

## Efecto de la transición timina/citosina del gen BGH sobre parámetros reproductivos en ganado Holstein en Colombia

### Effect of thymine/cytosine transition BGH gene on reproductive parameters in Holstein cattle in Colombia

Juliana Arango<sup>1\*</sup>, José J. Echeverri<sup>1</sup> y Albeiro López<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Producción Animal, Grupo BIOGEM, Sede Medellín, AA 1779, Colombia. \*correo electrónico: jarangog@unal.edu.co.

#### RESUMEN

La rentabilidad de los hatos lecheros depende en gran medida del mantenimiento de una alta eficiencia reproductiva. Una reproducción adecuada permite mayor producción de leche durante la vida del animal. El objetivo del trabajo fue determinar la asociación del polimorfismo del intrón 3 de la hormona de crecimiento bovino (BGH), con el número de servicios, días abiertos e intervalo entre partos en vacas de raza Holstein del departamento de Antioquia. El estudio se realizó con 415 vacas, ubicadas en 8 municipios del departamento de Antioquia. La genotipificación se llevó a cabo usando la técnica de PCR-RFLP con DNA extraído de sangre periférica mediante la técnica de salting out. La información fenotípica utilizada, fue recopilada durante 4 años, a partir de un programa de control de producción lechera vigente en los hatos. Para la asociación se realizaron análisis estadísticos con métodos paramétricos. Las frecuencias alélicas para los alelos (+) y (-) fueron 0,91 y 0,09. Las frecuencias genotípicas fueron (0,77), (0,2) y (0,03) para (+/+), (+/-) y (-/-) respectivamente. Se presentaron diferencias significativas entre las medias de los días abiertos, intervalo entre parto y número de servicios; para todas estas características los animales portadores del genotipo (+/+) tuvieron los parámetros menos favorables. Los resultados indican asociación del polimorfismo del intrón 3 de la hormona de crecimiento bovino con el número de servicios al primer parto, intervalo entre parto y los días abiertos facilitando la selección de estos genotipos para su utilización en programas de mejoramiento genético y reproductivo.

**Palabras clave:** PCR, RFLP, marcadores genéticos, reproducción.

#### ABSTRACT

The profitability of dairy herds depends largely on maintaining a high reproductive efficiency. Proper playback allows increased milk production over the life of the animal. The objective was to determine the association of the polymorphism of intron 3 of the bovine growth hormone (BGH), with the number of services, open days and calving interval in Holstein cows Antioquia department. The study was conducted with 415 cows, located in 8 municipalities of Antioquia. Genotyping was performed using the PCR-RFLP with DNA extracted from peripheral blood by salting out technique. The phenotypic data used was collected during four years, from a current control program in dairy herds. For the association Statistical analyzes were performed using methods paramétricos. The allelic frequencies for alleles (+) and (-) were 0.91 and 0.09 respectively. The genotype frequencies were (0.77), (0.2) and (0.03) for (+/+), (+/-) and (-/-) respectively. The significant differences between the means of the open days, calving interval and number of services; for all these features animals carrying the genotype (+/+) had the least favorable parameters. The results indicate association of the polymorphism of intron 3 of the bovine growth hormone with the number of services at first calving, calving interval and days open facilitating the selection of these genotypes for use in breeding programs and genetic improvement.

**Key words:** PCR, RFLP, genetic markers, reproduction.

Recibido: 02/02/15 Aprobado: 18/02/1616

## INTRODUCCIÓN

La rentabilidad de los hatos lecheros depende en gran medida del mantenimiento de una alta eficiencia reproductiva. Una reproducción adecuada permite una mayor producción de leche durante la vida del animal, y el mayor beneficio de esta eficiencia se obtiene cuando la mayoría de las vacas tienen su primer parto alrededor de los 24 meses de edad, paren en intervalos de 13 a 13,5 meses, y pasan la mayor proporción de su vida en la fase de lactancia.

Procesos biológicos como el crecimiento y la reproducción son eventos importantes, controlados por la interacción de varias hormonas polipeptídicas. La hipófisis es una de las glándulas más importantes del cuerpo ya que segrega las hormonas que rigen dichos procesos vitales entre ellas la hormona de crecimiento bovino, BGH, (Le *et al.*, 2001).

La BHG, es uno de los principales factores que regulan el crecimiento posnatal y desempeña un papel crítico en el desarrollo de la glándula mamaria, la lactancia y la fertilidad en el ganado (Jiang y Lucy, 2001; Renaville *et al.*, 2002; Lucy, 2008; Mullen *et al.*, 2010). En las últimas décadas, el objetivo de la selección genética ha estado exclusivamente enfocado a la producción de leche, conduciendo a la disminución de la eficiencia reproductiva que empezó a declinar como resultado a las altas exigencias de volúmenes de producción (Komisarek *et al.*, 2011; Wathes *et al.*, 2007). Debido a que los genes que presuntamente afectan el rendimiento productivo, también se pueden alterar características de fertilidad en el ganado.

Desde la década de 1920, está bien documentado que (BGH) influye en procesos tales como la reproducción y se cree que tiene acciones estimulantes sobre la función gonadal (Scaramuzzi *et al.*, 1999). Su concentración en sangre ha demostrado estar asociada a la edad de la pubertad, ovulaciones dobles, desarrollo embrionario y actividad ovárica postparto (Velásquez *et al.*, 2008; Komisarek *et al.*, 2011). También se ha reportado que existe una relación significativa entre estas concentraciones circulantes de BGH y el intervalo entre partos, lo que concluye que la BGH puede ser un criterio de selección para la fertilidad (Hayhurst *et al.*, 2009).

Estos hallazgos sugieren que por lo menos alguna variación de los niveles de la BGH sea debido a algunas mutaciones de los genes, por tanto puede convertirse en un gen candidato para identificar marcadores genéticos que pueden mejorar la fertilidad y la producción de leche en el ganado (Mullen *et al.*, 2010). Este gen, localizado en el cromosoma 19 (19q26) se compone de 5 exones y 4 intrones que se traducen en una proteína de 191 aminoácidos (Lingappa *et al.*, 1977). Uno de los sitios polimórficos que ha sido asociado con producción de leche y contenido de grasa, es el intron 3, el cual su base molecular radica en la inserción de una T en la posición +837 y una transición de C-G en la posición +838, generando el sitio de restricción (Zhang *et al.*, 1993), y en donde el alelo GH+ presenta una citosina y el alelo GH- presenta una timina, T, (Lee *et al.*, 1993).

Esta investigación tuvo como objetivo determinar la asociación del polimorfismo del intrón 3 de la hormona de crecimiento bovino (BGH), con el número de servicios, días abiertos e intervalo entre partos en vacas de raza Holstein del departamento de Antioquia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Áreas y población en estudio

Se utilizaron 415 animales de la raza Holstein pertenecientes a 8 hatos lecheros ubicados en el trópico alto Antioqueño, en las zonas del norte y el oriente del departamento en los municipios de San Pedro de los Milagros (Altura: 2.475 m.s.n.m; T°: 14°C), Belmira (Altura: 2.550 m.s.n.m; T°: 14°C) y Santa Elena (altura: 2.500 m.s.n.m; T°:17°C). La información fenotípica utilizada, fue recopilada durante 4 años, a partir de un programa de control de producción lechera vigente en los hatos.

### Extracción de ADN

Para la determinación de las variantes genotípicas, se extrajo sangre de la vena coccígea y se realizó la extracción del DNA, mediante la técnica de salting out, descrita por Miller *et al.*, (1988).

Sólo el ADN genómico con una pureza ideal entre 1,8-2,0 se consideró para los estudios a realizar.

Se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos, de 20 pares de bases que permitieron amplificar el fragmento de 329 pb que presenta el sitio de restricción para la endonucleasa MspI (Dybus, 2002).

**F** 5' CCCACGGGCAAGAATGAGGC 3'

**R** 5' TGAGGAACTGCAGGGGCCCA 3'

Se realizó una amplificación por PCR para la región específica usando un volumen final de 25  $\mu$ L que contenía 2,5  $\mu$ L buffer PCR 10X (1,0 -1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl, pH de 8,3), 0,2  $\mu$ M de cebadores; 0,4 mM de cada dNTPs, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 unidades de Taq polimerasa (Bioline ®) y 30-60 ng de DNA genómico.

La PCR se realizó en un termociclador (Biometra®). Las condiciones para la amplificación de la región específica del gen BGH fueron una desnaturalización con un calentamiento inicial de cinco minutos a 94°C, una desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento de cebadores (annealing) a 55°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto y finalmente se repitió desde el paso 2 durante 39 ciclos para finalizar un paso de extensión de 3 minutos a 72°C para terminar la reacción (Dybus, 2002). La temperatura de alineamiento utilizada se determinó siguiendo la recomendación de los distribuidores de los cebadores y mediante diferentes ensayos que arrojaron mayor eficiencia de alineamiento a la temperatura citada, 55°C, (Dybus, 2002).

Como control positivo de todas las reacciones se realizó la amplificación de muestras que fueron previamente evaluadas, y como control negativo reacciones en ausencia de DNA. Las variantes genotípicas fueron determinadas mediante la utilización de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), usando la enzima de restricción MspI, se usó un volumen final de 20  $\mu$ L que contiene 5  $\mu$ L del producto de PCR, 2  $\mu$ L de buffer Tango 1X, 12,5  $\mu$ L de agua ultra pura los cuales fueron sometidos a digestión por 5 unidades de enzima de restricción MspI durante tres horas a 37°C.

El producto se observó por electroforesis en gel de agarosa al 2,5% y bromuro de etidio. El patrón de restricción esperado para el genotipo (-/-) fue un fragmento de 329pb, para el genotipo

(+/-) tres fragmentos (329pb, 224pb y 105pb) y para el genotipo (+/+) dos fragmentos (224pb y 105pb).

### Estimación de las frecuencias alélicas

La frecuencia de los diferentes alelos se estimó determinando la proporción de cada forma del gen entre el número de copias totales de la población en estudio. Se identificaron los homocigotos (dos copias del mismo alelo) y los heterocigotos (una copia de cada alelo), y se calculó la frecuencia F de cada alelo contando los homocigotos y añadiendo la mitad de los heterocigotos, con el método descrito por Hartl (2000).

Frecuencia total (p) de los alelos 1 en la población:

$$p = F_{a/a} + \frac{1}{2} F_{a/b}$$

Frecuencia total (q) de los alelos 2 en la población:

$$q = F_{b/b} + \frac{1}{2} F_{a/b}, \text{ donde;}$$

F a/a = Homocigótico

F a/b = Heterocigótico

### Análisis estadístico

Para determinar la asociación de cada una de las características con el genotipo para BGH, se llevó a cabo el ajuste de modelos lineales generalizados basados en las fuentes de variación conocidas para cada una de las variables dependientes (Número de servicios al primer parto, días abiertos e intervalo entre partos). El análisis de medias de Tukey fue utilizado para determinar las diferencias entre las medias para cada uno de los niveles de los efectos fijos incluidos en los modelos. Se utilizó el paquete estadístico SAS 9,2., para todos los análisis (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

El modelo general de efectos fijos llevado a cabo fue el siguiente:

$$Y_{ijklmnop} = \mu + G_i + H_j + AN_k + MN_l + (MN*AN)_m +$$

$$(H*AN)_n + (H*MN)_o + (H*MN*AN)_p + e_{ijklmnop}$$

Donde:

$Y_{ijklmnop}$  = Número de servicios al primer parto, días abiertos e intervalo entre partos, del

individuo X, portador del genotipo i, ubicado en el hato j, con año de nacimiento k y mes de nacimiento l.

$\mu$  = Media para la característica

$G_i$  = Efecto fijo del Genotipo para BGH ( $i=1\dots3$ )

$H_j$  = Efecto fijo del hato ( $j=1\dots8$ )

$AN_k$  = Efecto fijo del Año de Nacimiento ( $k=1\dots15$ )

$MN_l$  = Efecto fijo del mes de Nacimiento ( $l=1\dots12$ ).

$(MN*AN)_m$  = Efecto fijo de la interacción entre el mes de nacimiento y el año de nacimiento ( $MN*AN$ )<sub>m</sub> ( $m=1\dots86$ )

$(H*AN)_n$  = Efecto fijo de la interacción entre el hato y el año de nacimiento ( $H*AN$ )<sub>n</sub> ( $n=1\dots46$ )

$(H*MN)_o$  = Efecto fijo de la interacción entre el hato y el mes de nacimiento ( $H*MN$ )<sub>o</sub> ( $o=1\dots68$ )

$(H*MN*AN)_p$  = Efecto fijo de la interacción entre el hato, el mes de nacimiento y el año de nacimiento ( $H*MN*AN$ )<sub>p</sub> ( $p=1\dots41$ )

$e_{ijklmnop}$  = Error experimental.

Se realizó un análisis de regresión lineal simple para determinar el efecto de sustitución alélica, con cada una de las variables en estudio, para este fin, el genotipo se convirtió a una escala cuantitativa 0, 1 y 2 para (-/-), (+/-) y (+/+) respectivamente. El modelo de regresión lineal utilizado fue el siguiente:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + e_i$$

Donde:

$Y_i$ : Valor de la variable dependiente (Número de servicios al primer parto, días abiertos e intervalo entre partos) en función del número de alelos +.

$\beta_0$  = Intercepto

$\beta_1$  = Coeficiente de regresión lineal estimado del alelo de sustitución (+)

$X_i$ : Número de alelos + en el individuo i. (0, 1, 2).

$e_i$ : error residual.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen de la (BGH)

Se amplificó un fragmento de 329pb a partir del ADN de 408 animales. El análisis de los

fragmentos de restricción usando la enzima MspI, originó 2 patrones de restricción; 329pb, correspondiente al alelo (-) y 224 y 105pb, correspondiente al alelo (+). Las frecuencias alélicas de (+) y (-) fueron de 0,91 y 0,09 respectivamente. Las frecuencias genotípicas fueron (0,77), (0,2) y (0,03) para (+/+), (+/-) y (-/-) respectivamente, ver Cuadro 1.

### Análisis descriptivo

El número de servicios promedio para el primer parto fue  $1,5 \pm 0,8$  servicios, el promedio de los días abiertos fue  $149,2 \pm 115,7$  días y el promedio para el intervalo entre partos fue  $430,7 \pm 115,8$  días. Las características de mayor variabilidad fueron el número de servicios y los días abiertos con un coeficiente de variación de 55,1% y 77,57% respectivamente y el intervalo entre partos fue una característica de variación media con 26,8%. Los valores promedios de estas características están un poco por encima de las metas reproductivas para los sistemas de producción. En el Cuadro 2 se resume la estadística descriptiva para todas las características.

### Efecto del genotipo sobre las características reproductivas

El genotipo mostró una diferencia altamente significativa con el número de servicios para el primer parto ( $P < 0,01$ ), el coeficiente de determinación ( $r$ ) para el modelo fue de 0,85, indicando que los efectos como el hato, el año de nacimiento, mes de nacimiento, la interacción entre el mes y año de nacimiento, entre el hato y año de nacimiento, hato y mes de nacimiento y la interacción entre el hato el mes y el año de nacimiento, explican en un 85% la variación para esta característica. El análisis de medias de Tukey mostró que el genotipo (+/+) fue el menos favorable para la característica, ya que los animales portadores, presentaron mayor número de servicios, entre los genotipos (-/-) y (+/-) no hubo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ), tal como aparece en el Cuadro 3.

El genotipo tuvo un efecto significativo sobre los días abiertos, el coeficiente de determinación fue de 0,67, lo que indica que la variación para esta características esta explicada en un 67% por los efectos incluidos en el modelo. La prueba

Cuadro 1. Frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo del intrón 3 del gen de la hormona de crecimiento bovino en ganado Holstein del departamento de Antioquia, Colombia.

Raza	Frecuencias alélicas		Frecuencias genotípicas		
	Alelo (-)	Alelo (+)	(+/+)	(+/-)	(-/-)
Holstein	0,09	0,91	0,77	0,2	0,03

Las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas en el presente trabajo coinciden con las reportadas por Gorbani *et al.* (2009), en una población de 183 animales de raza Holstein, donde se encontraron frecuencias de 0,787, 0,191 y 0,022 para los genotipos (+/+), (+/-) y (-/-) respectivamente, y 0,883 y 0,117 para los alelos (+) y (-) respectivamente.

Cuadro 2. Media, desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV) para el número de servicios días abiertos e intervalo entre partos en vacas Holstein del Departamento de Antioquia.

Característica	N	Media	DE	CV
Número de servicios	353	1,5	0,8	55,1%
Días abiertos (días)	353	149,2	115,7	77,5%
Intervalo entre partos (días)	353	430,7	115,8	26,8%

Cuadro 3. Análisis de medias de Tukey para el efecto del genotipo sobre número de servicios para el primer parto, días abiertos e intervalo entre partos.

Genotipo	Número de servicios	Días abiertos (días)	Intervalo entre partos (días)
(+/+)	2,0 a	153,5 a	434,9 a
(+/-)	1,5 b	137,1b	418,1b
(-/-)	1,5 b	135,8b	417,1b

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ( $P < 0,05$ )\*.

de medias de Tukey mostró que el genotipo (+/+) es el menos favorable para esta característica, ya que los individuos tuvieron mayor número de días abiertos; 17 días más que los individuos (-/-) y 16 días más que los individuos (+/-), entre los genotipos (-/-) y (+/-) no hubo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ), ver el Cuadro 3.

El efecto del genotipo fue altamente significativo sobre el intervalo entre partos ( $P < 0,01$ ), el coeficiente de determinación del modelo fue

de 0,67 indicando que todos los efecto que se incluyeron en este (el hato, el año de nacimiento, mes de nacimiento, la interacción entre el mes y año de nacimiento, entre el hato y año de nacimiento, hato y mes de nacimiento y la interacción entre el hato el mes y el año de nacimiento) explican en un 67% la variación de esta característica. El análisis de prueba de medias de Tukey mostró como el genotipo (+/+) es el menos favorable, ya que los individuos tuvieron mayor intervalo entre partos; 17 días

más que los individuos (-/-), entre los genotipos (-/-) y (+/-) no hubo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ), ver Cuadro 3.

### Efecto de sustitución alélica del polimorfismo del gen BGH sobre las características reproductivas

Se encontró un coeficiente de regresión para los días abiertos, ( $\beta$ ) de 13,2, es decir que por a cada alelo (+) que aporte el individuo los días abiertos aumentan 13,2 días; para el intervalo entre partos se encontró un coeficiente de regresión ( $\beta$ ) de 13,5, es decir por cada alelo (+) en el individuo este parámetro aumenta en 13 días. El número de servicios tuvo un coeficiente de regresión ( $\beta$ ) de -0,08, indicando que por cada alelo (+) el número de servicios disminuye en 0,08.

El coeficiente de regresión estimado para el intervalo entre partos, fue altamente significativo ( $P < 0,01$ ), los coeficiente de regresión para el número de servicio para el primer parto y los días abiertos fueron también significativos ( $P < 0,05$ ). Los coeficientes de regresión de cada una de las características son mostrados en el Cuadro 4.

La mayoría de las asociaciones de características relacionadas con la fertilidad en el ganado con el gen de la BGH se han realizado en el polimorfismo ubicado en el quinto exón en la posición 2.141, en el cual una sustitución de una citosina (C) por una guanina (G) provoca un cambio de aminoácido de una leucina (L) a una valina (V) (Pereira *et al.*, 2005; Reiss *et al.*, 2001).

Gretel *et al.* (2011) no encontraron ningún efecto de este genotipo con parámetros reproductivos

como servicios por concepción, parto primer servicio y tasa de preñez, de igual manera Balogh *et al.* (2009), no encontraron ningún efecto en el tiempo de la primera ovulación posparto. Otros reportes como los de Lechniak *et al.* (2002) no mostraron efecto del genotipo en el número de ovulaciones, y Katalin *et al.* (2006) no descubrieron ningún efecto con el intervalo entre partos. Komisarek *et al.* (2011) localizaron que el genotipo se asoció significativamente con el intervalo entre partos.

Mullen *et al.* (2010) incluyeron en sus estudios seis nuevos polimorfismos situados en el primer exón (región 5'), encontraron que tres de ellos (BGH32, BGH35 y BGH38 todos caracterizados por una sustitución alélica de una Timina por una Citosina en el primer exón) se asociaron con la tasa de preñez al primer servicio. También se realizaron asociaciones con el intervalo entre partos donde se encontró un efecto de los polimorfismos BGH32 y BGH38 en el tercer parto.

No se encontraron reportes para el polimorfismo en estudio. La baja frecuencia de algunos genotipos limita las asociaciones del polimorfismo con estos parámetros reproductivos. Aunque se encontró una asociación significativa con el número de servicios, intervalo entre partos y días abiertos, denotando al genotipo (-/-) como el más favorable para estas características reproductivas.

Algunos estudios sugieren que el genotipo de la BGH (+/+) para este polimorfismo está asociado favorablemente con producción y composición láctea, (Dybus, 2002; Zwierzchowski, 2002), este genotipo en el presente estudio también se asoció con mayores intervalos entre partos, días abiertos y número de servicios al primer parto,

Cuadro 4. Coeficientes de regresión ( $\beta$ ), para las características número de servicios, días abiertos e intervalo entre partos.

Característica	Intercepto (I)	Beta ( $\beta$ )	Error Estándar $\beta$
Número de servicios al primer parto	1,7	-0,08	0,03
Días abiertos (días)	126,7	13,2	4,6
Intervalo entre partos (días)	407,5	13,5	4,6

y como en estas poblaciones se han trabajado apareamientos dirigidos para lograr mayores volúmenes de producción de leche; dichos apareamientos podrían explicar, la baja fertilidad y la disminución de la eficiencia reproductiva que coincide con el incremento en la producción de leche en muchos hatos lecheros (Komisarek *et al.*, 2011; Reist *et al.*, 2003; Wathes *et al.*, 2007).

## CONCLUSIONES

Este es el primer reporte que evalúa la asociación entre el número de servicios, días abiertos e intervalo entre partos con el polimorfismo del intron 3 del gen de la hormona de crecimiento bovino en ganado Holstein de trópico alto colombiano, los cuales servirán de base para futuras investigaciones.

Aunque la baja frecuencia del genotipo (-/-) puede generar dificultades al momento de haber realizado estas asociaciones, se encontraron que las tres características se asociaron con el polimorfismo en estudio; por ende se recomienda aumentar el tamaño muestral y así generar resultados de mayor confiabilidad para facilitar la selección de estos individuos favorables para su utilización en un programa genético y reproductivo.

## LITERATURA CITADA

- Balogh, O., K. Kova'cs , M. Kulcsa'r , A. Ga'spa'r'dy , A. Zsolnai , L. Ka'tai , A. Pécsi, L. Fésüs , W. R. Butler and G. Huszenicza. 2009. Alul 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 (4): 553 -559. Available on line: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X08003841>. [Ene. 12, 2015].
- Dybus, A. 2002. Associations of growth (GH) and Prolactin (PRL) genes polymorphisms with milk production traits in Polish Black and White cattle. *Anim Sci P.*, 20 (4): 203 -212. Available on line: <http://www.archanimbreed.com/pdf/2005/at05p149.pdf>. [Nov. 02, 2014].
- Gorbani, A., T. Vaez, M. Bonyadi and C. Amirinia. 2009. A MspI PCR-RFLP within bovine growth hormone gene and its association with sperm quality traits in Iranian Holstein bulls. *Afr J Biotechnol.*, 8 (19); 4811 - 4816. Available on line: [http://www.researchgate.net/publication/255628171\\_A\\_MspI\\_PCR\\_RFLP\\_within\\_bovine\\_growth\\_hormone\\_gene\\_and\\_its\\_association\\_with\\_sperm\\_quality\\_traits\\_in\\_Iranian\\_Holstein\\_bulls](http://www.researchgate.net/publication/255628171_A_MspI_PCR_RFLP_within_bovine_growth_hormone_gene_and_its_association_with_sperm_quality_traits_in_Iranian_Holstein_bulls). [Ene. 12, 2015].
- Gretel, R., C. Mariana, J. M. Ramos and I. Pereira. 2011. Metabolic and endocrine profiles and reproductive parameters in dairy cows under grazing conditions: effect of polymorphisms in somatotrophic axis genes. *Acta Veterinaria Scandinavica.*, 53:35. Available on line: <http://www.acta.vet.scand.com/content/53/1/35>. [Dic. 18, 2014].
- Hartl, D. 2000. A primer of populations Genetics. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. U.S.A. 3ra Ed., pp. 26 - 31.
- Hayhurst C., A. Flint, P. Lovendahl and J. Woolliams. 2009. Genetic variation of metabolite and hormone concentration in UK Holstein-Friesian calves and the genetic relationship with economically important traits. *J Dairy Sci.*, 92 (8): 4001-4007. Available on line: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030209707234>. [Nov. 14, 2014].
- Jiang, H. and M. C. Lucy. 2001. Variants of the 5'-untranslated region of the bovine growth hormone receptor mRNA: isolation, expression and effects on translational efficiency. *Gene.*, 265 (1-2): 45-53. Available on line: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111901003560>. [Ene. 12, 2015].
- Katalin, K., V. József, Z. Attila, G. István and F. László. 2006. Associations between the Alul polymorphism of growth hormone gene and production and reproduction traits in a Hungarian Holstein-Friesian bull dam population. *Arch Tierz.*, 49 (3):

- 236 -249. Available on line: <http://www.arcanimbreed.com/pdf/2006/at06p236.pdf>. [Ene. 12, 2015].
- Komisarek, J., M. Arkadiusz and W. Anna. 2011. The effects of polymorphisms in DGAT1, GH and GHR genes on reproduction and production traits in Jersey cows. *Animal Science Papers and Reports*, 29 (1): 29 -36. Available on line: <http://free-journal.umm.ac.id/download-pdf-journal-558-the-effects-of-polymorphisms-in-dgat1-gh-and-ghr-genes-on-reproduction-and-production-traits-in-jersey-cows.pdf>. [Dic. 10, 2014].
- Le, D., C. Bondy , S. Yakar , J. Liu and A. Butler . 2001. The Somatomedin Hypothesis 2001. *Endocr Rev.*, 22 (1): 53 -74. Available on line: <http://press.endocrine.org/doi/pdf/10.1210/edrv.22.1.0419>. [Ene. 20, 2015].
- Lee, B., G. Lin, B. Crooker, M. Murtaugh, L. Hansen and H. J. Chester. 1993. Association of somatotropin gene polymorphism at the 5th exon with selection for milk yield in holstein cows. *Domest Anim Endocrin.*, 13 (4): 376 – 381. Available on line: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8839630>. [Dic. 15, 2014].
- Lechniak, D., T. Adamowicz, D. Stanislawski and D. Kaczmarek. 2002. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes in relation to GH gene polymorphism (Leu/Val). *Reprod Nutr Dev.*, 42 (3): 275 - 280. Available on line: <http://rnd.edpsciences.org/articles/rnd/pdf/2002/04/08.pdf>. [Nov. 20, 2014].
- Lingappa, V., A. Devillers and G. Blobel. 1977. Nascent prehormones are intermediates in the biosynthesis of authentic bovine pituitary growth hormone and prolactin. *P Natl A Sci.*, 74 (6): 2432 - 2436. Available on line: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/267936>. [Dic. 15, 2014].
- Lucy, M. 2008. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction. *Reprod Domest Anim.*, 43 (2): 31 - 39. Available on line: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2008.01140.x/pdf>. [Ene. 20, 2015].
- Miller, S., D. Dykes and H. Polesky . 1988. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.*, 16: 1215. Available on line: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC334765/>. [Ene. 20, 2015].
- Mullen, M., D. Berry , D. Howard , M. Diskin, C. Lynch , E. Berkowicz , D. A. Magee, D. E. MacHugh and S. M. Waters. 2010. Associations between novel single nucleotide polymorphisms in the Bos taurus growth hormone gene and performance traits in Holstein-Frisian dairy cattle. *J Dairy Sci.*, 93 (12): 5959 - 5969. Available on line: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203021000648X>. [Ene. 20, 2015].
- Pereira, A., M. Maurício, N. Henrique and C. Luciana. 2005. Association of GH and IGF1 polymorphisms with growth traits in a synthetic beef cattle breed. *Genet Mol Biol.*, 28 (2): 230 - 236. Available on line: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-47572005000200009](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572005000200009). [Ene. 12, 2015].
- Renaville, R., M. Hammadi and D. Portetelle . 2002. Role of the somatotropic axis in the mammalian metabolism. *Domest Anim Endocrinol.*, 23 (1-2): 351- 360. Available on line: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0739724002001704>. [Ene. 12, 2015].
- Reiss, C., D. Navas , M. Pereira and A. Cravador. 2001. Growth hormone Alu polymorphism analysis in eight portuguese bovine breeds. *Arch zootec.*, 50: 41-48. Available on line: <http://www.google.com.co/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCIQFjAA&url=http%3A%2F%2Fdialnet.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F1426689.pdf&ei=t6rPVImDISXgwSzsYGADA&usg=AFQjCNEWNWJrV4IMo3ridvwMWWCJmBZTvw&sig2=mmlraTluwOHXwMKsQ563jA>. [Ene. 20, 2015].
- Reist, M., D Erdin , E. Von , K. Tschümperlin , H. Leuenberger , H. Hammon , C. Morel,



- C. Philipona , Y. Zbinden , N. Künzi and J. W. Blum . 2003. Postpartum reproductive function: association with energy, metabolic and endocrine status in high yielding dairy cows. *Theriogenology.*, 59 (8): 1707- 1723. Available on line: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X02012384>. [Ene. 20, 2015].
- SAS 9.2 SQL Procedure User's Guide. 2009. SAS Institute., Inc., Cary, N.C, USA.
- Scaramuzzi, R., J. Murraya , J. Downingb and B. Campbellc . 1999. The effects of exogenous growth hormone on follicular steroid secretion and ovulation rate in sheep. *Domest Anim Endocrinol.*; 17 (2-3): 269 – 277. Available on line: [http://www.researchgate.net/publication/12773737\\_The\\_effects\\_of\\_exogenous\\_growth\\_hormone\\_on\\_follicular\\_steroid\\_secretion\\_and\\_ovulation\\_rate\\_in\\_sheep](http://www.researchgate.net/publication/12773737_The_effects_of_exogenous_growth_hormone_on_follicular_steroid_secretion_and_ovulation_rate_in_sheep). [Enero, 2015].
- Velásquez, M., L. Spicer and D. Wathes. 2008. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. *Domest Anim Endocrinol.*, 35 (4): 325 - 342. Available on line: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0739724008000775>. [Dic. 04, 2014].
- Wathes, D., M. Fenwick, Z. Cheng, N. Bourne, S. Llewellyn, D. Morris, D. Kenny, J. Murphy and R. Fitzpatrick. 2007. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology.*, 68 (1): S232 - 41. Available on line: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X07001343>. [Dic. 04, 2014].
- Zhang, H., D. Brown and S. Denise. 1993. Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the bovine somatotropin gene. *J Anim Sci.*, 71: 2276. Available on line: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8104173>. [Dic. 04, 2014].
- Zwierzchowski, L., J. Krzyzewski, N. Strzałkowska, E. Siadkowska and Z. Ryniewicz. 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 P.* 20 (2): 213 -227. Available on line: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PL2003001056>. [Ene. 12, 2015].