mayor cantidad de leche corregida por grasa y sólidos totales que los genotipos AA y BB, mientras que Hines y col. (1998) no encontraron asociaciones con variables productivas.

No hemos encontrado estudios respecto a la frecuencia y/o asociación de estos SNPs en nuestra región, ni tampoco en nuestro país. Sin embargo, los kits de diagnóstico molecular están disponibles en nuestro país y son comercializados sin conocer si realmente estos marcadores moleculares tienen valor predictivo en nuestras condiciones. La producción de una vaca lechera va a estar dada por su genética y el medio ambiente al que esta sometida. Nuestro sistema de producción difiere sustancialmente de los sistemas de estabulación por lo que consideramos de capital importancia la evaluación de dichos marcadores. La hipótesis del presente trabajo plantea que la asociación entre los genotipos de GH e IGF-I y la producción de leche reportada en condiciones de estabulación se mantiene en situaciones pastoriles de producción. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es investigar la frecuencia de las variantes de los genes GH e IGF-I en rodeos lecheros de nuestro país y estudiar su asociación con producción y composición de leche.

MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo experimental fue aprobado y realizado de acuerdo a las pautas de experimentación animal de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Universidad de la República.

Animales

Se utilizaron 161 vacas de raza Holando de dos tambos comerciales (tambo 1 y tambo 2) seleccionados al azar entre aquellos animales con datos de producción y composición de leche de por lo menos 9 meses de lactancia. En el tambo 1, ubicado en el departamento de Colonia, se analizaron vacas primíparas ($n = 103$), mientras que en el tambo 2, ubicado en el departamento de Flores, se estudiaron vacas de segunda y tercera lactancia ($n = 58$).

En el tambo 1, los animales pastorearon en un verdeo de raigrás (*Lolium multiflorum*) en la mañana y en una pradera de alfalfa (*Medicago sativa*) en la tarde y recibieron además una ración totalmente mezclada compuesta en promedio de 12 kg de ensilaje de maíz planta entera, 5 kg de grano húmedo de maíz y 2 kg de expeller de girasol. La dieta ofrecida presentaba 16–18 % de proteína cruda y 1.7 Mcal/kg MS de energía neta de lactación. En el tambo 2, la alimentación durante la lactancia consistió en promedio en pastoreo sobre praderas de leguminosas y gramíneas (37 kg/animal/d de oferta de forraje) y suplementación con 1.2 kg de silo de sorgo de planta entera y 6.5 kg de concentrado (principalmente sorgo de grano húmedo). La dieta ofrecida presentaba de 16–18 % de proteína cruda y 1.5 Mcal/kg MS de energía neta de lactación. En ambos tambos las dietas fueron formuladas para satisfacer los requerimientos (NRC, 2001).

En ambos tambos los animales fueron ordeñados 2 veces por día y una vez por mes se realizaron controles lecheros hasta el fin de la lactancia (34 semanas de lactación), registrándose la producción y composición de leche (grasa y proteína obtenida de los controles lecheros realizados en el laboratorio Colaveco).

Extracción de ADN y genotipado de GH e IGF-1

Para la obtención de ADN se extrajeron 6 ml de sangre por venopunción coccígea con tubos BD Vacutainer® (Becton Dickinson, NJ, USA) con anticoagulante (K_2 EDTA), los cuales fueron almacenados a 4 °C hasta su procesamiento. El ADN se aisló de sangre entera según protocolo de Kawasaki (1990).

Las variantes L y V del gen GH fueron detectadas utilizando la técnica PCR-RFLP (reacción en cadena de la polimerasa - polimorfismo del largo de fragmentos de restricción) descrita por Lucy y col. (1993). Se amplificó un fragmento del gen GH de 427 pares de bases (pb) utilizando los cebadores: 5'-CCGTGCTATGAGAAGC-3' (sentido) y 5'-TTCTTGAGCAGCGCGT-3' (antisentido). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 30 μ l conteniendo aproximadamente 100 ng de ADN genómico, 18 pmol de cada cebador, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM de $MgCl_2$ y 0.5U de Taq polimerasa (Invitrogen, CA, USA). La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Multigene (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 6U de *AluI* (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).

Las variantes A y B del gen IGF-I fueron detectadas utilizando la técnica PCR-RFLP descrita por Ge y col. (1997). Se amplificó un fragmento del gen IGF-I 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 μ l conteniendo aproximadamente 100 ng de ADN genómico, 0.30 μ M de cada cebador, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM de $MgCl_2$ y 0.8U de Taq polimerasa (Invitrogen, CA, USA). La reacción de PCR se llevó a cabo en un 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 µl) por 3 h a 37° C con 5U de *SnaBI* (Fermentas Inc., MD, USA). 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.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2009). Las variables evaluadas (producción y composición de leche) fueron analizadas mediante un modelo mixto, usando un análisis de medidas repetidas en el tiempo (PROC MIXED). El modelo estadístico utilizado fue:

$$y_{ijklm} = \frac{\text{genotipo}_i + \text{tambo}_j + \text{lactancia anidada en tambo}_k + \text{semana posparto}_l + \text{interacción genotipo x semana posparto}_{ixl} + \text{error}_{ijklm}}{\text{genotipo x semana posparto}_{ixl} + \text{error}_{ijklm}}$$

Los efectos fijos fueron el genotipo de GH e IGF-I, establecimiento (tambo), la categoría animal/lactancia (primera, segunda y tercera lactancia) anidada en tambo, la semana posparto y la interacción genotipo x semana posparto. Como efecto aleatorio se consideró el animal anidado dentro del tambo. Se utilizó la estructura de covarianza autorregresiva de primer orden y los grados de libertad se ajustaron por el método de Kenward-Rogers. La fecha de parto se incluyó como covariable en el modelo en la medida que la misma resume variables ambientales y de manejo (temperatura, lluvias, fotoperíodo, variaciones en pasturas y alimentos concentrados, etc.) no controladas en el estudio. El equilibrio Hardy-Weinberg para las frecuencias alélicas, así como las diferencias de las frecuencias genotípicas y alélicas entre tambos y número de lactancias se analizaron usando la prueba de χ^2 . Se consideró significativo cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS

Fragmentos de digestión con *AluI* (GH) y *SnaBI* (IGF-I)

El producto de amplificación del gen GH fue de 427 pb. La digestión de este producto con *AluI* dió lugar a una banda de

264 pb en todos los casos, y a los siguientes fragmentos, que permitieron diferenciar los genotipos: 147 pb (genotipo VV), 96 pb y 51 pb (genotipo LL) y 147 pb, 96 pb y 51 pb (genotipo LV) (Figura 1). En todos los casos existió un fragmento no visible de 16 pb. En 13 animales el genotipo de GH no pudo ser determinado debido a la imposibilidad de obtener el producto amplificado de PCR.

El producto de la amplificación del gen de IGF-1 fue de 249 pb. La digestión del producto de PCR con *SnaBI* dió lugar a una banda de 223 pb para el homocigota AA (TT) y dos bandas de 249 pb y 223 pb para el heterocigota AB (TC), mientras que el homocigota BB (CC) permaneció sin digerir (249 pb) (Figura 2). En los genotipos AA y AB existió una banda de 26 pb indetectable por electroforesis.

Frecuencias alélicas y genotípicas de GH e IGF-I

Las frecuencias alélicas para GH e IGF-I se encontraron en equilibrio de Hardy Weinberg ($P = 0.97$). Las frecuencias de los alelos L y V de GH fueron 0.84 y 0.16, respectivamente y no difirieron ($P > 0.28$) entre tambos ni entre número de lactancias. El genotipo homocigoto LL fue el más común entre los animales estudiados, seguido del heterocigoto LV, mientras que el homocigoto VV fue el de menor proporción en ambos tambos (Cuadro 1). Las frecuencias de los alelos A y B del gen IGF-I fueron 0.60 y 0.40, respectivamente y no difirieron ($P > 0.70$) entre tambos ni entre número de lactancias. El genotipo AB fue el de mayor frecuencia en los animales estudiados, siendo el genotipo BB el de menor frecuencia en ambos tambos (Cuadro 1).

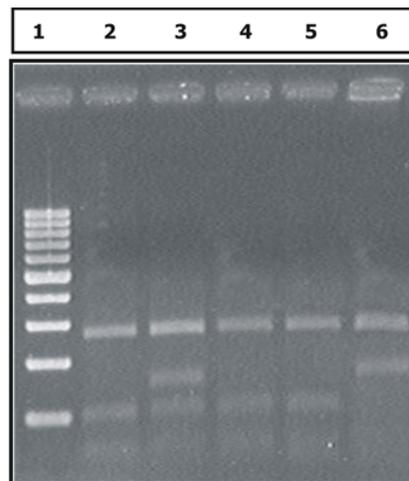


Figura 1. RFLP-*AluI* en gel de agarosa de los genotipos de GH. Canal 1: Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas). Canales 2, 4 y 5: genotipo LL (264, 96 y 51 pb); canal 3: genotipo LV (264, 147, 96 y 51 pb); canal 6: genotipo VV (264 y 147 pb). El fragmento de 16 pb presente en todos los genotipos es indetectable.

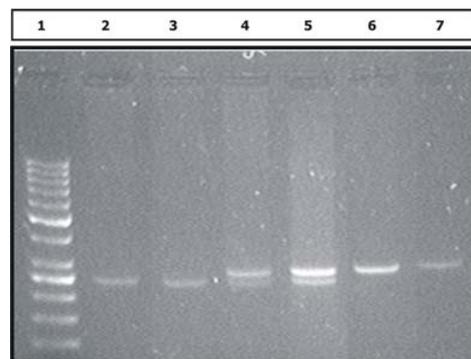


Figura 2. RFLP-*SnaBI* en gel de agarosa de la región 5'- no codificante del gen IGF-I bovino. Canal 1: Marcador de peso molecular 50 pb (Fermentas); canales 2 y 3: genotipo AA (223 pb); canales 4 y 5: genotipo AB (249 y 223 pb); canales 6 y 7: genotipo BB (249 pb). El fragmento de 26 pb presente en los genotipos AA y AB es indetectable.

Cuadro 1. Número de animales y frecuencia (%) de los genotipos de GH e IGF-I.

	Genotipo GH			Genotipo IGF-I		
	LL	LV	VV	AA	AB	BB
N° Animales	104	41	3	54	86	21
%	70	28	2	34	53	13

Efecto de los genotipos de GH e IGF-I sobre composición y producción de leche

Debido a que el genotipo VV del gen GH se encontró en muy baja proporción (2%), no se incluyó en los análisis estadísticos. No se encontró asociación de los genotipos de GH con la producción de leche o de sólidos totales ni con los contenidos de grasa y proteína durante la lactancia. Tampoco existió una interacción significativa entre el genotipo de

GH y la semana posparto en ninguna de las variables estudiadas. Los promedios de todas las variables productivas de interés acorde a los genotipos de GH se presentan en el Cuadro 2. De manera similar, ni los genotipos de IGF-I ni la interacción de IGF-I con la semana posparto afectaron la producción de leche o de sólidos totales ni los contenidos de grasa y proteína durante la lactancia (Cuadro 3).

Cuadro 2. Efecto del genotipo de GH en producción y composición de leche durante las 34 semanas posparto.

	Genotipo GH			P>F
	LL	LV	P>F	
Número de animales	104	41		
Leche (kg/d)	19.9±0.24	19.6±0.39		0.48
Grasa (%)	3.58±0.04	3.66±0.06		0.22
Proteína (%)	3.32±0.02	3.30±0.03		0.60
Grasa (kg/d)	0.70±0.009	0.72±0.01		0.67
Proteína (kg/d)	0.65±0.007	0.64±0.01		0.37
Sólidos totales (kg/d)	1.36±0.01	1.35±0.02		0.37

Cuadro 3. Efecto del genotipo de IGF-I en producción y composición de leche durante la lactancia.

	Genotipos IGF-I			P>F
	AA	AB	BB	
Número de animales	54	86	21	
Leche (kg/d)	19.8±0.36	19.9±0.28	19.2±0.52	0.44
Grasa (%)	3.57±0.05	3.64±0.04	3.55±0.07	0.40
Proteína (%)	3.33±0.03	3.32±0.03	3.33±0.04	0.91
Grasa (kg/d)	0.70±0.01	0.72±0.01	0.68±0.02	0.18
Proteína (kg/d)	0.65±0.01	0.65±0.008	0.63±0.01	0.27
Sólidos totales (kg/d)	1.35±0.02	1.37±0.02	1.31±0.03	0.19

Independientemente de los genotipos de GH e IGF-I, la producción de leche aumentó gradualmente desde el parto hasta la semana 10 posparto, manteniéndose la producción hasta la semana 26, para luego disminuir hacia el final de la lactancia (Figuras 3 y 4, panel superior). Las vacas de primera lactancia produjeron una media de 18.6 ± 0.4 L y las de segunda lactancia 18.9 ± 0.7 L, siendo este valor menor que el producido por las vacas de tercera lactancia que presentaron un promedio de 22.9 ± 0.7 L. Los porcentajes de grasa y proteína disminuyeron gradualmente luego del parto. Se observó un aumento de los sólidos totales hacia la semana 18 posparto y una disminución hacia la semana 30 posparto (Figuras 3 y 4, panel inferior). El aumento de sólidos totales no es tan importante como la producción de leche, debido a la mayor concentración de grasa y proteína en leche al inicio de lactancia.

DISCUSIÓN

Este es el primer reporte en la región sudamericana pastoril de producción de leche que investiga la asociación de marcadores moleculares con caracteres de producción y composición de leche. Si bien los datos se consideran preliminares, el número de animales estudiados y los resultados obtenidos sugieren que estos polimorfismos de GH e IGF-I no predicen el comportamiento productivo de vacas lecheras en pastoreo controlado.

En este trabajo se encontró una frecuencia del alelo L de 0.84 vs 0.16 del alelo V, para el gen GH. Estos resultados coinciden con los reportados por Shariflou y col. (2000) que reportó en un rodeo Holstein Frisian australiano una frecuencia de 0.83 y 0.17 para los alelos L y V, respectivamente. En ese estudio se comparó poblaciones Holando de distintos países, encontrándose que la frecuencia del alelo L era significativamente menor en Australia, Japón y Alemania (frecuencia del alelo L: 0.80) que la encontrada en rodeos estadounidenses y canadienses (frecuencia del alelo L: 0.92), sugiriendo que la mayor presión de selección genética a favor del aumento de la producción láctea en Norte América implicaría una selección indirecta a favor del alelo L. La industria lechera en Uruguay importa una considerable cantidad de semen con-

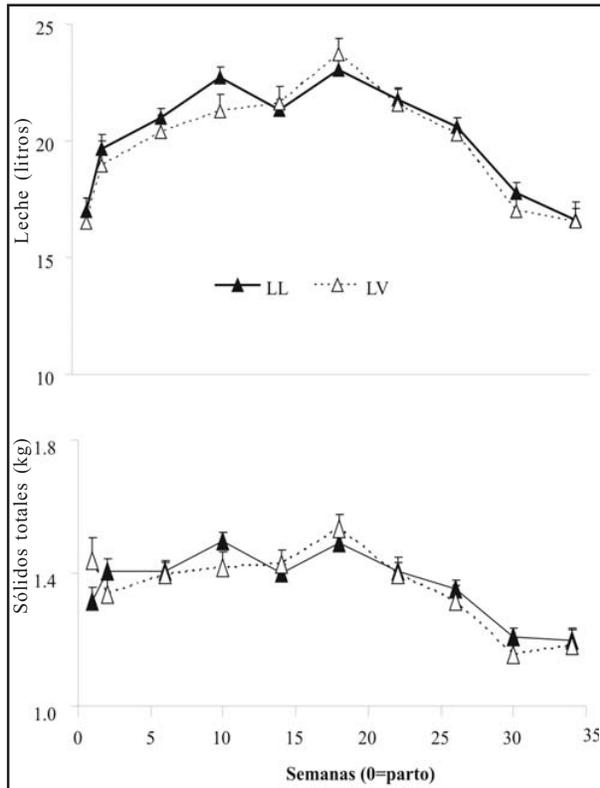


Figura 3. Producción de leche (litros/día, panel superior), sólidos totales (kg/día, panel inferior) de los genotipos LL y LV del gen GH durante las 34 semanas luego del parto (n=145).

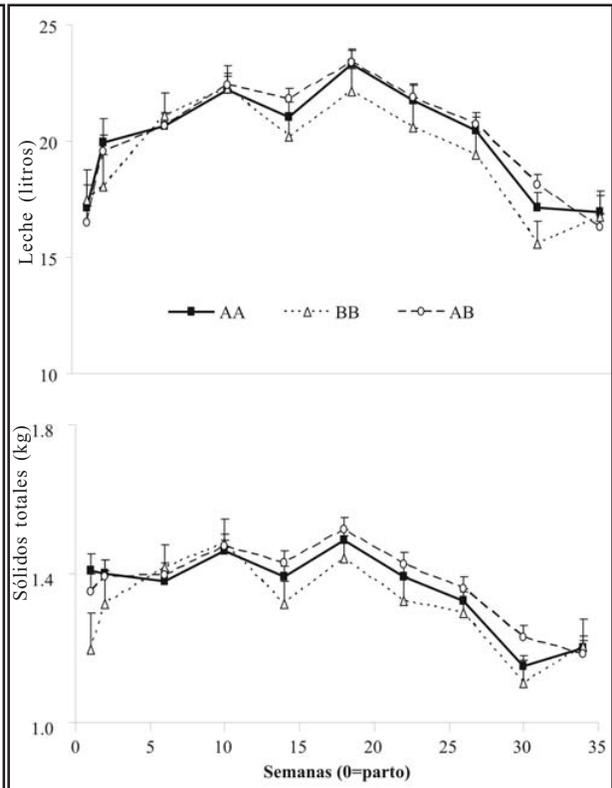


Figura 4. Producción de leche (litros/día, panel superior), sólidos totales (kg/día, panel inferior) de los genotipos AA, AB y BB del gen IGF-I durante las 34 semanas luego del parto (n=161).

gelado de Norte América por lo que es esperable en un futuro que la frecuencia de este alelo se asemeje cada vez más a la de los rodeos norteamericanos.

Las frecuencias encontradas para los alelos del gen IGF-I fueron de 0.60 para el alelo A y 0.40 para el alelo B. Reportes similares se encontraron para rodeos estadounidenses y polacos de ganado Holando: 0.55, 0.56 y 0.52 para el alelo A; 0.45, 0.44 y 0.48 para el alelo B, respectivamente (Hines y col., 1998, Li y col., 2004 y Siadkowska y col., 2006).

Los resultados del presente estudio indican que las variaciones alélicas del gen GH no afectan la producción de leche, grasa y proteína. En contraparte, varios trabajos han documentado asociaciones positivas entre producción y/o composición de leche y/o mérito genético y la variante LL en rodeos lecheros Holando bajo sistemas de estabulación (Furu y

col., 1998; Lucy y col., 1993; Lee y col., 1996; Shariflou y col., 2000). Sin embargo, los resultados del presente trabajo coinciden con los hallazgos de Yao y col. (1996) quienes no pudieron establecer relación entre mérito genético para producir leche y el polimorfismo detectado por *Alul* en el gen GH. Se ha sugerido que la acción del alelo L varía acorde a los diferentes estados fisiológicos, presentando un efecto aditivo al principio de la lactación y un efecto dominante en el resto de la lactancia (Shariflou y col., 2000). En nuestro trabajo no se observó este efecto, así como tampoco un efecto diferencial acorde a la categoría animal ya que animales de una, dos o tres lactancias se comportaron de forma similar.

Tampoco se encontró un efecto de los diferentes genotipos de IGF-I sobre alguna variable productiva. En acuerdo con nuestros resultados, Hines y col. (1998)

no encontraron ninguna asociación entre las variantes de IGF-I y producción de leche. Sin embargo, Siadkowska y col. (2006) reportaron que el genotipo AB tendió a ser superior a los genotipos AA y BB sobre leche corregida por grasa y sólidos totales, debido a que el porcentaje de grasa y proteína fue mayor. Ambos reportes fueron realizados bajo condiciones de estabulación y con raciones totalmente mezcladas y no hemos encontrado más reportes sobre la asociación de las variantes del gen IGF-I y producción y/o composición de leche.

Los resultados obtenidos para ambos genes en el presente estudio sugieren que estos dos marcadores moleculares no son buenos indicadores para producción y composición de leche en nuestras condiciones de producción. Adicionalmente a la falta real de asociación entre un marcador molecular y características produc-

tivas, la falla en la validación de asociaciones reportadas previamente puede ser debido al número finito de animales y a las frecuencias alélicas en la población estudiada, así como a las condiciones ambientales y/o manejo de dicha población (Van Eenennaam y col. 2007). La interacción genotipo x ambiente o los efectos epistáticos pueden ser otras de las posibles razones entre las inconsistencias de los resultados en diferentes poblaciones (Dekkers, 2004). Finalmente, como en el caso de GH en nuestra población, existen situaciones en que la frecuencia de un genotipo es tan baja

(VV) que no existe una oportunidad real para evaluar su efecto sobre las características productivas como ha sido reportado previamente por van Eenennaam y col (2007). A su vez, la alta frecuencia del alelo L de GH en nuestro rodeo nacional limita, además, su uso en programas de selección asistida por marcadores moleculares.

Por último, los contradictorios y/o escasos reportes generados a nivel internacional, del uso de estos marcadores moleculares para producción de leche que además son bajo estabulación, indican la necesidad

de validarlos en los sistemas productivos donde vayan a ser utilizados.

CONCLUSIONES

Los polimorfismos de los genes que codifican para GH e IGF-I detectados por *AluI* y *SnaBI*, respectivamente no parecen ser marcadores útiles para predecir las variables de interés en producción de leche en las poblaciones y sistemas pastoriles evaluados.

Agradecimientos

A la señora Marlene Gómez Porto por su colaboración técnica.

Referencias bibliográficas

- Balogh, O.; Kovács, K.; Kulcsár, M.; Gáspárdy, A.; Zsolnai, A.; Kátai, L.; Pécsi, A.; Fésüs, L.; Butler, WR.; Huszenicza, G.** (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.
- Bauman, DE. y Currie, WB.** (1980). Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J. Dairy Sci*, 63: 1514-1529.
- Dekkers, J. C.** (2004). Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. *J. Anim. Sci.* 82 E-Suppl: E313-E328.
- Eppard, P.J.; Rogan, G.J.; Boysen, B.G.; Miller, MA.; Hintz, R.L.; Hammond, B.G.; Torkelson, A.R.; Collier, R.J.; Lanza, G.M.** (1992). Effect of high doses of a sustained-release bovine somatotropin on antibody formation in dairy cows. *J Dairy Sci*. 75:2959-2967.
- Etherton, TD.; Bauman, DE.** (1998) Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol Rev*. 78:745-761.
- Furu, LM.; Kazmer, G.W.; Zinn, SA.; Rycroft, H.** (1998) Somatotropin *MspI* and *AluI* polymorphism's relative to indicators of the genetic merit of Holstein AI sires. *J. Anim. Sci.*, 76 (Suppl.1):75 (Resumen).
- Ge, W.; Davis, ME.; Hines, HC.; Irvin, KM.; Simmen, RCM.** (2001). Association of a genetic marker with blood serum insulin – like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle. *J. Anim. Sci.* 79:1757-1762.
- Ge, W.; Davis, ME.; Hines, HC.** (1997). Two SSCP alleles detected in the 5'-flanking region of bovine IGF1 gene. *Anim Genet*. 28:155-156.
- 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. Genet*. 29:69 (Resumen).
- Kawasaki, E.S.** (1990). Simple preparation from blood, cells others fluids. In: MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White (ed) *PCR Protocols. A guide to Methods and application* pp 3-12. Academia Press, New York.
- Li, C.; Basarab, J.; Snelling, WM.; Benkel, B.; Murdoch, B.; Hansen, C.; Moore, S. S.** (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.
- Lee, BK.; Lin, GF.; Crooker, BA.; Murtaugh, MP.; Hansen, LB.; Chester-Jones, H.** (1996). Association of somatotropin (bST) gene polymorphism at the 5th exon with selection for milk yield in Holstein cows. *Dom. Anim. Endocrinol.* 13:373-381.
- Lucy, MC.; Hauser, SC.; Eppard, P.J.; Krivi, GG.; Clark, JH.; Bauman, E.; Collier, R.J.** (1993). Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. *Dom. Anim. Endocrinol.* 10:325-333.
- National Research Council.** (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th Rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.
- Schlee, P.; Gramll, R.; Schallenberger, E.; Schams, D.; Rottmann, O.; Ollbrich-Bludau, A.; Pirchner, F.** (1994). Growth hormone and insulin like growth factor I concentrations in bulls of various growth hormone genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 88:497-500.
- Seavey, BK.; Singh, RNP.; Lewis, UK.** (1971). Bovine growth hormone: evidence for two allelic forms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43:189-195.
- Shariflou, MR.; Moran, C.; Nicholas, FW.** (2000). Association of the bovine growth hormone (bGH) gene with increased yield of milk, fat, and protein in Australian Holstein-Friesians. *Aust. J. Agric. Res.* 51:515-522.
- 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.* 24:225-237.

Van der Werf, JHJ; Verburg, FJ.; Garssen, GJ. (1996). Evidence for a strong effect of the AluI polymorphism in the growth hormone gene on yield characteristics in dairy cattle. In: Proc 47th Meeting EAPP. Lillehammer, Norway 1:310 (Resumen).

Van Eenennaam, AL; Li, J.; Thallman, RM; Quaas, R.L; Dikeman, ME; Gill, CA; Franke, DE; Thomas, MG. (2007). Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. J. Anim. Sci. 85: 891-900.

Yao J., Aggrey S.E., Zadworny D., Hayes J.F., 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.