

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**PARÁMETROS PRODUCTIVOS, REPRODUCTIVOS, METABÓLICOS Y
ENDÓCRINOS DE VACAS LECHERAS A PASTOREO DURANTE EL
PERÍODO DE TRANSICIÓN:
EFECTOS DE POLIMORFISMOS DEL EJE SOMATOTRÓFICO**

por

Gretel Cristina RUPRECHTER SCHÖLDERLE

**TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magister en Ciencias Agrarias
opción Ciencias Animales**

**MONTEVIDEO
URUGUAY**

2011

Tesis aprobada por:

Jose Luis Repetto

Elsa Garófalo

Silvia Llambí

Diego Mattiauda

Laura Astigarraga

Fecha: 29/08/2011

Autor: GRETEL RUPRECHTER

Tutor: MARIANA CARRIQUIRY

Co-tutor: ANA MEIKLE

TABLA DE CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	V
RESUMEN.....	VII
SUMMARY.....	VIII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1 ESTADO METABÓLICO Y ENDOCRINO DE LA VACA LECHERA ACTUAL.....	2
1.2 MARCADORES MOLECULARES Y UTILIZACIÓN DE ALGUNO DE ELLOS EN LECHERÍA	7
2. <u>MARCADORES MOLECULARES EN GENES DEL EJE SOMATOTRÓFICO EN VACAS DE LECHE HOLANDO EN EL URUGUAY</u>	12
2.1 RESUMEN.....	13
2.2 SUMMARY.....	14
2.3 INTRODUCCIÓN.....	15
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
2.5 RESULTADOS	19
2.6 DISCUSIÓN.....	23
2.7 AGRADECIMIENTOS.....	27
2.8 BIBLIOGRAFÍA.....	27
3. <u>METABOLIC AND ENDOCRINE PROFILES AND REPRODUCTIVE PARAMETERS IN DAIRY COWS UNDER GRAZING CONDITIONS: EFFECT OF POLYMORPHISMS IN SOMATOTROPIC AXIS GENES</u>	31
3.1 SUMMARY.....	32

3.2 INTRODUCTION.....	33
3.3 MATERIALS AND METHODS.....	35
3.4 RESULTS.....	39
3.5 DISCUSSION.....	47
3.6 CONCLUSIONS.....	51
3.6 ACKNOWLEDGMENTS.....	51
3.7 REFERENCES.....	51
4. <u>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</u>	58
4.1 DISCUSIÓN GENERAL.....	58
4.2 CONCLUSIONES GLOBALES.....	65
5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	66

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas N°		Página
2.1	Numero de vacas en ordeño (vacas muestreadas), origen del semen y criterios de selección de cada rodeo.	17
2.2	Frecuencias alélicas y genotípicas de los marcadores <i>AhuI</i> GH e <i>Snabi</i> IGF-I en los 4 tambos.....	20
2.3	Heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) para los 2 marcadores analizados en los 4 tambos.....	21
2.4	Matrices de estadísticos F_{IS} y F_{ST} de los tambos analizados (F_{IS} en la diagonal, en negrita) para cada locus y para todos los loci (Global).....	22
2.5	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 los 3 tambos.....	23
3.1	F-tests of fixed effects included in the model for productive/reproductive parameters and metabolic/endocrine variables and BCS of Holstein cows under grazing conditions in two commercial farms. Fixed effects are GH and IGF-I genotype and days post partum (dpp).....	40
3.2	Productive/reproductive parameters and metabolic/endocrine variables (LSM± SE) for GH genotypes of Holstein cows in two commercial farms....	41
3.3	Productive/reproductive parameters and metabolic/endocrine variables	

(LSM± SE) for IGF-I genotypes of Holstein cows in two commercial farms...43

Figura N°	Página
3.1 Fat corrected milk yield for LL and LV genotypes (A, B) and AA, AB, and BB genotypes (C, D) of Holstein cows in Farm 1 (A, C) and Farm 2 (B, D). Asterisks denote differences at $P < 0.05$, while # denotes trends $0.05 < P < 0.10$	42
3.2 Non-sterified fatty acids (NEFA, A, B), β -hydroxybutirate (BHB, C, D), insulin (E, F) and insulin like growth factor I (IGF-I, G, H) concentrations for LL and LV genotypes of Holstein cows in Farm 1 (A,C,E,G) and Farm 2 (B,D,F,H). Asterisks denote differences at $P < 0.05$	45
3.3 Non-sterified fatty acids (NEFA, A, B), β -hydroxybutirate (BHB, C, D), insulin (E, F) and insulin like growth factor I (IGF-I, G, H) concentrations for AA, AB and BB genotypes of Holstein cows in Farm 1 (A,C,E,G) and Farm 2 (B,D,F,H). Asterisks denote differences at $P < 0.05$	46

RESUMEN

Se investigó si polimorfismos a nivel de los genes que codifican para la hormona de crecimiento (GH, *AluI*-GH) y para el factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-I, *SnabI*-IGF-I), modifican los perfiles endocrino-metabólicos y las variables productivo-reproductivas de vacas lecheras a pastoreo. Se genotiparon 308 vacas Holando provenientes de dos tambos (T) comerciales y dos experimentales. Se registraron controles lecheros, variables reproductivas y se realizaron determinaciones endocrino-metabólicas durante el período de transición en las vacas de los tambos comerciales (T1=110 vacas primíparas, T2=76 vacas múltíparas). El alelo L del gen GH se encontró en mayor frecuencia (0,821-0,947); mientras que el gen IGF-I presentó una distribución más equitativa de sus alelos (alelo A: 0,547-0,609). Se obtuvieron índices bajos o medios de heterocigosidad: H_o mínima = 0,105 para GH y H_o máxima = 0,554 para IGF-I. Los índices F_{IS} fueron bajos a moderados, no detectándose desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg y los valores F_{ST} globales resultaron muy cercanos a cero ($F_{ST} < 0,009$) argumentando a favor de la similitud génica entre las poblaciones. La interacción entre el genotipo GH y los días posparto afectó la producción de leche corregida por grasa 4% (LCG) de vacas múltíparas (T2), siendo el genotipo LL más productor que el LV al inicio de la lactancia. En vacas primíparas (T1), el genotipo LV presentó mayor concentración de AGNE y menor de IGF-I sugiriendo un peor estatus energético. Se observó una tendencia del genotipo IGF-I sobre LCG en vacas múltíparas (T2), siendo el genotipo AB más productor que el AA. Vacas con genotipo AB presentaron un menor intervalo parto-primer servicio y mayor producción de LCG respecto al genotipo BB. Las vacas primíparas (T1) con genotipo BB presentaron menores concentraciones de BHB y AGNE y mayores de insulina. En vacas múltíparas (T2) se encontró una interacción entre el genotipo IGF-I y los días postparto sobre las concentraciones de IGF-I, sugiriendo un mayor desacople del eje somatotrófico en vacas con genotipo AB, consistente con la mayor producción de LCG de dicho genotipo.

Palabras clave: SNP, GH, IGF-I, vacas lecheras

SUMMARY**PRODUCTIVE, REPRODUCTIVE, METABOLIC AND ENDOCRINE PARAMETERS IN DAIRY COWS UNDER GRAZING CONDITIONS: EFFECT OF POLYMORPHISMS IN SOMATOTROPIC AXIS**

It was investigated if polymorphisms of growth hormone (GH, *AluI*-GH) and insulin-like growth factor I (IGF-I, *SnabI*-IGF-I) genes modify the endocrine/metabolic profiles and productive/ reproductive parameters. Holstein cows (n=308) were genotyped, in two commercial and two experimental dairy farms (DF). Milk production and reproductive parameters were registered and hormone-metabolic determinations were performed during the transition period in cows of the commercial farms: (DF1 n=110 primiparous cows; DF2 n=76 multiparous cows). For the GH gene, the L allele was more frequent (0.821-0.947); while the IGF-I gene presented similar distribution among its alleles (allele A 0.547-0.609). Low or moderate heterozygosity indexes were obtained (minimum $H_o=0.105$ for GH and maximum $H_o=0.554$ for IGF-I). The F_{IS} indexes were low to moderate, without detection of deviations of the Hardy-Weinberg equilibrium and the global F_{ST} values were close to zero ($F_{ST}<0.009$), arguing in favor of the genetic similarity among the populations studied. The interaction between GH genotype and days postpartum affected 4% fat-corrected milk yield (FCM) in multiparous cows (DF2), presenting LL greater milk production at early lactation than LV cows. In primiparous cows (DF1), LV presented greater NEFA and lower IGF-I concentrations than LV cows, suggesting a worse energy status in these cows. A trend for an effect of IGF-I genotype on FCM was found in multiparous cows (DF2), presenting AB more FCM yield than AA cows. The AB cows had a shorter calving to first service interval and greater FCM yield than BB cows in primiparous cows (DF1). IGF-I genotype affected betahydroxybutirate (BHB), NEFA and insulin concentrations in primiparous cows (DF1), as BB cows had lower BHB and NEFA and greater insulin concentrations than AA and AB cows. In multiparous cows (DF2), no effect of IGF-I genotype on metabolic and endocrine variables was found, but there was an interaction between the genotype and days postpartum on IGF-I concentrations, suggesting a greater uncoupling of the somatotropic axis in AB cows, which is consistent with the greater FCM in this genotype.

Keywords: SNP, GH, IGF-I, dairy cows

1. INTRODUCCIÓN

La producción lechera en el Uruguay ha mostrado un proceso constante de crecimiento llegando en el 2006 a algo más de 1600 millones de litros por año, lo que implica un aumento del 20% respecto a los valores alcanzados a finales de la década del 90. En forma paralela se comporta la remisión de leche a plantas pasteurizadoras, que creció un 21% en el período 2000-2006, hasta alcanzar unos 1.300 millones de litros anuales, valor que se ubica un 80% por encima de los valores de inicio de la década del 90 (Dabezies, 2008). La producción por vaca en ordeño y por año creció un 47% pasando de 3.500 litros a 5.600 litros, lo que refleja un mejor manejo animal, ya sea a nivel de la nutrición y/o de la selección genética. Esta fuerte presión de selección a favor de la producción en la vaca lechera ha provocado un desarrollo biológico-estratégico en el animal en el cual el eje somatotrófico: la hormona de crecimiento (GH) y su mediador, el factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-I), tiene un rol clave (Gong *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2007; Lucy *et al.*, 2009).

En este sentido, se han documentado cambios en la secuencia de ADN (marcador molecular) de estos genes que podrían provocar diferencias en la acción hormonal que en última instancia resulte en diferentes comportamientos productivos. Debido tanto al interés del uso de dichos marcadores en el proceso de selección genética como al interés comercial, se ha investigado su asociación con caracteres fenotípicos económicamente relevantes. Los marcadores son utilizados actualmente en varios países pero las asociaciones entre éstos y las características fenotípicas han sido generadas y validadas bajo sistemas de producción muy diferentes al de nuestro país (estabulación vs. pastoreo). En nuestro país y en la región, donde el sistema de producción es principalmente el pastoreo controlado ya se dispone de esta biotecnología (perfiles genéticos en base a marcadores moleculares) y se está iniciando su utilización, sin haber realizado un estudio de diversidad y estructura genética poblacional del rodeo lechero. Para implementar su uso es necesario conocer las frecuencias de los diferentes alelos y

genotipos presentes en la población, cuantificar la diversidad genética, evaluar endogamia y grado de divergencia de poblaciones existentes. Además, no se ha realizado una previa validación de éstos perfiles genéticos en nuestras condiciones de producción, siendo esto de relevancia si se tiene en cuenta que la expresión fenotípica dependerá no solo de la genética y el ambiente sino también de su interacción. Por otro lado, las investigaciones en relación a los marcadores moleculares han buscado asociar caracteres fenotípicos de interés comercial, pero la investigación intentando comprender las bases biológicas que originan estos cambios fenotípicos es escasa o nula.

1.1 ESTADO METABÓLICO Y ENDÓCRINO DE LA VACA LECHERA ACTUAL

La presión de selección a favor del aumento de la producción de leche ha modificado el metabolismo del animal y el flujo de nutrientes a órganos y tejidos (Bauman y Currie, 1980), el cual es regulado entre otros por la GH, el IGF-I y la insulina. La partición de nutrientes favoreciendo el flujo hacia la glándula mamaria, provoca en la vaca lechera un balance energético negativo (BEN) evidenciado principalmente durante el período de transición (período correspondiente a las tres semanas previas al parto y las tres semanas posteriores a éste; Grummer, 1995) y la lactancia temprana.

Los requerimientos de la vaca lechera aumentan en el último tercio de la gestación debido al crecimiento fetal y al de la glándula mamaria y aumentan más aún en el postparto debido al inicio de la producción láctea. El pico de producción de leche se alcanza entre la semana 4 a 7 postparto, mientras que la ingesta de materia seca comienza a disminuir ya 3 semanas previas al parto, recuperándose luego gradualmente durante el postparto (Butler *et al.*, 1981; Beam y Butler, 1997; Hayirli *et al.*, 2002; Svennersten-Sjaunja y Olsson, 2005). Esta caída en el consumo previo al parto puede alcanzar una reducción del 30% (Grummer, 1995), y es aún mayor en vaquillonas que en vacas adultas (Grummer *et al.*, 2004). En las vacas primíparas tiene mayor impacto

debido a los mayores requerimientos, ya que esta categoría debe afrontar además de la preñez, su propio crecimiento. Todos estos eventos que la vaca debe afrontar, van acompañados de cambios a nivel endocrino y metabólico que caracterizan este período.

El metabolismo cambia de un estado anabólico preparto a otro catabólico posparto, donde la grasa del tejido adiposo principalmente y la proteína del músculo esquelético en menor grado son movilizadas en respuesta al BEN causado por la copiosa producción láctea (Chilliard, 1999; Ingvarsen, 2006). La glucosa es utilizada prioritaria y obligatoriamente por la glándula mamaria para la síntesis de lactosa de manera que, la consecuencia del déficit de energía es la movilización de los depósitos de grasa, con la liberación de ácidos grasos no esterificados (AGNE) en sangre. Esta movilización de reservas corporales, puede determinar una pérdida de peso de entre 50 y 70 kg lo que equivale a un 30 a 40% de las reservas grasas, causando un descenso de la condición corporal (CC) en vacas que producen 40 litros de leche por día en sistemas de estabulación (Chilliard, 1999). A su vez el incremento del nivel de AGNE en sangre estará de acuerdo con la magnitud de la movilización grasa que comenzará ya previo al parto (Pullen *et al.*, 1989; Bell, 1995; Chagas *et al.*, 2006). Los AGNE son utilizados por la glándula mamaria provocando el aumento de la grasa en la leche y también por el hígado donde son consumidos en la β -oxidación para producción de energía, oxidados a cuerpos cetónicos o almacenados como triglicéridos (TG) o exportados bajo la forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Grummer *et al.*, 2004). Al ser superada la capacidad hepática de hidrólisis de los TG y su salida como VLDL, la degeneración grasa hepática se vuelve significativa (Grummer, 1995). Por otro lado, en la vaca lechera hay una importante proteólisis en las 2 primeras semanas posparto, con el fin de movilizar aminoácidos para contribuir a la gluconeogénesis hepática, a la anaplerosis del ciclo de Krebs y a la síntesis de proteína láctea en la glándula mamaria (Blum *et al.*, 1985; Doepel *et al.*, 2002).

Cierto grado de BEN es esperado en animales sanos durante el posparto temprano por lo que es esperable un moderado incremento de los cuerpos cetónicos

principalmente acetoacetato y betahidroxibutirato (BHB) en sangre, los cuales pueden ser usados como fuente energética por tejidos periféricos cuando los carbohidratos son limitados (Baird, 1982; Vazquez-Añon *et al.*, 1994; Leslie *et al.*, 2000). Meikle *et al.* (2004; 2006) mostraron el perfil de los AGNE para vacas y vaquillonas en condiciones pastoriles: en ambas categorías se elevaron al parto, pero las primíparas presentaron mayores niveles de AGNE en sangre. En acuerdo con este perfil energético, las vacas primíparas presentaron mayor número de muestras con concentraciones de BHB indicativas de cetosis subclínica. Además este incremento en los niveles de AGNE y BHB, es consistente con el descenso de la CC (Meikle *et al.*, 2006). A su vez, de manera consistente con el BEN que fue reportado mas pronunciado en vacas de alta producción que en vacas de baja producción láctea (Kornalijnslijper *et al.*, 2003), se ha documentado también una correlación positiva entre la selección a favor de la alta producción láctea y el aumento de cetosis (Ingvarlsen *et al.*, 2003).

El eje somatotrófico que consiste en GH, IGF-I, sus proteínas de unión y sus receptores, juega un rol crítico en la regulación del metabolismo y de varios procesos fisiológicos (Breier, 1999; Renaville *et al.*, 2002). La GH es un polipéptido de cadena simple producida por la hipófisis y ha sido considerada una hormona teleforética (*teleo* es orientar y *foresis* es transporte con un fin: sobrevivencia de la especie; Chilliard 1999), siendo esta encargada de coordinar y reorientar nutrientes disponibles hacia la glándula mamaria. A su vez es utilizada de forma farmacológica (somatotrofina bovina recombinante o bST) en varios países para aumentar la producción de leche alrededor de un 20 a 25 % (Bauman *et al.*, 1985). Muchas de las acciones de GH en crecimiento tisular y metabolismo están mediadas por IGF que son liberados por los tejidos blancos en respuesta a la unión de GH a sus receptores de membrana (Sjogren *et al.*, 1999; Renaville *et al.*, 2002). La activación del receptor de GH traduce y activa la vía JAK-STAT induciendo la transcripción de genes como IGF-I y las proteínas de unión como la IGFBP3. Varios tejidos son afectados por GH, siendo los eventos que ocurren en el hígado y en el tejido adiposo los más importantes. El incremento de GH postparto tiene

como efecto directo estimular la gluconeogénesis en el hígado y como efecto indirecto antagonizar la acción de la insulina en varios tejidos. Los efectos de GH sobre la gluconeogénesis hepática en la vaca lechera periparturienta son esenciales para dar respuesta a la alta demanda de glucosa para la producción de leche. En el tejido adiposo, GH incrementa la lipólisis, provocando aumento de AGNE en sangre (Lucy *et al.*, 2009). A su vez parece existir una resistencia a la insulina en este período en vacas de alto mérito genético que redireccionan el pool de glucosa existente hacia la glándula mamaria, donde la entrada de glucosa es independiente de la insulina plasmática (Lucy *et al.*, 2009).

Ha sido descrito en el posparto temprano de la vaca lechera un desacople hormonal del eje somatotrófico que se refleja en las altas concentraciones sanguíneas de GH y bajas de IGF-I en el posparto temprano (Radcliff *et al.*, 2003). Se demostró que la disminución en la síntesis de IGF-I se asoció con la reducción de los receptores de GH, y del ARNm de la isoforma 1A del receptor de GH y de IGF-I (Kobayashi *et al.*, 1999; Radcliff *et al.*, 2003). La disminución de los receptores de GH hepáticos son la principal causa de resistencia a GH en el posparto temprano (Lucy *et al.*, 2009). Weber *et al.* (2007) reportaron que concentraciones sanguíneas de GH aumentadas al parto permanecieron elevadas por más tiempo en vacas seleccionadas por alto mérito genético y fueron mayores que en vacas de bajo mérito genético.

Sinowatz *et al.* (2000) demostraron que el receptor de GH (transcripto y proteína) se expresa en el epitelio de ductos y alvéolos mamarios, los cuales permitirían a GH cumplir con su rol en diferenciación y mantenimiento epitelial. Además, la cantidad de receptores de GH aumentó en el tejido mamario durante el posparto, por lo que se propone una acción directa de la GH sobre la glándula mamaria, asociado a producción y secreción láctea. En contraparte, los ensayos funcionales de unión han fracasado para detectar proteínas receptoras, aunque el tejido mamario de rumiantes exprese ARNm para los receptores de GH (Hauser *et al.*, 1990; Glimm *et al.*, 1992) por lo que se sugirió

que la familia IGF (factores de crecimiento, proteínas de unión y receptores) mediaría la acción de GH en la glándula mamaria (Akers *et al.*, 2000).

El IGF-I es un polipéptido de 70 aminoácidos, con un peso molecular de 7.5 kDa (Daughaday y Rotwein, 1989), juega un importante rol en diferenciación celular, embriogénesis y crecimiento. Ha sido considerado un indicador del estado energético del animal y tiene un rol importante en el control del metabolismo y la reproducción (Taylor *et al.*, 2004). El hígado es el mayor productor de IGF-I circulante y a pesar de la alta correlación encontrada entre los niveles de expresión de ARNm de IGF-I hepáticos y la concentración de IGF-I sérica total, fue demostrada la síntesis local de IGF-I en tejido mamario, donde las células del estroma adyacentes al epitelio sirven de fuente local de IGF-I quien estimularía el crecimiento epitelial (Akers, 2002).

En vacas lecheras a pastoreo durante el periparto, las concentraciones de insulina e IGF-I se mantuvieron bajas acompañando las altas concentraciones de BHB y AGNE en sangre (Meikle *et al.*, 2004). Los niveles de IGF-I e insulina evidencian en el posparto temprano el BEN del animal: vacas con un peor balance energético presentan menores concentraciones de estas hormonas y se recuperan a medida que transcurre la lactancia (Meikle *et al.*, 2004). Roche *et al.* (2005) establecieron que vacas subalimentadas en el preparto movilizan reservas corporales y tienen concentraciones de GH, AGNE y BHB más altas, y niveles de IGF-I, glucosa, insulina y leptina más bajos antes del parto. A su vez Taylor *et al.*, (2004) demostraron una asociación entre BEN, baja fertilidad y bajas concentraciones de IGF-I. Las concentraciones de IGF-I sanguíneas están asociadas con rasgos de crecimiento en varias especies productivas (Anderson *et al.*, 1988; Graml *et al.*, 1994). Estudios en bovinos Angus demostraron una alta heredabilidad (0.48 ± 0.13) para la concentración de IGF-I sanguínea durante el período postdestete sugiriendo un fuerte control genético para este factor de crecimiento (Davis y Simmen, 1997).

En resumen, la hormona del crecimiento y su mediador IGF-I, han sido junto con la insulina las señales hormonales más estudiadas en la vaca lechera en lactación, debido a su rol clave en la partición de nutrientes para sostener la lactación. Se ha postulado además que la fuerte presión de selección ha llevado a un cambio en la fisiología metabólica: aumentando las concentraciones de GH y disminuyendo las de IGF-I e insulina en el posparto temprano (Gong *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2007; Lucy *et al.*, 2009).

1.2 MARCADORES MOLECULARES Y UTILIZACIÓN DE ALGUNO DE ELLOS EN LECHERÍA

Los marcadores genéticos constituyen posiciones físicas en un cromosoma que permiten determinar el genotipo animal y monitorear su herencia, existiendo varios tipos de ellos (tipo I, II y III). Los marcadores tipo I son genes. Un ejemplo de ellos es el locus del receptor de estrógenos asociado con el tamaño de camada en cerdos (Rothschild *et al.*, 1997). Los marcadores tipo II o marcadores anónimos, son abundantes a lo largo del genoma, muy variables y son ejemplo de ellos los AFLP (polimorfismos del largo del fragmento amplificado) y los microsatélites. Se utilizan para encontrar secuencias específicas de ADN utilizando PCR (reacción en cadena de la enzima polimerasa). En el caso de los microsatélites, las secuencias específicas de ADN contienen bases nucleótidas repetidas (por ej. AGAGAGAGAGAG), la variación en el número de repeticiones en el segmento, en los distintos animales constituye un polimorfismo que será transmitido del progenitor a prole. Los marcadores tipo III conocidos como SNP (polimorfismo en una base nucleótida) son muy comunes a lo largo del genoma, y son los marcadores más estudiados en la búsqueda de la asociación entre cambios genéticos y caracteres fenotípicos de interés productivo.

Con respecto al gen que codifica para GH, varios sitios polimórficos fueron identificados en el V exón del gen GH bovino (Lucy *et al.*, 1991; Chikuni *et al.*, 1994;

Yao *et al.*, 1996). Un punto de mutación en la posición 2141 de la secuencia nucleótida del gen GH (transversión de C a G) puede ser detectado por la enzima de restricción *Arthrobacter luteus* I (*Alu* I) lo cual causa un cambio de *Leu* (alelo L) a *Val* (alelo V) en la secuencia de aminoácidos en la posición 127 de la GH bovina (Lucy *et al.*, 1993). Se ha demostrado que la frecuencia alelica para el polimorfismo *Alu*I-GH varía mucho entre razas, (Lucy *et al.*, 1993). Dichos autores encontraron que razas lecheras de gran tamaño (Suizo Marrón, Holstein- Frisón) tenían mayor frecuencia del alelo L (1,0 y 0,93 respectivamente) mientras que razas de pequeño tamaño (Jersey, Ayrshire) tenían menor frecuencia del alelo L (0,56 y 0,79 respectivamente). Grochowska *et al.* (2001) y Zwierzchowski *et al.* (2002) también reportaron una menor frecuencia del alelo L en vacas Polish Black and White que en Holstein Friesian.

El polimorfismo *Alu*I-GH fue relacionado con características de producción láctea pero los resultados son contradictorios. Lee *et al.* (1996) encontraron que en líneas de animales seleccionados para alta producción láctea, el alelo V tenía efecto negativo sobre el mérito genético para producción láctea, pero no así en vacas de mediana producción. A su vez el genotipo LL en vacas Polish Black and White producían más leche, grasa y proteína en la primera lactancia, pero no en la segunda y tercera lactancia comparando con vacas portadoras de genotipo LV (Dybus, 2002). Shariflou *et al.* (2000) asociaron el alelo L con mayor producción láctea, grasa y proteína en vacas Holstein Australianas y Schlee *et al.* (1994) reportaron mayores concentraciones sanguíneas de GH en animales del genotipo LL en comparación a los del genotipo LV, pero no encontraron asociación con producción láctea. En contradicción, van der Werf *et al.* (1996) asociaron la presencia del alelo V con caracteres de alta producción láctea y a su vez la variante *Val*¹²⁷ de la bST inyectada intramuscularmente a vacas Holstein aumentó la producción láctea (Eppard *et al.*, 1992). Por otro lado, Sabour *et al.* (1997) no encontraron influencia directa del genotipo sobre los valores de cría en toros, para características de producción aunque los animales LV eran más frecuentes entre los toros Holstein Friesian.

A nivel del gen que codifica para IGF-I varios polimorfismos fueron identificados por diferentes autores. Un polimorfismo reconocido por la enzima de restricción *SnaBI* fue reportado por Ge *et al.* (2001) en la región promotora del gen IGF-I en posición 512, identificado como una transición T/C (alelos A/B) en un grupo de animales seleccionados por altos niveles de IGF-I en sangre. Además dos polimorfismos uno en intrón 4 y otro en intrón 5 fueron reportados por Lien *et al.* (2000) en vacas noruegas, y mas recientemente, Mullen *et al.* (2011) reportaron 9 polimorfismos nuevos a nivel de intrones y exones de dicho gen.

A diferencia de la abundante investigación encontrada sobre la asociación de *AluI*-GH y variables productivas, se encontraron escasos reportes en relación a polimorfismo *SnaBI*-IGF-I y su asociación con variables productivo/reproductivas. La distribución de frecuencias alélicas encontradas para el polimorfismo *SnaBI*-IGF-I fue similar entre autores. Fueron reportadas para el alelo A: 0,55, 0,56 y 0,52 y para el alelo B: 0,45, 0,44 y 0,48 en rodeos Holstein estadounidenses (Hines *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2004) y polacos (Siadkowska *et al.*, 2006), respectivamente.

Si bien Hines *et al.* (1998) y Mullen *et al.* (2011) no encontraron ninguna asociación entre los diferentes genotipos de *SnaBI*-IGF-I y producción de leche, Siadkowska *et al.* (2006) reportaron que el genotipo AB tendió a ser superior a AA y BB en leche corregida por grasa y sólidos totales, debido a que el porcentaje de grasa y proteína fue mayor. Cuatro de los polimorfismos reportados por Mullen *et al.* (2011) a nivel de intrones se asociaron con producción de grasa y proteína en leche, escor de células somáticas y conformación y grasa de carcasa.

Por otro lado, a pesar de que existe acuerdo en la comunidad científica internacional respecto de la importancia del eje somatotrófico en la regulación del metabolismo y producción de la vaca lechera, hemos encontrado escasos o ningún reporte del efecto de los polimorfismos de GH e IGF-I respectivamente sobre la evolución del balance energético, los perfiles metabólicos y endocrinos y parámetros

reproductivos en vacas de leche durante la lactancia. Un único reporte fue encontrado en relación al polimorfismo *AluI*-GH y parámetros endocrinos, metabólicos y reproductivos en vacas Holstein (Balogh *et al.*, 2009a), quienes no encontraron efecto de dicho polimorfismo sobre las concentraciones de BHB, insulina e IGF-I en una muestra de sangre tomada entre los días 4 y 13 posparto, y sobre el tiempo a la primera ovulación postparto.

Se plantearon diferentes hipótesis para esta tesis:

- Se propone que los polimorfismos de *AluI*-GH y *Snabi*-IGF-I están presentes en rodeos nacionales y en equilibrio de Hardy-Weinberg en acuerdo a lo reportado en los países proveedores de la genética que se utiliza en nuestro país.
- Los diferentes genotipos originados por *AluI*-GH y *Snabi*-IGF-I promueven acciones teleofóreticas diferenciales que se reflejan en indicadores metabólicos (AGNE, BHB) y hormonales (insulina e IGF-I) durante el período de transición, que podrían repercutir en la producción láctea y en el desempeño reproductivo.

La investigación llevada a cabo en esta tesis dió lugar a la escritura de dos artículos científicos. El primer artículo titulado: ***Marcadores Moleculares en genes del eje somatotrófico en vacas de leche Holando en el Uruguay***, desarrollado en el capítulo 2 de esta tesis será enviado a la revista Archivos de Zootecnia. Este artículo tiene como objetivo determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes de los genes GH e IGF-I en 4 poblaciones de vacas lecheras de Uruguay y caracterizar genéticamente la población en estudio.

El segundo artículo titulado: *Metabolic and endocrine profiles and reproductive parameters in dairy cows under grazing conditions: effect of polymorphisms in somatotropic axis gene*, desarrollado en el capítulo 3, ha sido enviado y aceptado para su publicación en la revista Acta Veterinaria Scandinavica. Este artículo aborda la problemática de la expresión diferencial de los genotipos de GH e IGF-I sobre los indicadores metabólicos y hormonales y variables productivas y reproductivas en dos tambos comerciales de producción lechera de nuestro país.

Por último se presenta una discusión general y conclusiones globales de la problemática planteada.

**2. MARCADORES MOLECULARES EN GENES DEL EJE SOMATOTROFICO
EN VACAS DE LECHE HOLANDO EN EL URUGUAY**

(Marcadores moleculares asociados a producción láctea en vacas Holandesas).

**MOLECULAR MARKERS IN GENES OF THE SOMATOTROPIC AXIS IN
HOLSTEIN COWS OF URUGUAY.**

Ruprechter, G.^{1*}, M. Carriquiry², A. Meikle¹, P. Nicolini¹ y E. Armstrong³.

1-Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay.

2-Departamento de Producción Animal y Pasturas, 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: Gretel Ruprechter, *e-mail*: gruprechter@adinet.com.uy

2.1 RESUMEN

Existe gran interés a nivel mundial por la búsqueda de marcadores moleculares asociados a la producción de leche en vacas Holandesas. Los genes que codifican para la hormona de crecimiento (GH) y para el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) han sido investigados, debido al rol central de estos genes en el desarrollo mamario y control del metabolismo. A nivel mundial se han reportado varios marcadores moleculares, siendo los más investigados el polimorfismo *AhuI* en GH y *SnabI* en IGF-I. En este trabajo se genotiparon 308 vacas y se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de GH e IGF-I así como la existencia de haplotipos para estos polimorfismos en tres y cuatro rodeos lecheros (comerciales o experimentales) del Uruguay, respectivamente para cada gen. También se realizó la caracterización genética de las cuatro poblaciones. Para el gen GH, el alelo L fue el de mayor frecuencia en los tres tambos analizados (0,821, 0,853 y 0,947), mientras que el alelo V se encontró en baja o muy baja frecuencia (0,179, 0,147 y 0,053) en los tambos comercial 1, comercial 2 y experimental 4, respectivamente, lo que determinó la mayor frecuencia para el genotipo LL. El gen IGF-I presentó una distribución más equitativa de sus alelos: alelo A = 0,609, 0,592, 0,554 y 0,547 y alelo B = 0,391, 0,408, 0,446 y 0,453 para los tambos comercial 1 y 2 y experimental 3 y 4, respectivamente. Se obtuvieron índices bajos o medios de heterocigosidad (H_o mínima = 0,105 para GH en la población experimental 4; H_o máxima = 0,554 para IGF-I en la misma población). Además, los índices F_{IS} fueron bajos a moderados no detectándose desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg. Los valores F_{ST} globales resultaron muy cercanos a cero ($F_{ST} < 0,009$) argumentando a favor de la similitud génica observada entre las poblaciones, siendo las más distantes entre sí las de los tambos experimental 4 y comercial 1 con un F_{ST} de 0,022.

Palabras clave: GH-IGF-I, polimorfismos, vacas lecheras Holandesas.

2.2 SUMMARY

There is great interest worldwide in the search for molecular markers associated with milk production in Holstein cattle. The genes encoding for growth hormone (GH) and insulin-like growth factor I (IGF-I) have been investigated due to their key roles in mammary gland development and metabolism control. Several molecular markers have been reported for these genes, being the *AluI* (GH) and the *SnabI* (IGF-I) polymorphisms the most investigated. In this study, 308 cows were genotyped and allelic and genotypic frequencies for *AluI* (GH) and *SnabI* (IGF-I) polymorphisms, as well as the existence of haplotypes, were determined in three or four commercial and/or experimental dairy farms of Uruguay, for each gene, respectively. Genetic characterization of the four populations was also performed. 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 commercial dairies 1 and 2 and in experimental dairy 4 (0.179, 0.147 and 0.053), respectively, leading to a high frequency of the LL genotype. 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 commercial dairies 1 and 2 and experimental dairies 3 and 4, respectively. Low and moderate values of heterozygosity were obtained (minimum value $H_o = 0.105$ for GH in experimental 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 the observed genetic similarity between populations, being the most distant populations the experimental 4 and commercial 1, with a F_{ST} 0.022.

Key words: GH-IGF-I, polymorphisms, Holstein dairy cows.

2.3 INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la caracterización del potencial genético ha sido un componente importante en la mejora de la producción animal (Lynch y Walsh, 1998). En este sentido, se ha logrado un mejor entendimiento de los factores genéticos que controlan la producción debido a los avances en las áreas de genética molecular, estadística y bioinformática. Existe un gran interés comercial detrás de la búsqueda de modificaciones en la secuencia génica (marcadores moleculares) asociadas con caracteres fenotípicos de interés productivo. En este sentido ya se dispone de “perfiles genéticos” que en base a una muestra de ADN determinan el genotipo del animal para uno o varios genes de interés. Estos pueden ser utilizados *in situ* por el productor brindando una alternativa económica de descartar o seleccionar animales basado en la utilización de marcadores moleculares. La mayoría de los rasgos de importancia económica, como producción y composición de leche en ganado lechero, son características complejas, controladas por muchos genes que interactúan entre sí y con el ambiente (Dekkers, 2004).

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 *AfuI* (Lucy *et al.*, 1993). Este polimorfismo implica 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 *et al.*, 1993). Se han documentado asociaciones entre producción/composición de leche y la presencia de este polimorfismo (Shariflou *et al.*, 2000; Lucy *et al.*, 1993; Grochowska *et al.*, 2001; Zwierzchowski *et al.*, 2002).

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 *et al.*, 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 son contradictorios: se han encontrado asociaciones positivas (Siadkowska *et al.*, 2006) o no se encontró asociación (Hines *et al.*, 1998; Mullen *et al.*, 2011) entre este polimorfismo y variables productivas.

Para poder iniciar un programa de selección asistida por marcadores moleculares es necesario conocer la diversidad y estructura genética poblacional del rodeo lechero en el cual se quiere aplicar. En este sentido, es de interés conocer las frecuencias de los distintos alelos y genotipos, cuantificar la diversidad genética, analizar la posible endogamia y determinar el grado de divergencia de las poblaciones existentes, por medio del estudio de la heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) y los índices de fijación o estadísticos F (F_{IS} y F_{ST}). Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes de los genes GH e IGF-I, realizar el estudio de haplotipos y la caracterización genética de cuatro poblaciones de vacas lecheras del Uruguay.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Se extrajeron al azar muestras de sangre ($n = 308$) de vacas Holandesas (Uruguay) clínicamente sanas en tubos BD Vacutainer® (Becton Dickinson, NJ, USA) con anticoagulante (K_2 EDTA), por venopunción coccígea. Las vacas provenían de dos tambos comerciales: comercial 1 ($n = 110$) y comercial 2 ($n = 76$) con una población total de 700 y 450 vacas en ordeño, respectivamente, y de dos tambos experimentales:

experimental 3 (n = 46) y experimental 4 (n = 76) y con una población total de 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 (Tabla I).

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

Tambo	Nº de vacas totales (nº vacas muestreadas)	Origen del semen	Criterios de selección del semen
Comercial 1	700 (110)	Nacional (Uruguay) Canadiense Estadounidense	Sólidos totales + en ubre
Comercial 2	450 (76)	Neocelandés	Sólidos totales Bajo tamaño corporal + en ubre y patas Fertilidad Longevidad
Experimental 3	200 (46)	Estadounidense	+ en proteína Facilidad de parto Menor tamaño
Experimental 4	110 (76)	Canadiense Estadounidense	Facilidad de parto Precio

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 *AluI* del gen GH y *SnaBI* del gen IGF-I se realizó por PCR-RFLP según Lucy *et al.* (1993) y Ge *et al.* (1997), respectivamente. Brevemente, se amplificó un fragmento del gen GH de 427 pares de bases (pb) utilizando los cebadores: 5'-CCGTGTCTATGAGAAGC-3' (sentido) y 5'-TTCTTGAGCAGCGCGT-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 dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂ y 0,5U de Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies, CA, USA). Dicho 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 µL) 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). 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 MgCl₂ y 0,8U 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 µL) por 3 h a 37°C con 5U de *SnaBI* (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).

Debido a problemas de calidad del ADN de las muestras de la población experimental 3, existieron errores metodológicos que impidieron identificar correctamente los diferentes genotipos de GH por lo que no se tomaron en cuenta estos resultados para el análisis.

Para cada gen se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas, se realizaron pruebas de equilibrio Hardy-Weinberg y de diferenciación génica y genotípica, se calcularon las H_o , H_e y los estadísticos F (Weir y Cockerham, 1984) utilizando el programa Genepop v4 (Rousset, 2008). El estudio de haplotipos se llevó a cabo con el programa Haploview 4.2 (Barrett *et al.*, 2005).

2.5 RESULTADOS

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 (Tabla II). Las frecuencias genotípicas difirieron entre tambos ($P = 0,005$), ya que la frecuencia del homocigoto LL del tambo experimental 4 fue significativamente mayor que la del tambo comercial 1 (0,894 vs. 0,669; $P = 0,001$) y mostró una tendencia a ser mayor que la del comercial 2 (0,894 vs. 0,720; $P = 0,066$). Sin embargo, los tambos comerciales 1 y 2 no presentaron diferenciación genotípica. Estos resultados determinaron muy bajos índices de heterocigosidad en el tambo experimental 4 y bajos a medios en los tambos comerciales (1 y 2) (Tabla III). Los índices F_{IS} son bajos y muestran una leve tendencia hacia el exceso de heterocigotas en las tres poblaciones analizadas, sin que eso genere desviaciones de lo esperado para el equilibrio Hardy-Weinberg ($P > 0,999$, en el test de Probabilidad). Los índices F_{ST} son bajos y reflejan la mayor diferencia en las frecuencias alélicas entre las poblaciones de experimental 4 y comercial 2 y experimental 4 y comercial 1 (Tabla IV).

Tabla II. Frecuencias alélicas y genotípicas de los marcadores *AluI* GH e *SnabI* IGF-I en los 4 tambos.

Marcador	Tambo	Nº de animales	Frecuencia alélica		Frecuencia genotípica		
			L	V	LL	LV	VV
GH	Comercial 1	109	0,821	0,179	0,669	0,302	0,027
	Comercial 2	68	0,853	0,147	0,720	0,264	0,014
	Experimental 4	76	0,947	0,053	0,894	0,105	0,000
IGF-I			A	B	AA	AB	BB
	Comercial 1	110	0,609	0,391	0,345	0,527	0,127
	Comercial 2	76	0,592	0,408	0,328	0,526	0,144
	Experimental 3	46	0,554	0,446	0,347	0,413	0,239
	Experimental 4	74	0,547	0,453	0,270	0,554	0,175

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 frecuencia que B (Tabla II). El genotipo más frecuente fue el heterocigoto AB seguido del AA y por último el BB, no difiriendo sus frecuencias entre tambos ($P = 0,562$). Los valores de heterocigosidad son medios con valores observados y esperados similares, excepto para el tambo experimental 3 (Tabla III). 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 (Tabla IV), 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 ($P = 0,193$ cuando la hipótesis alternativa es el déficit de heterocigotos y $P = 0,368$ en el test de Probabilidad). En los otros tres tambos

(experimental 4, comercial 1 y comercial 2), los índices F_{IS} son bajos a medios, con una tendencia hacia el exceso de heterocigotos, no observándose desvíos de lo esperado bajo una situación de equilibrio génico ($P > 0,320$ en el test de Probabilidad). Los valores de F_{ST} son cercanos a cero, reflejando la alta similitud observada entre las poblaciones muestreadas (Tablas IV).

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

Marcador	Tambo	H_o	H_e
GH	Comercial 1	0,302	0,295
	Comercial 2	0,264	0,252
	Experimental 4	0,105	0,100
IGF-I	Comercial 1	0,527	0,478
	Comercial 2	0,526	0,486
	Experimental 3	0,413	0,500
	Experimental 4	0,554	0,498

Tabla IV. Matrices de estadísticos F_{IS} y F_{ST} de los tambos analizados (F_{IS} en la diagonal, en negrita) para cada locus y para todos los loci (Global).

GH	Comercial 1	Comercial 2	Experimental 4
Comercial 1	- 0,025		
Comercial 2	- 0,002	- 0,047	
Experimental 4	0,064	0,043	- 0,049

IGF-I	Comercial 1	Comercial 2	Experimental 3	Experimental 4
Comercial 1	- 0,102			
Comercial 2	- 0,004	- 0,083		
Experimental 3	- 0,001	- 0,006	0,174	-
Experimental 4	0,022	0,001	- 0,008	- 0,111

Global	Comercial 1	Comercial 2	Experimental 3	Experimental 4
Comercial 1	- 0,073			
Comercial 2	- 0,003	- 0,071		
Experimental 3	- 0,001	- 0,006	0,174	
Experimental 4	0,022	0,009	- 0,008	- 0,100

El número de individuos de acuerdo a las combinaciones alélicas de los dos marcadores moleculares presentes en cada tambo se detalla en la Tabla V. Debido a la escasa (comercial 1 y comercial 2) o nula (experimental 4) frecuencia de homocigotas VV en las distintas poblaciones, se observa la ausencia de los individuos VVAA y VVBB en el tambo comercial 1, y de los individuos VVAA, VVAB y LVBB en el tambo comercial 2. El estudio de haplotipos no indicó evidencia de la existencia de desequilibrio gamético entre los alelos de ambos loci ($D' = 0,322$, $LOD = 1,12$, $r^2 = 0,027$), no identificándose la existencia de haplotipos (Barrett *et al.*, 2005).

Tabla V. 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 los 3 tambos.

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

2.6 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudió la diversidad y estructura poblacional de cuatro poblaciones de vacas lecheras Holando Uruguayo, dos provenientes de tambos comerciales (1 y 2) y dos de tambos experimentales (3 y 4), para genes del eje somatotrófico, responsables de la partición de nutrientes para producción de leche (Etherton y Bauman, 1998). El análisis poblacional es un paso previo fundamental en caso de que se deseen utilizar polimorfismos genéticos en selección asistida por marcadores.

Para el gen GH, existen varios reportes internacionales, en sistemas de producción basados en estabulación y alimentación con piensos totalmente mezclados (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 *et al.*, 1998; Lucy *et al.*, 1993; Shariflou *et al.*, 2000). Asimismo, en un trabajo previo realizado por nuestro grupo de investigación (Ruprechter *et al.*, 2011), que tuvo como objetivo iniciar estudios de asociación de estos marcadores con parámetros productivos y reproductivos, perfiles endócrinos 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, debida probablemente a la selección indirecta a favor de dicho alelo, si bien existen diferencias entre los tambos. La frecuencia del alelo L en el tambo experimental 4, se aproxima a los resultados obtenidos en rodeos lecheros húngaros (0,89, Balogh *et al.*, 2009) y norteamericanos (0,92, Lucy *et al.*, 1993). La frecuencia de este alelo encontrada en los tambos comerciales 1 y 2 se asemeja más a la encontrada en rodeos de Australia, Japón y Alemania (0,80, Shariflou *et al.*, 2000). Shariflou *et al.* (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. Como el tambo experimental 4 utiliza semen congelado de origen norteamericano y canadiense, es esperable que la frecuencia de dicho alelo se asemeje a la reportada en dichos rodeos. Además en el tambo experimental 4 el efecto del flujo génico, de la selección indirecta y de la endogamia debido al bajo número de padres utilizados (37 vacas/toro) explicarían el alto grado de homocigosis que presenta el gen GH en este tambo. Por otro lado, en el tambo comercial 1 se utiliza tanto semen nacional como importado de Canadá y Estados Unidos y en el tambo comercial 2 semen congelado de origen neocelandés, por lo que la presión de selección indirecta a favor del alelo L podría ser menor, argumentando a

favor de la menor frecuencia encontrada de este alelo en estas poblaciones en comparación con el experimental 4. Estos comentarios estarían apoyados por los índices F_{ST} que reflejan una mayor divergencia genética entre experimental 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.

Los reportes de la asociación del genotipo IGF-I y producción de leche son escasos y no concluyentes. Siadkowska *et al.* (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 *et al.* (1998) y Mullen *et al.* (2011) no encontraron asociaciones entre este polimorfismo y variables productivas. Estudios previos de nuestro grupo de investigación (Ruprechter *et al.*, 2011) encontraron 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, a pesar de que Mullen *et al.* (2011) no encontraron asociación entre el *Snabi*-IGF-I y parámetros productivos, reportan la asociación de otros cuatro polimorfismos localizados en intrones de este gen con producción de proteína y grasa y recuento de células somáticas en vacas lecheras Holstein-Friesian. Además se encontró 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 (Ruprechter *et al.*, 2011). Estos hallazgos sostienen la importancia del gen IGF-I en producción lechera.

En el presente trabajo, el alelo A presentó una frecuencia superior al alelo B en los cuatro tambos evaluados, existiendo una distribución más similar de las frecuencias de ambos alelos en comparación con lo hallado para GH. Las frecuencias halladas en este trabajo concuerdan con las reportadas 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 Holstein estadounidenses (Hines *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2004) y polacos (Siadkowska *et al.*, 2006), respectivamente. Relacionado a esto

se observa para el gen IGF-I una predominancia de heterocigotos AB en desmedro de los homocigotos AA y BB, lo cual podría ser indicio de selección estabilizadora a favor del heterocigoto, a diferencia de lo observado en el gen GH donde la predominancia de uno de los homocigotos se relacionaría con selección direccional a nivel de las distintas poblaciones evaluadas. En el tambo experimental 3 se observa un déficit de heterocigotos que podría deberse principalmente al efecto del uso exclusivo de semen de un único origen.

No hemos encontrado estudios de caracterización de la estructura poblacional de vacas Holando en Uruguay utilizando estos marcadores. Sí existen reportes de caracterización génica de la raza Holando Uruguayo utilizando los grupos sanguíneos como marcadores moleculares (Kelly *et al.*, 2002). En dicho trabajo se concluyó que existiría una disminución de la variabilidad génica 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 de experimental 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. Estos resultados, sumados a la posible acción de diferentes tipos de selección sobre cada gen, apoyarían los resultados observados respecto a la no existencia de haplotipos entre los alelos de ambos loci.

Los valores de F_{ST} globales son muy cercanos a cero argumentando a favor de la similitud génica entre las poblaciones, siendo la población experimental 4 la más divergente de todas debido probablemente al origen del semen y al menor número de padres utilizados. La población del tambo experimental 4 tendería a ser más semejante a la población norteamericana, estando de acuerdo con lo reportado por Shariflou *et al.* (2000) y Kelly *et al.* (2002), tendencia lógica teniendo en cuenta el origen del semen utilizado en este tambo.

Como era esperable de acuerdo a las frecuencias alélicas de ambos genes, la combinación genotípica más frecuente fue LLAB. El estudio de haplotipos no indicó evidencia de la existencia de desequilibrio gamético entre los alelos de ambos loci, no identificándose la existencia de haplotipos (Barrett *et al.*, 2005), es decir, no se puede afirmar que estas combinaciones alélicas son heredadas en forma dependiente o no.

De estos resultados se sugiere que la selección a favor de producción de leche estaría conduciendo indirectamente a la fijación del alelo L del gen GH en las poblaciones Holando en el Uruguay, limitando una posible selección asistida por dicho marcador molecular (*AluI*-GH). La tendencia no es tan clara en el caso del marcador *SnabI*-IGF-I, en la cual existiría indicio de selección estabilizadora a favor del heterocigoto AB. Por lo tanto su uso en selección asistida en función de su asociación con parámetros reproductivos, sería interesante debido a que son caracteres de baja heredabilidad.

2.7 AGRADECIMIENTOS

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

2.8 BIBLIOGRAFÍA

Balogh, O., K. Kovács, M. Kulcsár, A. Gáspárdy, A. Zsolnai, L. Kátai, A. Pécsi, L. Fésüs, W.R. Butler, Gy. Huszenicza: *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* 2009, 71: 553–559.

Barrett, J.C., B. Fry, J. Maller, M.J. Daly.2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. Jan 15 [PubMed ID: 15297300].

Dekkers, J.C. 2004. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *J. Anim. Sci.* 82 (sup): 313-328.

Etherton, T.D. y D.E. Bauman. 1998. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physical Rev*, 78: 745.

Furu, L.M., G.W. Katzmer, S.A. Zinn, H. Rycroft. 1998. Somatotropin MspI and AluI polymorphism's relative to indicators of the genetic merit of Holstein AI sires. *J. Anim. Sci.* 76:75.

Ge, W., M.E. Davis, H.C. Hines. 1997. Two SSCP alleles detected in the 5'-flanking region of bovine IGF1 gene. *Anim. Genetics* 28:155.

Grochowska, R., P. Sorensen, L. Zwierzchowski, M. Snochowski, P. Lovendahl. 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: 450.

Hines, H.C., W. Ge, Q. Zhao, M.E. Davis. 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.

Kawasaki, E.S. 1990. Simple preparation from blood, cells and others fluids. In: MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White (ed) *PCR Protocols. A guide to Methods and application*. New York: Academic Press, pp 3-12.

Kelly, E.L., N. Mortari, D. De Andrés, A. Postiglioni. 2002. Estudio de la estructura genética de la raza Holando Uruguayo mediante marcadores genéticos. Comparación intraracial. *Veterinaria*, 37(147-148): 7-14.

Li, C., J. Basarab, W.M. Snelling, B. Benkel, B. Murdoch, C. Hansen, S.S. Moore. 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.

Lucy, M.C., S.D. Hauser, P.J. Eppard, G.G. Krivi, J.H. Clark, D.E. Bauman, R.J. Collier. 1993. Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. *Domest. Anim. Endocrinol*, 10: 325-333.

Lynch, M., y B. Walsh. 1998 *Genetics and Data Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Mullen, M. P., D. P. Berry, D. J. Howard, M. G. Diskin, C. O. Lynch, L. Giblin, D. A. Kenny, D. A. Magee, K. G. Meade and S. M. Waters. 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.

Rousset, F. 2008. Genepop v4: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Res.* 8: 103-106.

Rupprechter, G., M. Carriquiry, J. M. Ramos, I. Pereira, A. Meikle. 2011. Metabolic and endocrine profiles and reproductive parameters in dairy cows under grazing conditions: effect of polymorphisms in somatotropic axis genes. *Acta Veterinaria Scandinavica*, (Aceptado).

Schoenle, E., J. Zapf, R.E. Humbel, E.R. Froesch. 1982. Insuline like growth factor I stimulates growth in hypophysecomized rats. *Nature*, 296:252.

Shariflou, M.R., C. Moran, F.W. Nicholas. 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.

Siadkowska, E., L. Zwierzchowski, J. Oprzadek, N. Strzalkowska, E. Bagnicka, J. Kryzyzewski. 2006. Effect of polymorphism in IGF-I gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 3: 225-236.

Weir, B.S. y C.C. Cockerham. 1984. Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evol.* 38: 1358-1370.

Zwierzchowski, L., J. Krzyzewski, N. Strzalkowska, E. Siadkowska, 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. Pap. Rep.* 20: 213-227.

3. METABOLIC AND ENDOCRINE PROFILES AND REPRODUCTIVE PARAMETERS IN DAIRY COWS UNDER GRAZING CONDITIONS: EFFECT OF POLYMORPHISMS IN SOMATOTROPIC AXIS GENES.

Metabolic and endocrine profiles and reproductive parameters in dairy cows under grazing conditions: effect of polymorphisms in somatotropic axis genes.

Ruprechter, G.^A, M. Carriquiry^B, J. M. Ramos^C, I. Pereira^A, A. Meikle^A.

^A Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Las Placas 1550, Uruguay.

^B Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Av. E. Garzón 780, Uruguay.

^C Universidad de la Empresa, Montevideo, Uruguay.

Corresponding author: Gretel Ruprechter. Laboratorio de técnicas nucleares, Facultad de Veterinaria, Las Placas 1550, Montevideo, Uruguay.

Tel: (+598)26223106; Fax: (+5982)26223106. E-mail gruprechter@adinet.com.uy

Este artículo en formato PDF se encuentra disponible en la siguiente página web:

<http://www.actavetscand.com/content/pdf/1751-0147-53-35.pdf>

3.1 SUMMARY

The present study hypothesized that GH-AluI and IGF-I-SnabI polymorphisms do change the metabolic/endocrine profiles in Holstein cows during the transition period, which in turn are associated with productive and reproductive parameters.

Holstein cows (Farm 1, primiparous cows, n=110, and Farm 2, multiparous cows, n=76) under grazing conditions were selected and GH and IGF-I genotypes were determined. Blood samples for metabolic/endocrine determinations were taken during the transition period and early lactation in both farms. Data was analyzed by farm using a repeated measures analyses including GH and IGF-I genotypes, days and interactions as fixed effects, sire and cow as random effects and calving date as covariate.

Frequencies of GH and IGF-I alleles were L:0.84, V:0.16 and A:0.60, B:0.40, respectively. The GH genotype was not associated with productive or reproductive variables, but interaction with days affected FCM yield in multiparous (farm 2) cows (LL yielded more than LV cows) in early lactation. The GH genotype affected NEFA and IGF-I concentrations in farm 1 (LV had higher NEFA and lower IGF-I than LL cows) suggesting a better energy status of LL cows.

There was no effect of IGF-I genotype on productive variables, but a trend was found for FCM in farm 2 (AB cows yielded more than AA cows). IGF-I genotype affected calving first service interval in farm 1, and the interaction with days tended to affect FCM yield (AB cows had a shorter interval and yielded more FCM than BB cows). IGF-I genotype affected BHB, NEFA, and insulin concentrations in farm 1: primiparous BB cows had lower NEFA and BHB and higher insulin concentrations. In farm 2, there was no effect of IGF-I genotype, but there was an interaction with days on IGF-I concentration, suggesting a greater uncoupling somatotropic axis in AB and BB than AA cows, being in accordance with greater FCM yield in AB cows.

The GH and IGF-I genotypes had no substantial effect on productive parameters, although IGF-I genotype affected calving-first service interval in primiparous cows.

Besides, these genotypes may modify the endocrine/metabolic profiles of the transition dairy cow under grazing conditions.

3.2. INTRODUCTION

Energy balance of dairy cows becomes negative (NEB) during the transition period due to increased nutrient requirements that typically exceed dietary intakes. With the onset of lactation, plasma levels of non-esterified fatty acids (NEFA) and B-hydroxybutyrate (BHB) increase markedly, according to the magnitude of adipose tissue mobilization, to provide additional energy for maintenance and milk production [1-3]. Growth hormone (GH) is known to be responsible for galactopoiesis and persistency of lactation [1, 4], and the uncoupled somatotrophic axis (GH-insulin-like growth factor I IGF-I axis) mediates nutrient partitioning for lactogenesis in high producing dairy cows [5]. Concentrations of GH are usually increased during early postpartum and its metabolic effects are antagonistic to insulin by enhancing lipolysis in the adipose tissue and gluconeogenesis in the liver [1, 6, 7]. Thus, insulin resistance develops to help direct nutrients from insulin-sensitive tissues to the lactating mammary gland [1]. Indeed, genetically-selected dairy cows had increased GH and reduced IGF-I and insulin concentrations during early lactation [8]. Since IGF-I and insulin affect ovarian function, low concentrations of these hormones during the postpartum period are associated with prolonged acyclicity [9-13]. As GH has proven to play a key role on the regulation of metabolism and milk production by modulating the expression of many genes, including IGF-I [14, 15], these two genes - GH and IGF-I – could be considered candidate gene markers for productive and reproductive traits.

A polymorphic site of the GH gene that results in an amino acid change at position 127 - leucine, (L) to valine, (V) - detected by AluI, has been linked to milk production traits [16]. However, research results have been controversial as several

authors [17-20], reported increased production traits associated with the L allele, while others [21-23] determined a favorable effect of the V allele on production. In contrast, Yao et al. [24] were not able to prove any association between this polymorphism and production traits. Very few studies have been performed regarding the relationship between GH-AluI genotype and reproduction [25-27]. Lechniak et al. [25] reported that homozygous VV beef bulls tended to present greater non-return rates suggesting a beneficial effect on reproduction whereas no effect of this polymorphism was found on number and diameter of oocytes collected [26]. Balogh et al. [27] did not find an effect of this polymorphism on days to first postpartum ovulation in dairy cows.

A polymorphic site in the first promoter region of the bovine IGF-I gene was found by Ge et al. [28]. This polymorphism was identified as a point mutation, T (allele A) to C (allele B) transition, also referred to SnaBI by the same author. Unlike the abundant reports found in relation to GH-AluI genotype, scarce reports exist regarding the relationship between milk production and the IGF-I-SnaBI genotype. Siadkowska et al. [29] determined that Polish Holstein-Friesian cows carrying the AB genotype yielded more daily fat-corrected-milk (FCM) than those of AA and BB genotypes, while Hines et al. [30] found no association between IGF-I-SnaBI genotype and production traits in Holstein cattle. In addition, the BB genotype has been associated with greater body weight at weaning in commercial beef lines of *Bos taurus* [31] and greater growth rates in Holstein-Friesian bulls [29]. We have not found reports of IGF-I polymorphism and bovine reproduction.

Few studies performed in different bovine breeds and physiological stages focused on the mechanism by which these GH or IGF-I genotypes affect metabolic and endocrine profiles [32, 28, 33, 34]. Only one report on the mentioned GH and IGF-I polymorphisms in dairy cow during the transition period was found. Balogh et al. [33] could not demonstrate any effect of GH-AluI genotype on BHB, insulin, IGF-I, and leptin concentrations in one blood sample collected between 4 and 13 days postpartum in Holstein Friesian dairy cows.

The present study hypothesized that GH-AluI and IGF-I-SnabI genotypes do change the metabolic and endocrine profiles in Holstein cows during the transition period, which in turn may be associated with the productive and reproductive responses.

3.3 MATERIALS AND METHODS

Animals and Experimental Design

Holstein cows under grazing conditions from two commercial dairy herds in Uruguay were used. All procedures were carried out in accordance with regulations of the Animal Experimentation Committee (Veterinary Faculty, University of Uruguay, Uruguay). Blood samples collected by coccygeal venopunction into tubes Vacutainer® (Becton Dickinson, NJ, USA) containing K3EDTA were used to determine GH and IGF-I genotypes. Preliminary data of milk production and composition according to these GH and IGF-I genotype has been published before [35].

Farm 1: Primiparous Holstein cows that calved between March and May were randomly selected ($n = 110$) from a 700-cow herd. All cows grazed a mixture of ryegrass (*Lolium multiflorum*) in the morning and alfalfa (*Medicago sativa*) in the afternoon and were supplemented with 12 kg dry matter (DM) of corn silage, 5 kg DM of high-moisture corn grain, and 2 kg DM sunflower meal. The diet offered had 17% crude protein and 1.7 Mcal/kg DM of net energy of lactation (NRC, 2001). Cows were milked twice daily and milk yield and composition (fat and protein) were measured once monthly until the end of lactation. Body condition score (BCS) was determined at -7 ± 4 , and exactly at 30 and 60 days postpartum (dpp) using a 5- point scale [36]. At the same time, blood samples for metabolites and hormones analyses were collected by coccygeal venopunction into heparinized tubes from 94 cows, centrifuged at 3000 Xg for 20 min and plasma was stored frozen (-20°C) until further analysis. The breeding period consisted of 4 months from June to September. Oestrus was detected twice a day

and cows were artificially inseminated (AI), 12 hours after heat detection by the same inseminator. Pregnancy diagnosis was performed by rectal palpation 45 days after AI.

Farm 2: Multiparous Holstein cows ($n = 76$) that calved between June and August were randomly selected from 450-cow herd; cows had 1 (L2, $n = 36$) or 2 (L3, $n = 24$) previous lactations. During the last month before calving, cows grazed on a native pasture and received 11 kg DM/cow/day of a diet composed of 7 kg DM of sorghum silage, 3 kg DM of sorghum grain, 1 kg DM of sunflower meal (36% crude protein) and 100 g of urea. After calving, cows received a commercial mineral supplement and were managed under a rotational grazing system with supplementary feed added to maintain a pasture forage availability of 1,200 kg DM and an estimated total intake of 18 kg DM/cow/day. The diet offered had 17% crude protein and 1.5 Mcal/kg DM of net energy of lactation (NRC, 2001). Cows were milked twice daily and milk yield and composition (fat and protein) were measured once weekly for the first month of lactation and afterwards monthly until the end of lactation. Cow BCS was determined every 15 days from -30 to 60 dpp as described for farm 1. Blood samples for metabolites and hormones analyses were collected from 29 cows as described in farm 1 every 15 days from -30 dpp to calving, and then once a week up to 60 dpp. The breeding period consisted in 3 months from September to November: during the first two months AI was used, insemination 12 hours after oestrus detection twice a day, and natural mating was used during the last month. Pregnancy diagnosis was performed as described in farm 1.

Laboratory analysis

Genotyping of GH and IGF-I and hormone (insulin and IGF-I) analyses were performed at the Nuclear Techniques Laboratory (Veterinary Faculty, University of Uruguay, Uruguay), while metabolites analyses (NEFA and BHB) were performed at DILAVE Laboratory (Pando, Uruguay).

Extraction of DNA was performed according to Kawasaki [37] and DNA was stored frozen (-20°C) until further analysis. The GH-AluI genotype was determined by a

polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) according to Lucy et al. [18]. Primers designed to amplify a 428-bp sequence of the bovine GH gene, GH For.: 5'-CCGTGTCTATGAGAAGC-3' and GH Rev.: 5'-TTCTTGAGCAGCGCGT-3' were used. A Digestion of PCR product was performed with 6U of AluI (Fermentas Inc., MD, USA) restriction endonuclease. Fragments of DNA were resolved in a 2% agarose gel stained with ethidium bromide (EtBr) and fragments of either leucine (L; 265, 96, 51 and 16 bp) or valine (V; 265, 147 and 16 bp) alleles were visualized under UV light (Clever Scientific, England).

The IGF-I-SnabI genotype was determined by PCR-RFLP according to Ge et al, [28]. Primers designed to amplify a 249-bp sequence of the bovine IGF-I gene, IGF-I For.: 5'-ATTACAAAGCTGCCTGCCCC-3' and IGF-I Rev.: 5'-ACCTTACCCGTATGAAAGGAATATACGT-3' were used and PCR products digestion was performed with 5U of SnabI (Fementas Inc., MD, USA) restriction endonuclease. The DNA fragments were resolved in a 3% agarose gel stained with EtBr and fragments of either T (A) (223 and 26 bp) or C (B) (undigested, 249 bp) alleles were visualized under UV light (Clever Scientific, England).

Plasma insulin concentrations were determined by a ¹²⁵I-Insulin RIA kit (Diagnostic Products Co., Los Angeles, California, USA). The assay sensitivity was 1.3 μ IU/mL and the intra-assay and inter-assay coefficients of variation were less than 8.2 and 10.1% for control 1 (4.2 μ IU/mL) and 9.4 and 11.3% for control 2 (12.6 μ IU/mL), respectively. Plasma IGF-I concentrations were determined by the IGF1 RIACT (Cis Bio International, GIF SUR YVETTE CEDEX, France). The assay sensitivity was 16 ng/mL and the intra-assay coefficient of variation were 3.4 and 5.8% for control 1 (50.4 ng/mL) and 16 and 17% for control 2 (709 ng/mL), respectively.

Plasma NEFA and BHB concentrations were assayed by spectrophotometry using commercial kits: Kat. #FA 115 kit (Wako Chemicals, Richmond, VA, USA) and Kat. #RB 1007 (Randox Laboratories Ltd, Ardmore, UK), respectively. The intra-and

inter-assay coefficient of variations for both metabolites were less than 7.3 and 9.7%, respectively.

Statistical analyses

Data were analyzed in a complete randomized design by farm using the SAS program (Statistical Analysis System; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Univariate analyses were performed on all variables to identify outliers and inconsistencies and to verify normality of residuals. Production traits and hormone and metabolite concentrations were analyzed by repeated measures using the MIXED procedure with days as the repeated effect and first-order autoregressive (for evenly spaced data) or spatial power law (for unevenly spaced data) as the covariance structure. The Kenward-Rogers procedure was used to adjust the denominator degree of freedom. The model included GH and IGF-I genotypes, dpp, and interactions as fixed effects, and sire and cow as random effects and calving date as covariate. Interactions remained in the model if $P < 0.10$. Pearson's linear correlation was estimated between predicted and observed data to evaluate model adjustment. Reproductive traits (calving-first service interval, number of services per conception and total pregnancy rate) were analyzed with a generalized linear model (GENMOD procedure) with a Poisson distribution and log transformation (calving-first service interval) or a binomial distribution and logit transformation (pregnancy rate). The model included the effect of GH and IGF-I genotypes as fixed effects and calving date as a covariate. Results are expressed as lsmeans (LSM) \pm SE. For all results, means were considered to differ when $P \leq 0.05$ and trends were identified when $0.05 < P < 0.10$.

3.4. RESULTS

A χ^2 test showed that allele frequency and genotypes of GH and IGF-I were in Hardy–Weinberg equilibrium ($P = 0.97$) and did not differ between farms ($P > 0.28$). GH allele frequencies were L (0.84) and V (0.16), while IGF-I allele distribution were A (0.60) and B (0.40). The number of cows for each genotype was LL ($n = 122$), LV ($n = 51$) and VV ($n = 4$) for GH genotypes and AA ($n = 63$), AB ($n = 98$) and BB ($n = 25$) for IGF-I genotypes. Due to the unequal distribution of GH genotypes in our study (dominance of the L allele and low frequency of V allele) we exclude VV genotype from further analysis.

Productive and reproductive responses

Correlations between predicted and observed values for all productive and reproductive variables were between 0.47 and 0.81. The GH genotype was not associated with productive variables in either of the farms (Tables 1 and 2, Figure 1A and B). While no effect of the interaction between GH genotype and dpp on productive variables was observed in farm 1 (primiparous cows), a trend was observed on 4%FCM yield ($P = 0.07$) in farm 2 (multiparous cows), as LL cows presented greater FCM yield than LV cows during early lactation (15 and 75 dpp, Figure 1B). The GH genotype had no effect on reproductive variables in none of the farms studied (Tables 1 and 2).

Table 1. F-tests of fixed effects included in the model for productive/reproductive parameters and metabolic/endocrine variables and BCS of Holstein cows under grazing conditions in two commercial farms. Fixed effects are GH and IGF-I genotype and days post partum (dpp).

	Farm 1			Farm 2		
	GH	IGF-I	dpp	GH	IGF-I	dpp
Milk (L)	0.43	0.25	< 0.01	0.41	0.18	< 0.01
FCM (L)	0.54	0.24	< 0.01	0.56	0.09	< 0.01
Total solids (kg)	0.50	0.23	< 0.01	0.44	0.13	< 0.01
Calving 1 st service (days)	0.26	< 0.01	-	0.23	0.17	-
Service/conception	0.74	0.68	-	0.45	0.90	-
Pregnancy rates	0.97	0.96	-	0.80	0.97	-
BCS	0.42	0.58	0.86	0.42	0.95	< 0.01
BHB (mmol/L)	0.31	0.01	0.09	0.86	0.77	< 0.01
NEFA (mmol/L)	0.01	< 0.01	0.06	0.77	0.44	< 0.01
Insulin (µUI/mL)	0.99	0.02	< 0.01	0.53	0.91	< 0.01
IGF-I (ng/mL)	0.09	0.34	< 0.01	0.85	0.95	< 0.01

Table 2. Productive/reproductive parameters and metabolic/endocrine variables (LSM± SE) for GH genotypes of Holstein cows in two commercial farms.

	Farm 1			Farm 2		
	GH genotype			GH genotype		
	LL	LV	SE	LL	LV	SE
Milk (L)	17.9	17.5	0.50	23.1	22.1	0.80
FCM (L)	15.9	15.5	0.45	21.6	21.0	0.91
Total solids (kg)	1.14	1.11	0.03	1.60	1.54	0.06
Calving 1 st service (days)	88	86	9	79	83	4
Service/conception	2.3	2.2	0.2	1.3	1.6	0.1
Pregnancy rates	80	78	7	72	64	10
NEFA (mmol/L)	0.39 ^a	0.41 ^b	0.02	0.34	0.33	0.03
BHB (mmol/L)	0.25	0.26	0.01	0.63	0.60	0.06
Insulin (µUI/mL)	3.5	3.5	0.23	2.60	2.81	0.38
IGF-I (ng/mL)	98.5 ^x	79.4 ^y	7.45	113.64	113.92	11.14
BCS	2.9	2.7	0.2	3.04	3.00	0.04

^{ab} Values marked with different letters are significantly different at P<0.05

^{xy} Values marked with different letters are a trend at P<0.10

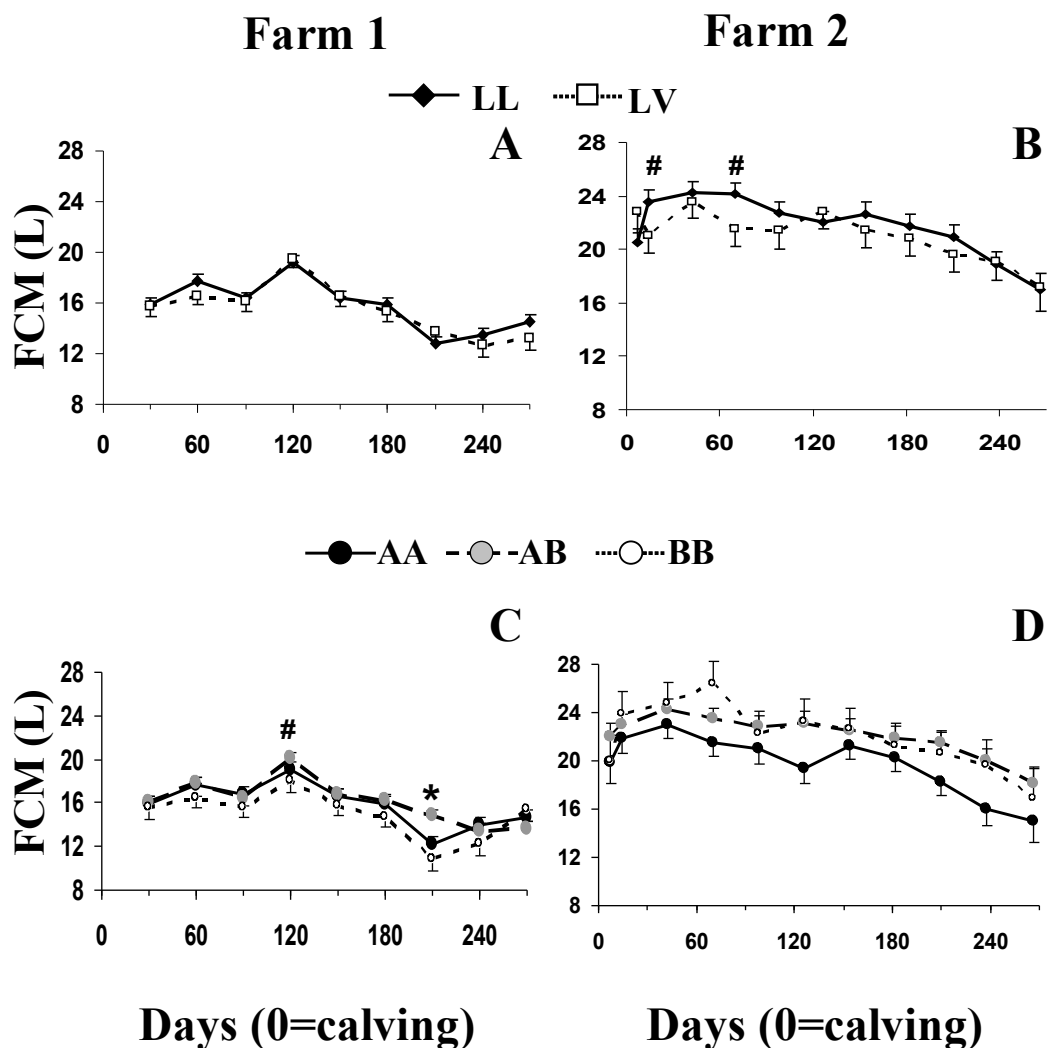


Figure 1. Fat corrected milk yield for LL and LV genotypes (A, B) and AA, AB, and BB genotypes (C, D) of Holstein cows in Farm 1 (A, C) and Farm 2 (B, D). Asterisks denote differences at $P < 0.05$, while # denotes trends $0.05 < P < 0.10$.

The IGF-I genotype had no effect on the productive variables in farm 1 (Tables 1 and 3), but a trend for an effect of the interaction of IGF-I genotype and dpp was observed in 4%FCM yield ($P = 0.09$), as AB cows yielded more FCM than BB cows at 120 and 210

dpp (Figure 1C). In farm 2, IGF-I genotype tended ($P = 0.09$) to affect FCM yield (Table 1) as AB cows had greater FCM yield than AA cows ($P = 0.03$), while no differences were found between AB and BB cows. Fat-corrected-milk yield was numerically greater for BB than AA cows (21.9 vs. 19.7 ± 1.05 kg/d) but this difference did not reach significance ($P = 0.16$) (Table 3, Figure 1D).

The IGF-I genotype had a significant effect on calving-first service interval only in farm 1 (Table 1), as AB cows had a shorter interval than BB cows (Table 3). No other effect of IGF-I genotype was observed on reproductive variables (Table 3).

Table 3. Productive/reproductive parameters and metabolic/endocrine variables (LSM \pm SE) for IGF-I genotypes of Holstein cows in two commercial farms.

	Farm 1				Farm 2			
	IGF-I genotype				IGF-I genotype			
	AA	AB	BB	SM	AA	AB	BB	SM
Milk (L)	18.0	18.2	16.9	0.56	21.4	23.4	22.8	0.96
FCM (L)	15.9	16.2	15.0	0.51	19.7 ^a	22.1 ^b	21.9 ^{ab}	1.05
Total solids (kg)	1.13	1.16	1.08	0.04	1.46 ^a	1.62 ^b	1.60 ^{ab}	0.07
Calving 1 st service (days)	85 ^{ab}	73 ^b	103 ^a	10	85	81	77	5
Service/conception	2.2	2.5	2.2	0.3	1.5	1.4	1.5	0.2
Pregnancy rates	80	82	74	8	68	69	66	10
NEFA (mmol/L)	0.42 ^a	0.41 ^a	0.37 ^b	0.01	0.32	0.36	0.34	0.03
BHB (mmol/L)	0.27 ^a	0.27 ^a	0.24 ^b	0.01	0.62	0.66	0.56	0.07
Insulin (μ UI/mL)	2.91 ^a	3.19 ^a	4.18 ^b	0.27	2.60	2.55	2.60	0.42
IGF-I (ng/mL)	85.8	97.5	94.8	7.45	117.8	112.9	115.9	12.2
BCS	2.7	2.9	2.7	0.2	3.00	3.02	3.03	0.05

^{ab} Values marked with different letters are significantly different at $P < 0.05$

Metabolic and endocrine profiles

In farm 1, the GH genotype affected or tended ($P = 0.09$) to affect plasma NEFA and IGF-I concentrations, respectively, but did not affect BCS or any other metabolic parameters (Table 1, Figure 2 A-H). Cows carrying LV genotype had greater plasma NEFA and tended to present lower IGF-I concentrations than LL cows (Table 2). Although plasma IGF-I concentrations decreased ($P < 0.01$) after calving in both genotypes, LV cows presented lower IGF-I concentrations at 30 and 60 dpp ($P < 0.02$) than LL cows (Figure 2G). In farm 2, GH genotype did not affect BCS or any of the endocrine/metabolic profiles (Table 1).

The IGF-I genotype affected BHB, NEFA, and insulin concentrations in farm 1 (Table 1) as BB cows presented lower plasma NEFA and BHB and greater insulin concentrations than AA and AB cows (Table 3, Figure 3 A, C, E). While insulin concentrations declined ($P < 0.01$) from -7 to 30 and 60 dpp for AA and AB cows, plasma insulin was maintained during the study in BB cows; being insulin concentrations at 30 dpp greater in BB than AA and AB cows ($P < 0.01$) (Figure 3 E). In farm 2, the interaction between IGF-I genotype and dpp tended ($P = 0.06$) to affect IGF-I concentrations as AA cows tended ($P < 0.07$) to present lower prepartum IGF-I concentrations than AB and BB cows, and although all cows presented a decline ($P < 0.01$) in IGF-I concentrations during the postpartum period, this decline was less pronounced in AA than AB and BB cows (Figure 3 H).

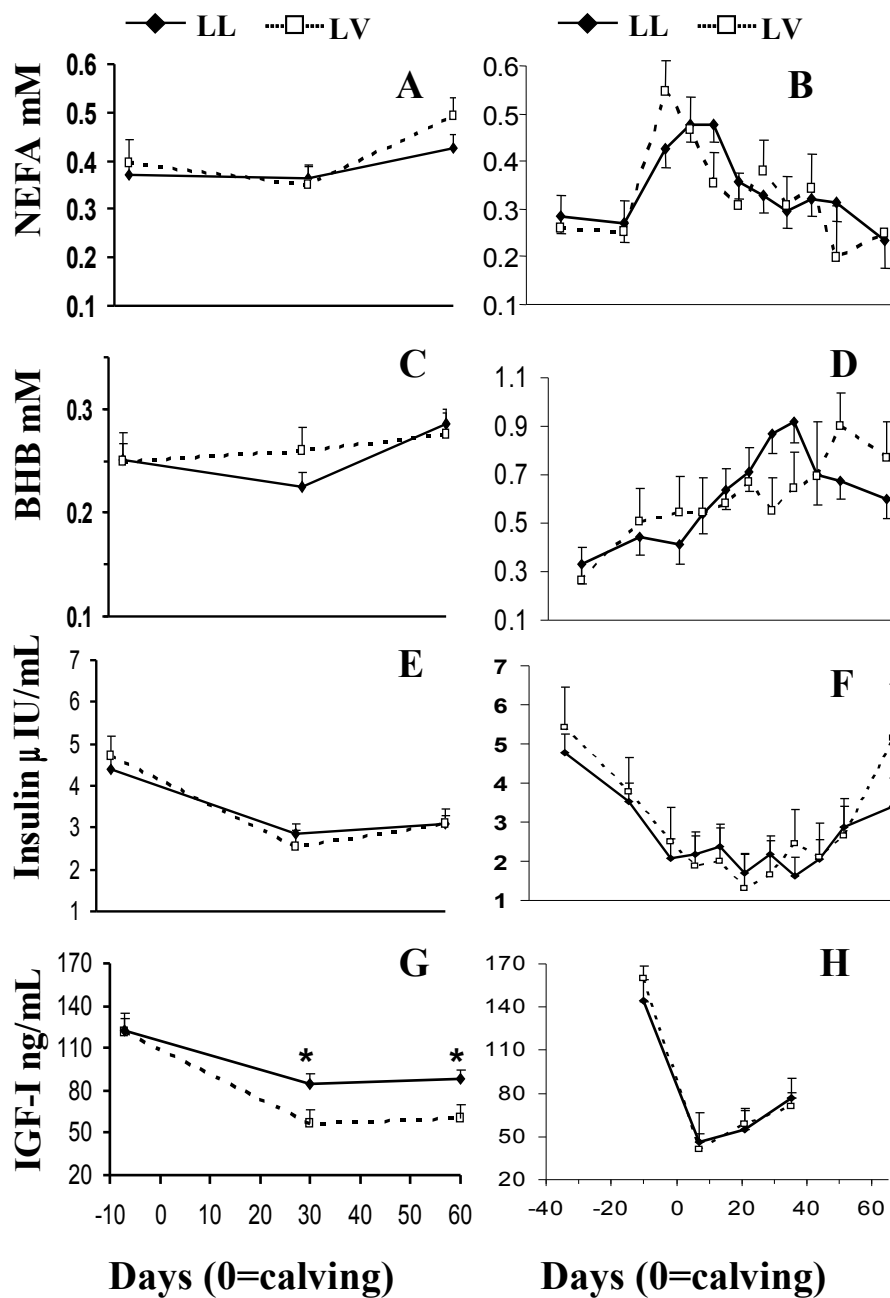


Figure 2. Non-sterified fatty acids (NEFA, A, B), β -hydroxybutyrate (BHB, C, D), insulin (E, F) and insulin like growth factor I (IGF-I, G, H) concentrations for LL and LV genotypes of Holstein cows in Farm 1 (A,C,E,G) and Farm 2 (B,D,F,H). Asterisks denote differences at P < 0.05

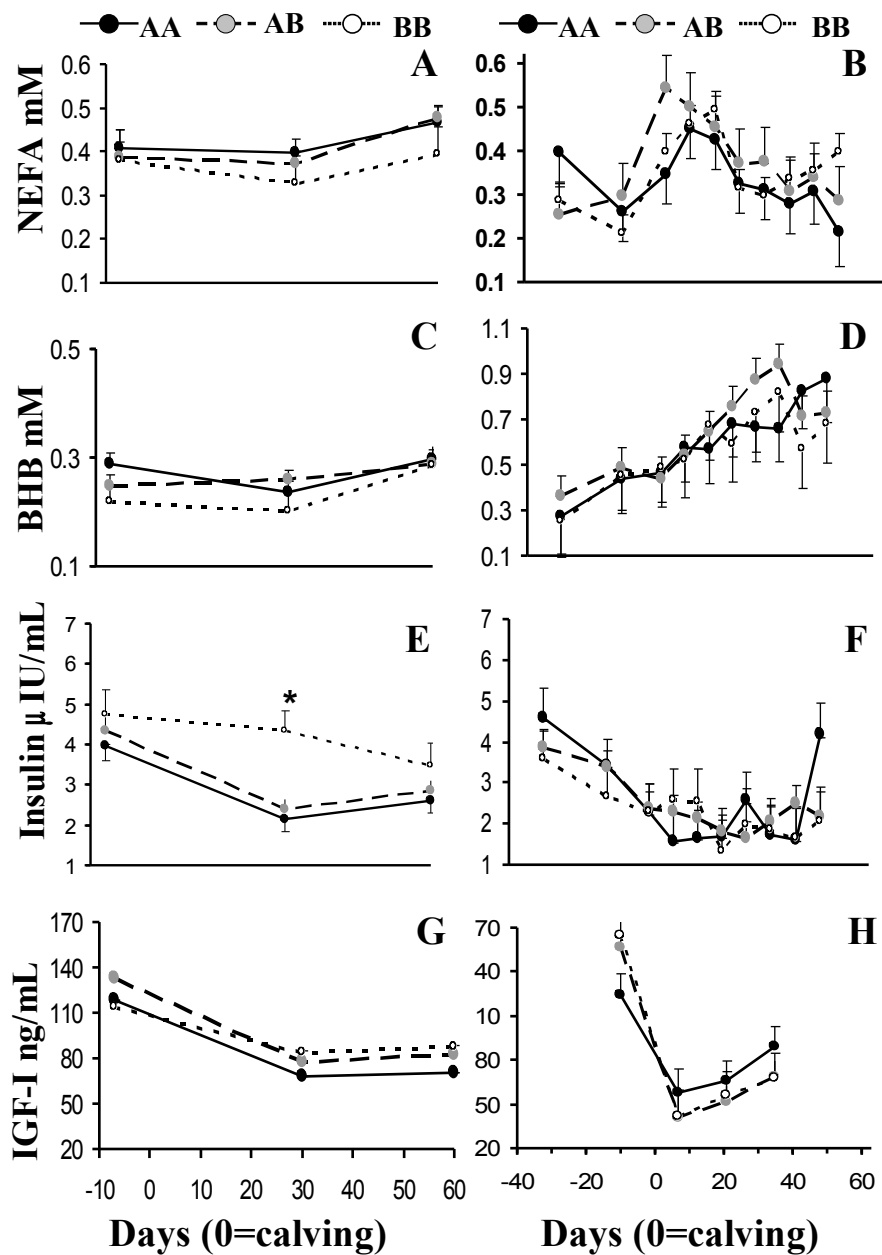


Figure 3. Non-sterified fatty acids (NEFA, A, B), β -hydroxybutirate (BHB, C, D), insulin (E, F) and insulin like growth factor I (IGF-I, G, H) concentrations for AA, AB and BB genotypes of Holstein cows in Farm 1 (A,C,E,G) and Farm 2 (B,D,F,H). Asterisks denote differences at $P < 0.05$.

There was an effect of dpp on NEFA, BHB, insulin and IGF-I concentrations (Table 1). Metabolic and endocrine profiles were better characterized in farm 2; the concentrations of NEFA peaked around calving, and returned to basal levels at 30 dpp (Figure 2 B). The concentrations of BHB increased from -20 to 35 dpp, not returning to basal levels along the study (Figure 2 D). Insulin concentrations decreased from -30 dpp to calving, remained reduced until 50 dpp when insulin concentrations started to increase (Figure 2 F). Plasma IGF-I concentrations showed a sharp decrease at calving and increased thereafter without reaching prepartum levels at 35 dpp (Figure 2 H).

3.5. DISCUSSION

The GH and IGF-I allele frequencies in this study are in agreement with those reported previously in Holstein-Friesian for GH [18,19,27] and in Holstein for IGF-I [29-31].

There was no significant association between GH genotype and productive parameters (milk, 4%FCM and total solid yields) in accordance with Yao et al. [24] in Holstein bulls and Balogh et al. [27] in Holstein-Frisian cows. However, a trend was found for the interaction of GH genotype and dpp on FCM yield in farm 2 (multiparous cows), as LL cows produced more than LV cows during early lactation. Similarly, Shariflou et al. [19] suggested that the L allele appeared to have an additive effect on milk production only at the beginning of the lactation. Besides, Lucy et al. [18] reported that cows carrying LL genotype yielded more milk, fat, and protein than LV cows. No effect of the interaction between GH genotype and dpp was found in primiparous cows (farm 1), and this could be associated with the level of production and/or a differential role of GH genotype in growing animals. In contrast, Dybus et al. [20] determined an effect of GH genotype on milk, fat and protein yield in primiparous but not in

multiparous cows, and they suggested that the observed differences could have resulted from another source of variation (e.g. effects of herd, sires) not considered in the study.

The IGF-I genotype tended to affect FCM yield in farm 2 (multiparous cows), and the interaction between IGF-I genotype and dpp tended to affect FCM yield in farm 1 (primiparous cows), as AB cows yielded more FCM than BB (farm 1) or AA (farm 2) cows. Similarly, Siadkowska et al. [29] reported that AB cows yielded more FCM than AA and BB cows. In contrast, Hines et al. [30] did not find any effect of IGF-I genotype on productive parameters. In our study, cows were under grazing conditions and were average producing cows (17 L/day in farm 1 and 22 L/day in farm 2). Previous studies that could not find any effect of the genotype on milk production stated that genotype differences might not be expressed at this level of production [38, 27]. In addition to this, Chilibroste et al. [39] and Kolver and Muller [40] reported that DM intake is not enough to achieve the genetic potential on grazing milk production systems.

In our study there was no effect of GH genotype on reproductive parameters in none of the farms. Balogh et al. [27] found no effect of the GH genotype on the time of the first postpartum ovulation. Lechniak et al. [25] reported a tendency for greater non-return rates of VV beef bulls at 60 dpp and Lechniak et al. [26] found no effect of the GH genotype on oocyte number. No data as such has been found for the relationship between IGF-I genotype and reproduction in dairy cows. For IGF-I genotype there was a significant effect on calving-first service interval only in farm 1, as BB cows had a longer interval than AB cows.

We found only one report regarding the effects of GH genotype [33] and none of IGF-I genotype on metabolic and/or endocrine profiles in the transition dairy cow. Balogh et al. [33] did not find either an effect of GH genotype on plasma BHB, insulin, and IGF-I concentrations, but they performed only one postpartum determination (4 to 13 dpp). In the present study we have included pre and postpartum

determinations which in our understanding, allowed a better comprehension of the metabolic endocrinology during the peripartum period.

In farm 1 (primiparous cows), NEFA and IGF-I concentrations were affected by GH genotype, as LL cows had lower NEFA and greater IGF-I concentrations than LV cows. Since NEFA and IGF-I are both indicators of the metabolic status [5], these data suggest that LL cows presented a better energy status than LV cows. It is supposed that bovine GH with Leu¹²⁷ stimulate the release of IGF-I more than other variants of bGH [41] which is consistent with the results found in the present study. In contrast, Schlee et al. [32] observed that Simmental LV bulls presented greater IGF-I concentrations. This differential metabolic/endocrine environment was not reflected on productive/reproductive traits, which could be due to the level of production of primiparous cows as discussed before and/or to the extra energy demands for growth in these cows. In farm 2 (multiparous cows) there was no effect of GH genotype on any of the metabolites and hormones studied. Although a reduced number of animals were included in this farm, there are more metabolic/endocrine time measurements which allowed a better metabolic description of the NEB. Indeed, NEFA and β -hydroxybutyrate concentrations increased around calving reflecting fat mobilization as reported before [1-3]. As expected, insulin concentrations decreased around calving as has previously been observed [13]. This decrease in plasma insulin is a metabolic adaptation to cope with the energy demands of lactation as reported earlier [42, 43], since low insulin concentrations favours gluconeogenesis and lipolysis [44] (e.g. homeorhetical effect). The decrease in IGF-I concentrations at calving confirmed the uncoupled somatotropic axis (GH-IGF-I), which mediates nutrient partitioning for lactogenesis [5]. We have no obvious explanation for the differential effect of GH genotype on metabolic/endocrine profiles found in primiparous cows (farm 1) vs. multiparous cows (farm 2), but as previously suggested it could be due to the differential role of GH during growth and development. Indeed, primiparous cows present greater insulin and IGF-I concentrations than multiparous cows [42].

Insulin-like growth factor-I genotype affected NEFA and BHB concentrations in farm 1 (primiparous cows); as BB cows had lower concentrations than AA and AB cows. In accordance to the better energy balance in BB cows reflected by these metabolites, these cows presented greater insulin concentrations at 30 dpp. Unexpectedly, IGF-I concentrations were not affected by IGF-I genotype. Ge et al. [28] and Maj et al. [34] reported lower or greater IGF-I blood concentrations in BB young Angus cattle or BB Holstein –Friesian young bulls and heifers, respectively. Since this polymorphism is located in the promoter region of the IGF-I gene, a variety of responses in gene expression may result depending on the physiological and/or nutritional status of the animal. This differential energy balance is not consistent with the calving first service interval, since it is known that cows in a better energy balance have also better reproductive performance [45], and in this study BB cows presented longer calving-first service interval than AB cows (103 vs 73 days, respectively). Unfortunately, we do not have the endocrine/metabolic profiles at the time of the initiation of the services which could clarify these contradictory results; indeed the endocrine system changes dynamically according to the nutritional and productive status. Moreover, BB cows had not only a reduced reproductive performance but they tended to yield less FCM at 120 and 210 dpp than AB cows. Staples and Thatcher [46] reported that cows with more DM intake, present not only greater milk production, but also better reproductive performance. In farm 2 (multiparous cows), there was no effect of IGF-I genotype on plasma NEFA, BHB, and insulin concentrations. On the other hand, IGF-I profiles suggest a greater uncoupling of the somatotropic axis in AB and BB cows than AA cows which is in accordance with the greater FCM yield of AB than AA cows.

3.6. CONCLUSIONS

In summary, the GH - AluI and IGF-I - SnabI genotypes did not have a relevant effect on productive parameters, although the latter genotype affected calving-first service in primiparous cows. On the other hand, this study demonstrated that these genotypes do alter the endocrine and metabolic profiles of the transition dairy cow under grazing conditions.

3.7. ACKNOWLEDGMENTS

The present study received financial support from the National Institute of Agricultural Research to A.M. (INIA FPTA 214). We would like to thank Dr. G. Uriarte and P. Nicolini for their technical advice.

3.8 REFERENCES

1. Bell AW: **Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation.** J Anim Sci 1995, **73**:2804-2819.
2. Chilliard Y: **Metabolic adaptations and nutrient partitioning in the lactating animal.** In *Biology of Lactation. Collection Mieux Comprendre.* Edited by INRA, Paris (FRA): Martinet J, Houdebine LM, Head, HH ; 1999:503-552.
3. Fenwick MA, Fitzpatrick R, Kenny DA, Diskin MG, Patton J, Murphy JJ, Wathes DC: **Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows.** Domest Anim Endocrinol 2008, **34**: 31-44.
4. Svennersten-Sjaunja K, Olsson K: **Endocrinology of milk production.** Domest Anim Endocrinol 2005, **29**:241-258.

5. Lucy MC, Veerkerk GA, Whyte BE, Macdonald KA, Burton L, Cursons RT, Roche JR, Holmes W: **Somatotropic axis components and nutrient partitioning in genetically diverse dairy cows managed under different feed allowances in pasture system.** J Dairy Sci. 2009; **92**(2):526:39.
6. Block SS, Butler WR, Ehrhardt RA, Bell AW, Van Amburgh ME, Boisclair YR: **Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance.** J Endocrinol 2001, **171**:339-348.
7. Ingvarstsen KL: **Feeding- and management-related diseases in the transition cow. Physiological adaptations around partum and strategies to reduce feeding-related diseases.** Anim Feed Sci and Technology 2006, **126**:175-213.
8. Gong JG, Lee WJ, Garnsworthy PC, Webb R: **Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows.** Reproduction 2002, **123**: 419-427.
9. Huszenicza Gy, Haraszti J, Molnár L, Solti L, Fekete S, Eke's K: **Some metabolic characteristics of dairy cows with different post partum ovarian function.** J Vet Med 1988, **35**:506-15.
10. Butler WR, Smith RD: **Interrelationship between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle.** J Dairy Sci 1989, **72**:767-83.
11. Staples CR, Thatcher WW, Clark JH: **Relationship between ovarian activity and energy balance during the early postpartum period of high producing dairy cows.** J Dairy Sci 1990, **73**:938- 47.
12. Rhodes FM, Clark BA, Nation DP, Taufa VK, MacMillan KL, Day ML: **Factors influencing the prevalence of postpartum anoestrus in New Zealand dairy cows.** Proc N Z Soc Anim Prod 1998, **58**:79-81.
13. Meikle A, Kulcsar M, Chilliard Y, Febel H, Delavaud C, Cavestany D, Chilibroste P: **Effects of Parity and Body Condition Score at Calving on**

Endocrine and Reproductive Parameters of the Dairy Cow under Grazing Conditions. *Reproduction* 2004, **127**: 727-737.

14. Sumantran VN, Tsai ML, Schwartz J: **Growth hormone induces c-fos and c-jun expression in cells with varying requirements for differentiation.** *Endocrinol* 1992, **130**:2016–2024.
15. Lincoln DT, Sinowatz F, el-Hifnawi E, Hughes RL, Waters M: **Evidence of a direct role for growth hormone (GH) in mammary gland proliferation and lactation.** *Anat Histol Embryol* 1995, **24**:107–115.
16. Lucy MC, Hauser SD, Eppard PJ, Krivi GG, Clark JH, Bauman DE, Collier RJ: **Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production.** *Domest Anim Endocrinol* 1993, **10**: 325-333.
17. Furu LM, Katzmer GW, Zinn SA, Rycroft H: **Somatotropin Mspl and Alul polymorphism's relative to indicators of the genetic merit of Holstein AI sires.** *J Anim Sci*, 1998, 76:75.
18. Lucy MC, Hauser SD, Eppard PJ, Krivi GG, Collier RJ: **Genetic polymorphism within the bovine somatotropin (bST) gene detected by polymerase chain reaction and endonuclease digestion.** *J Dairy Sci* 1991, **74** (Suppl 1): 284
19. Shariflou MR, Moran C, Nicholas FW: **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* 2000, **51**: 515-522.
20. Dybus A: **Associations between Leu/Val polymorphism of growth hormone gene and milk production traits in Black-and-White cattle.** *Arch Tierz* 2002, **45**: 421- 428.
21. Grochowska R, Sørensen P, Zwierzchowski L, Snochowski M, Løvendahl P: **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* 2001, **79**: 450-476.

22. Zwierzchowski L, Krzyzewski J, Strzalkowska N, Siadkowska E, Ryniewicz Z: **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 2002, **20**: 213-227.
23. Kovács K, Völgyi-Csík J, Zsolnai A, Györkös I, Fésüs L: **Associations between the AluI polymorphism of growth hormone gene and production and reproduction traits in a Hungarian Holstein–Friesian bull dam population.** Arch Tierz 2006, **49**: 236-249.
24. Yao J, Aggrey SE, Zadworny D, Hayes JF, Kuhnlein U: **Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by singlestrand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk protein traits in Holsteins.** Genetics 1996, **144**(4): 1809-1816.
25. Lechniak D, Machnik G, Szydlowski M, Switonski M: **Growth hormone gene polymorphism and reproductive performance of AI bulls.** Theriogenology 1999, **52**: 1145-1152.
26. Lechniak D, Adamowicz T, Stanislawski D, Kaczmarek D: **In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes in relation to GH gene polymorphism (Leu/Val).** Reprod Nutr Dev 2002, **42**: 275-280.
27. Balogh O, Kova'cs K, Kulcsa'r M, Ga'spa'rdy A, Zsolnai A, Ka'tai L, Pe'csi A, Fe'su's L, Butler WR, Huszenicza Gy: **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 2009, **71**: 553–559.
28. Ge W, Davis ME, Hines HC, Irvin KM, Simmen RCM: **Association of genetic markers with blood serum insulin like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle.** J Anim Sci 2001, **79**: 1757- 1762.

29. Siadkowska E, Zwierzchowski L, Oprzadek J, Strzalkowska N, Bagnicka E, Kryzyzewski J: **Effect of polymorphism in IGF-I gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle.** Anim Sci Pap Rep 2006, 3: 225-236.
30. Hines HC, Ge W, Zhao Q, Davis ME: **Association of genetic markers in growth hormone and insulin-like growth factor I loci with lactation traits in Holsteins.** Anim Genetics 1998, 29(Suppl 1): 69.
31. Li C, Basarab J, Snelling WM, Benkel B, Murdoch B, Hansen C, Moore SS: **Assessment of positional candidate genes myf5 and IGF1 for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of *Bos taurus*.** J Anim Sci 2004, 82: 1-7.
32. Schlee P, Graml R, Schallenberger E, Schams D, Rottmann Q, Olbrich-Bludau A, Pirchner F: **Growth hormone and insulin-like growth factor-I concentrations in bulls of various growth hormone genotypes.** Theor Appl Genet 1994, 88: 497-500.
33. Balogh O, Kovács K, Kulcsár M, Gáspárdy A, Fébel H, Zsolnai A, Fésüs L, Delavaud C, Chilliard Y, Gilbert RO, Huszenicza Gy: **Interrelationship of growth hormone AluI polymorphism and hyperketonemia with plasma hormones and metabolites in the beginning of lactation in dairy cows.** Livestock Science 2009, 123: 180-186.
34. Maj A, Snochowski M, Siadkowska E, Rowinska B, Lisowski P, Robakowska-Hyzorek D, Oprzadek J, Grochowska R, Kochman K, Zwierzchowski L: **Polymorphism in genes of growth hormone receptor (GHR) and insulin-like growth factor-1 (IGF1) and its association with both the IGF1 expression in liver and its level in blood in Polish Holstein-Friesian cattle.** Neuro Endocrinol Lett 2008, 29(6): 981-989.
35. Ruprechter G, Nicolini P, Meikle A, Carriquiry M: **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.** Veterinaria, Montevideo 2009, 45: 173-176.

36. Ferguson JD, Galligan DT, Thomsen N: **Principal descriptors of Body Condition Score in Holstein Cows.** J Dairy Sci 1994, **77**: 2695-2703.
37. Kawasaki ES: **Simple preparation from blood, cells and others fluids.** In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, (ed) PCR Protocols. A guide to Methods and application. New York: Academic Press; 1990: 3-12.
38. Lee BK, Lin GF, Crooker BA, Murtaugh MP, Hansen LB, Chester-Jones H: **Association of somatotropin (bST) gene polymorphism at the 5th exon with selection for milk yield in Holstein cows.** Domes Anim Endocrinol 1996, **13**: 373-381.
39. Chilibroste P, Meikle A, Mattiauda DA, Bentancur O, Soca P: **The American Holstein Dairy Cow During Early Lactation: Grazer or Browser?** In: An overview of research and pastoral-based system in the Southern part of South America. Ed. Machado, C., Wade, M. Carneiro Da Silva, S., Agnusdei, M., De Faccio Carvalho, P., Morris, S. and Beskow, W. First Edition. Tandil: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires 2010, 154-167. ISBN 978-950-658-239-5.
40. Kolver ES & Muller LD: **Performance and Nutrient Intake of High Producing Holstein Cows Consuming Pasture or a Total Mixed Ration.** J Dairy Sci 1998, **81**:1403-1411.
41. Vanderkooi WK, Vandehaar MJ, Sharma BK, Binelli M, Tucker HA, Akers RM, Moseley WM: **Comparison of growth hormone-releasing factor and somatotropin: the somatotropic axis in lactating primiparous cows.** J Dairy Sci 1995, **78**: 2140-2149.
42. Taylor VJ, Cheng Z, Pushpakumara PGA, Beever DE, Whates DC: **Relationships between the plasma concentration of insulin-like growth factor-I in dairy cows and their fertility and milk yield.** The Veterinary Record 2004 **155**: 583-588.
43. Wathes DC, Bourne N, Cheng Z, Mann GE, Taylor VJ, Coffey MP: **Multiple correlation analysis of metabolic and endocrine profiles with fertility in**

- primiparous and multiparous cows.** J Dairy Sci 2007, **90**: 1310-1325.
44. Herdt T: **Ruminant adaptation to negative energy balance: influence on the etiology of ketosis and fatty liver. Metabolic disorders of ruminants.** Veterinary Clinical North American. Food Animal Practice 2000, **16**(2): 215-230.
45. Lucy MC: **Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end?** J Dairy Sci 2001, **84**: 1277-1293.
46. Staples CR, Thatcher WW, Clark JH: **Relationship between ovarian activity and energy status during the early postpartum period of high producing dairy cows.** J Dairy Sci 1990, **73**: 938-947.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

Con respecto al estudio de la diversidad y estructura poblacional se encontró en este estudio que para el gen GH existe una clara predominancia del alelo L en los tres rodeos lecheros estudiados (comerciales 1 y 2 y experimental 4), si bien existen diferencias entre los tambos. Al comparar las frecuencias alélicas encontradas en este estudio con la literatura internacional, vemos que en el tambo experimental 4 se encontró la mayor frecuencia del alelo L = 0,947 aproximándose estos resultados a los obtenidos en rodeos lecheros húngaros (L = 0,89, Balogh *et al.*, 2009a) y norteamericanos (L = 0,92, Lucy *et al.*, 1993). Por otro lado, la frecuencia de este alelo encontrada en los tambos comerciales 1 (L = 0,821) y 2 (L = 0,852) se asemeja más a la encontrada en rodeos de Australia, Japón y Alemania (L = 0,80, Shariflou *et al.*, 2000). En dicho trabajo, Shariflou *et al.* (2000) compararon las frecuencias alélicas de diferentes razas y 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. Como el tambo experimental 4 utiliza semen congelado de origen estadounidense y canadiense, es esperable que la frecuencia de dicho alelo se asemeje a la reportada en dichos rodeos. Además en dicho tambo, el efecto del flujo génico, de la selección indirecta y de la endogamia debido al bajo número de padres utilizados (37 vacas/toro) explicarían el alto grado de homocigosis que presenta el gen GH en este tambo. En el tambo comercial 2 se utiliza semen congelado de origen Neocelandés y en el tambo comercial 1 tanto semen nacional como importado de Canadá y Estados Unidos, razón por la cual la presión de selección indirecta a favor del alelo L podría ser menor. Este hecho argumenta a favor de la menor frecuencia encontrada de dicho alelo

en estas poblaciones en comparación con la encontrada en la población experimental 4. Estos comentarios estarían respaldados por los índices F_{ST} que reflejan una mayor divergencia genética entre la población experimental 4 y las otras poblaciones. Ahora bien, es importante considerar que en ningún caso estos factores afectaron las frecuencias alélicas y genotípicas lo suficiente como para causar desvíos de lo esperado según la hipótesis de equilibrio Hardy-Weinberg.

Para el gen IGF-I, encontramos en el presente trabajo que el alelo A presentó una frecuencia superior al alelo B en los cuatro tambos evaluados (comerciales 1 y 2 y experimentales 3 y 4), existiendo una distribución más similar de las frecuencias de ambos alelos en comparación con lo hallado para los alelos L y V de GH. Al comparar las frecuencias halladas en este trabajo (A: 0,55 a 0,61; B: 0,39 a 0,45) con la literatura internacional se observa concordancia con lo reportado: 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 Holstein estadounidenses (Hines *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2004) y polacos (Siadkowska *et al.*, 2006), respectivamente. Relacionado a esto se observa para el gen IGF-I una predominancia de heterocigotos AB en desmedro de los homocigotos AA y BB, lo cual podría ser indicio de selección estabilizadora a favor del heterocigoto, a diferencia de lo observado en el gen GH donde la predominancia de uno de los homocigotos se relacionaría con selección direccional a nivel de las distintas poblaciones evaluadas. En el tambo experimental 3 se observa un déficit de heterocigotos que podría deberse principalmente a la existencia de endogamia (25 vacas/toro) y al efecto del flujo génico (exclusivo uso de semen Norteamericano).

No hemos encontrado estudios de caracterización de la estructura poblacional de vacas Holando en Uruguay utilizando los marcadores *AluI*-GH y *Snabi*-IGF-I pero sí existen reportes de caracterización génica de la raza Holando Uruguayo utilizando los grupos sanguíneos como marcadores moleculares (Kelly *et al.*, 2002). En nuestro trabajo, la elevada frecuencia del alelo L y del genotipo LL del gen GH indicarían pérdida de diversidad genética para este marcador, concordando con lo reportado por Kelly *et al.* (2002) quienes concluyen que existiría una disminución de la variabilidad

génica en la siguiente generación y una gran similitud entre las poblaciones de Holstein Norteamericano y Holando Uruguayo.

Para la segunda parte de esta tesis que investigó la expresión diferencial de los genotipos de GH e IGF-I sobre los indicadores metabólico-hormonales y variables productivo-reproductivas fueron utilizados unicamente los predios comerciales 1 (vacas primíparas) y 2 (vacas múltiparas), ya que los predios experimentales 3 y 4 podrían haber estado sujetos a situaciones de manejo y alimentación diferenciales que podrían condicionar los resultados.

Los resultados obtenidos para producción y composición de leche indican que no hubo efecto del genotipo GH sobre la media de producción de leche mensual a lo largo de los 270 días de lactancia en ambos tambos. Sin embargo, existen varios reportes internacionales que documentan la asociación positiva entre producción y/o composición de leche y/o mérito genético y el genotipo LL (Furu *et al.*, 1998; Lucy *et al.*, 1993; Shariflou *et al.*, 2000). Nuestros resultados coinciden con los reportados por Yao *et al.* (1996) quienes no encontraron asociación entre producción de leche y el polimorfismo *AluI*. De manera similar, Balogh *et al.* (2009a) en vacas lecheras húngaras y Lee *et al.* (1996) en vacas lecheras Holstein con genética de los años 60 tampoco encontraron asociaciones positivas entre este polimorfismo y variables productivas y sugieren que la expresión de las diferencias genotípicas no es posible ser visualizada a bajos o medios niveles de producción. Con respecto a la curva de lactancia, esta mostró un patrón característico para las vacas primíparas con parición de otoño, con bajos promedios de producción alcanzando los máximos niveles recién a los 120 días postparto (dpp), acompañando dicha curva a la del crecimiento de las pasturas al inicio de la primavera, en acuerdo con lo reportado por Chilibroste *et al.* (2003). Cabe destacar que no se observó el característico pico de producción láctea reportado por varios investigadores al inicio de la lactancia (revisión Chilliard 1999). Además previos autores (Chilibroste *et al.*, 2010; Kolver y Muller; 1998) han reportado que en sistemas de producción de leche

sobre pastoreo, el consumo de materia seca no es suficiente para alcanzar los potenciales niveles de producción previstos para vacas Holando con años de selección genética. Sin embargo se observó una tendencia de la interacción del genotipo GH con los dpp sobre la producción de leche corregida por grasa (LCG) durante la lactancia temprana de las vacas multíparas, siendo las vacas portadoras del genotipo LL las de mayor producción en comparación con el genotipo LV. Similares resultados fueron reportados por Shariflou *et al.*, (2000) quienes sugieren un efecto aditivo para el alelo L sobre producción láctea únicamente al inicio de la lactancia. Sin embargo, esta tendencia no fue visualizada en las vacas primíparas del otro predio comercial, pudiendo estar esto asociado al menor nivel de producción en esta categoría o a un rol diferencial del genotipo GH en animales primíparas aún en crecimiento. En contraposición, Dybus *et al.* (2002) reportan un efecto del genotipo GH sobre producción láctea y producción de grasa y proteína en vacas primíparas y no así en multíparas, argumentando que estas diferencias se podrían deber a otra fuente de variación no tomada en cuenta en el estudio (efectos de predios o padres).

El genotipo IGF-I tendió a afectar la producción de LCG en las vacas multíparas (tambo comercial 2), mientras que la interacción del genotipo con los dpp tendió a afectar la LCG en las vacas primíparas (tambo comercial 1), siendo las vacas AB en todos los casos, las de mayor producción de LCG en comparación a BB (en primíparas) o a AA (en multíparas). Estos resultados coinciden con lo reportado por Siadkowska *et al.* (2006), quienes reportan mayor producción de LCG para el genotipo AB, en comparación con AA y BB. En contraparte, Hines *et al.* (1998) y Mullen *et al.* (2011) no encontraron efecto del genotipo IGF-I sobre parámetros productivos. Es importante considerar que en nuestro estudio las vacas a pastoreo presentaban un nivel medio de producción (17 L/día en primíparas, comercial 1 y 22 L/día en multíparas, comercial 2), y como ya se mencionó previamente, a estos niveles de producción sería difícil visualizar diferencias genotípicas.

Con respecto a las variables reproductivas, no encontramos efecto del genotipo GH sobre ellas en ninguno de los dos tambos, al igual que lo reportado por Balogh *et al.* (2009a) quienes no encontraron efecto del genotipo GH sobre el tiempo a la primera ovulación postparto. Sin embargo Lechniak *et al.* (1999) reportan una tendencia a favor del genotipo VV para mayor tasa de no retorno a los 60 dpp. Solamente un trabajo fue encontrado en relación al genotipo IGF-I y reproducción en vacas lecheras (Mullen *et al.*, 2011), reportando ningún efecto del polimorfismo *SnabI* sobre el intervalo inter parto. En nuestro estudio encontramos un efecto significativo sobre el intervalo parto primer servicio únicamente en vacas primíparas (tambo 1), presentando las vacas portadoras del genotipo BB la peor performance reproductiva con un mayor intervalo que las del genotipo AB.

En referencia a los perfiles endócrinos y metabólicos de las vacas lecheras durante el período de transición, encontramos únicamente un estudio en relación al genotipo GH y ninguno en relación al genotipo IGF-I. Balogh *et al.* (2009b) no encontraron efecto del genotipo GH sobre los niveles sanguíneos de BHB, insulina e IGF-I, pero ellos basaron su estudio en una única muestra (4 a 13 dpp). En el presente estudio hemos incluido muestras pre y postparto, siendo esto una fortaleza para comprender mejor la endocrinología metabólica durante el período de transición.

En primíparas (tambo 1), las concentraciones de AGNE e IGF-I fueron afectadas por el genotipo GH, siendo las vacas portadoras del genotipo LL las que presentaron los menores niveles de AGNE y mayores de IGF-I en comparación con las del genotipo LV. Teniendo en cuenta que ambos (AGNE e IGF-I) son indicadores del balance energético (Lucy *et al.*, 2009) estos resultados revelan un mejor estado energético de las vacas LL. Se ha propuesto que la variante Leu¹²⁷ de la GH bovina estimula la liberación de IGF-I más que otras variantes de GH (Vanderkooi *et al.*, 1995) lo que es consistente con los resultados encontrados en el presente estudio. En contraposición, Schlee *et al.* (1994) reportan mayores niveles de IGF-I en toros Simmental portadores del genotipo LV. No vimos reflejada esta diferencia endocrino-metabólica a nivel de las variables productivas

o reproductivas en las vacas primíparas. Sugerimos que este ambiente endocrino-metabólico diferente acorde al genotipo de las vacas primíparas pueda ser debido a una demanda energética extra para crecimiento de esta categoría y/o al bajo nivel de producción como discutimos anteriormente. No encontramos efecto del genotipo GH sobre los perfiles endocrino-metabólicos de las vacas multíparas (tambo 2) y a pesar del reducido número de animales incluidos en este tambo, la mayor frecuencia de muestreo, permite una mejor descripción metabólica del BEN durante el período de transición. En ese sentido se observó el aumento de las concentraciones de AGNE y BHB alrededor del parto, reflejando la movilización grasa reportada anteriormente (Bell, 1995; Chilliard, 1999; Fenwick *et al.*, 2008) coincidiendo con la esperada disminución de las concentraciones de insulina (Meikle *et al.*, 2004) como adaptación metabólica, favoreciendo la gluconeogénesis y lipólisis (Herd, 2000) para suplir la demanda energética de lactación (Taylor *et al.*, 2004; Wathes *et al.*, 2007). La disminución de las concentraciones de IGF-I observadas al parto en este estudio, sugieren la presencia del desacople del eje somatotrófico (GH-IGF-I) mediando la partición de nutrientes para la lactación (Lucy *et al.*, 2009). Si bien no tenemos una explicación obvia del efecto diferencial del genotipo GH sobre los perfiles endocrino-metabólicos observados en las vacas primíparas (tambo 1), sugerimos un rol diferencial de GH durante el crecimiento y desarrollo, ya que las concentraciones de insulina y de IGF-I son mayores en ésta categoría (Taylor *et al.*, 2004).

El genotipo IGF-I afectó las concentraciones de AGNE y BHB de las vacas primíparas (tambo 1), encontrándose menores concentraciones en las vacas portadoras del genotipo BB en comparación con las del genotipo AA y AB. En acuerdo con el mejor balance energético de los animales BB reflejado en el perfil de sus metabolitos, se observó una mayor concentración de insulina a los 30 dpp. Contrario a lo esperado, no encontramos efecto del genotipo IGF-I sobre las concentraciones de IGF-I plasmáticas, y no tenemos una explicación para ello. Partiendo de que el polimorfismo *SnabI* se encuentra ubicado en la región promotora del gen IGF-I, una gran variedad de

respuestas en la expresión del gen pueden esperarse dependiendo del estatus fisiológico y/o nutricional de los animales. En este sentido fue reportado por Ge *et al.* (2001) en ganado Angus joven del genotipo BB y Maj *et al.* (2008) en terneras y toros jóvenes Holstein-Friesian del genotipo BB, menores o mayores concentraciones de IGF-I, respectivamente. En nuestros resultados, el mejor balance energético de las vacas BB no es consistente con el mayor intervalo parto-primer servicio encontrado en las vacas con el genotipo BB en relación a las del genotipo AB (BB = 103 días, AB = 73 días) ya que ha sido reportado que a mejor balance energético, mejor performance reproductiva (Lucy *et al.*, 2001). Entendemos que la carencia de los perfiles endocrino-metabólicos al inicio de los servicios, momento en que el sistema endocrino cambia drásticamente dependiendo del estatus nutricional y productivo, es una debilidad de nuestra investigación, ya que nos habría permitido clarificar estos resultados contradictorios. Además de que las vacas portadoras del genotipo BB presentan una peor performance reproductiva, tendieron a producir menos LCG que las portadoras del genotipo AB a los 120 y 210 dpp. A pesar de esta aparente contradicción, fue reportado por Staples y Thatcher (1990) que vacas con mayor ingesta de materia seca, presentaban no sólo una mayor producción láctea sino también una mejor performance reproductiva.

En las vacas multíparas (tambo 2), no encontramos efecto del genotipo IGF-I sobre las concentraciones plasmáticas de AGNE, BHB o insulina, sin embargo los perfiles de IGF-I sugieren un mayor desacople del eje somatotrófico en las vacas AB y BB que las AA, estando en concordancia con la mayor producción de LCG de las vacas AB en comparación con AA.

4.2 CONCLUSIONES GLOBALES

De los resultados del primer trabajo se sugiere que la selección a favor de producción de leche estaría conduciendo indirectamente a la fijación del alelo L del gen GH en las poblaciones Holando en el Uruguay, limitando una posible selección asistida por medio de dicho marcador molecular (*AluI*-GH). La tendencia no es tan clara en el caso del marcador *SnabI*-IGF-I, en la cual existiría indicio de selección estabilizadora a favor del heterocigoto AB. Por lo tanto su uso en selección asistida en función de su asociación con parámetros reproductivos sería de interés ya que dichos caracteres son de baja heredabilidad.

De los resultados del segundo trabajo sugerimos que los genotipos *AluI*- GH y *SnabI*-IGF-I no tienen un efecto relevante sobre las variables productivas, aunque a nivel reproductivo el intervalo parto-primer servicio de las vacas primíparas fue afectado por el genotipo *SnabI*-IGF-I. Además este estudio demostró a nivel metabólico y endócrino, que los genotipos *AluI*-GH y *SnabI*-IGF-I modifican los perfiles endocrino-metabólicos de las vacas lecheras a pastoreo durante el período de transición.

5. BIBLIOGRAFÍA

Akers, R.M. 2002. Endocrine, Growth Factor, and Neural Regulation of Mammary Development. In: Lactation and the Mammary Gland. Iowa State 148 chapter 6.

Akers, R.M.; McFadden, T.B.; Purup, S.; Vestergaard, M.; Serjrsen, K.; Capuco, A.V. 2000. Local IGF-I axis in prepuberal ruminant mammary development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5: 43-51.

Anderson, P. T.; Bergen, W. G.; Merkel, R. A.; Enright, W. J.; Zinn, S. A.; Refsal, K. R.; Hawkins, D. R. 1988. The relationship between composition of gain and circulating hormones in growing beef bulls fed three dietary crude protein levels. *J. Anim. Sci.* 66: 3059–3067.

Baird, G.D. 1982. Primary ketosis in the high-producing dairy cow: clinical and subclinical disorders, treatment, prevention, and outlook. *J. Dairy Sci.* 65: 1-10.

Balogh, O.; Kovács, K.; Kulcsár, M.; Gáspárdy, A.; Zsolnai, A.; Kátai, L.; Pécsi, A.; Fésüs, L.; Butler, W.R.; Huszenicza, Gy. 2009a. 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.

Balogh, O.; Kovács, K.; Kulcsár, M.; Gáspárdy, A.; Fébel, H.; Zsolnai, A.; Fésüs, L.; Delavaud, C.; Chilliard, Y.; Gilbert, R.O.; Huszenicza, Gy. 2009b. Interrelationship of growth hormone AluI polymorphism and hyperketonemia with plasma hormones and metabolites in the beginning of lactation in dairy cows. *Livestock Science* 123: 180-186.

Barrett, J.C.; Fry, B.; Maller, J.; Daly, M.J. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. Jan 15 [PubMed ID: 15297300].

- Bauman, D.E.; Eppard, P.J.; DeGeeter, M.J.; Lanza, G.M. 1985. Responses of high-producing dairy cows to long-term treatment with pituitary somatotropin and recombinant somatotropin. *J Dairy Sci.* 68(6): 1352-62
- Bauman, D.E.; Currie, W.B. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J. Dairy Sci.* 63: 1514.
- Beam, S.W.; Butler, W.R. 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three concentrations of dietary fat. *Biol. Reprod.* 56: 133-142.
- Bell AW: 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.* 73: 2804-2819.
- Block, S.S.; Butler, W.R.; Ehrhardt, R.A.; Bell, A.W.; Van Amburgh, M.E.; Boisclair, Y.R. 2001. Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *J. Endocrinol.* 171: 339-348.
- Blum, J.W.; Reding, T.; Jans, F.; Wanner, M.; Zemp, M.; Bachmann, K. 1985. Variations of 3- methylhistidine in blood of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 68: 2580–2587.
- Breier, B.H. 1999. Regulation of protein and energy metabolism by the somatotrophic axis. *Dom. Anim. Endocrinol.* 17: 209–218.
- Butler, W.R.; Smith, R.D. 1989. Interrelationship between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 72:767-83.
- Butler, W.R.; Everett, R.W.; Coppok, C.E. 1981. The relationships between energy balance, milk production and ovulation in postpartum Holstein cows. *J. Anim. Sci.* 53: 742-748.

- Chagas, L.M.; Rhodes, F.M.; Blache, D.; Gore, P.J.S.; Macdonald, K.A.; Verkerk, G.A. 2006. Precalving effects on metabolic responses and postpartum anestrus in grazing primiparous dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89: 1981-1989.
- Chikuni, K.; Nagatsuma, T.; Tabata, T.; Monma, M.; Saito, M.; Ozawa, S.; Ozutsumi, K. 1994. Genetic variants of the growth hormone gene in Japanese cattle. *Anim. Sci. Technol.* 65: 340-346.
- Chilibroste, P.; Meikle, A.; Mattiauda, D.A.; Bentancur, O.; Soca, P. 2010. The American Holstein Dairy Cow During Early Lactation: Grazer or Browser? In: An overview of research and pastoral-based system in the Southern part of South America. Ed. Machado, C., Wade, M. Carneiro Da Silva, S., Agnusdei, M., De Faccio Carvalho, P., Morris, S. and Beskow, W. First Edition. Tandil: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 154-167. ISBN 978-950-658-239-5.
- Chilibroste, P, Ibarra, D y Laborde, D (2004). Producción de leche y Alimentación: resultado del relevamiento de 37 predios comerciales durante el período Abril- Noviembre del 2003. Proyecto: "Interacción alimentación-reproducción" Informe final 2003. CONAPROLE. pp: 4-52
- Chilliard, Y. 1999. Metabolic adaptations and nutrient partitioning in the lactating animal. In: *Biology of Lactation. Collection Mieux Comprendre.* Edited by INRA, Paris (FRA): Martinet J, Houdebine LM, Head, HH :503-552.
- Daughaday, W.H.; Rotwein, P. 1989. Insulin-like growth factors I and II. Peptide messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocrinology Reviews* 10: 68-91.
- Dabezies, M. 2008. Cadenas Agroindustriales PENCTI. Informe final de la consultoría sobre Cadenas Agroindustriales en el marco del Plan Estratégico Nacional en Ciencia, Tecnología e Innovación.

- Davis, M.E.; Simmen, R.C.M. 1997. Genetic parameter estimates for serum insulin-like growth factor concentration and performance traits in Angus beef cattle. *J. Anim. Sci.* 75: 317-324.
- Dekkers, J.C. 2004. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *J. Anim. Sci.* 82 (sup): 313-328.
- Doepel, L.; Lapierre, H.; Kennelly, J.J. 2002. Peripartum performance and metabolism of dairy cows in response to prepartum energy and protein intake. *J. Dairy Sci.* 85: 2315–2334.
- Dybus, A. 2002. Associations between Leu/Val polymorphism of growth hormone gene and milk production traits in Black-and-White cattle. *Arch. Tierz.* 45: 421- 428.
- Eppard, P.J.; Bentle, L.A.; Violland, B.N.; Ganguli, S.; Hintz, R.L.; Kung, I. Jr.; Krivi, G.G.; Lanza, G.M. 1992. Comparison of the galactopoietic response to pituitary-derived and recombinant derived variants of bovine growth hormone. *J. Endocrinol.* 132: 47-56.
- Etherton, T.D.; Bauman, D.E. 1998. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physical Rev.* 78: 745.
- Fenwick, M.A.; Fitzpatrick, R.; Kenny, D.A.; Diskin, M.G.; Patton, J.; Murphy, J.J.; Wathes, D.C. 2008. Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Dom. Anim. Endocrinol.* 34: 31-44.
- Ferguson, J.D.; Galligan, D.T.; Thomsen, N. 1994. Principal descriptors of Body Condition Score in Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 77: 2695-2703.
- Furu, L.M. ; Katzmer, G.W. ; Zinn, S.A. ; 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.

- Ge, W.; Davis, M.E.; Hines, H.C.; Irvin, K.M.; Simmen, R.C.M. 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, M.E.; Hines, [H.C.](#) 1997. Two SSCP alleles detected in the 5'-flanking region of bovine IGF1 gene. *Anim. Genetics* 28:155.
- Glimm, D.R.; Baracos, V.E.; Kennelly, J.J. 1992. Northern and in situ hybridization analyses of the effects of somatotropin on bovine mammary gene expression. *J. Dairy Sci.* 75(10): 2687.
- Gong, J.G.; Lee, W.J.; Garnsworthy, P.C.; Webb, R. 2002. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction* 123: 419-427.
- Graml, R.; Olbrich-Bludau, A.; Schwab, M.; Schallenberger, E.; Schams, D.; Pirchner, F. 1994. Relationship between plasma hormone and metabolite levels and breeding values of bulls. *J. Anim. Breed. Genet.* 112: 313–326.
- 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: 450-476.
- Grummer, R.R.; Mashek, D.G.; Hayirli, A. 2004. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet. Clin. Food Anim.* 20: 447–470.
- Grummer, R.R. 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J. Anim. Sci.* 73: 2820-2833.

- Hauser, S.D.; McGrath, M.F.; Collier, R.J.; Krivi, G.G. 1990. Cloning and in vivo expression of bovine growth hormone receptor mRNA. *Mol Cell Endocrinol.* 72(3): 187-200.
- Hayirli, A.; Grummer, R.R.; Nordheim, E.V.; Crump, P.M. 2002. Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. *J. Dairy Sci.* 85: 3430-3443.
- Herdt T: Ruminant adaptation to negative energy balance: influence on the etiology of ketosis and fatty liver. *Metabolic disorders of ruminants. Veterinary Clinical North American. Food Animal Practice* 2000, 16(2): 215-230.
- Hines, H.C.; Ge, W.; Zhao, Q.; Davis, M.E. 1998. Association of genetic markers in growth hormone and insulin-like growth factor I loci with lactation traits in Holsteins. *Anim. Genetics*, 29(Suppl 1): 69.
- Huszenicza, Gy.; Haraszti, J.; Molnár, L.; Solti, L.; Fekete, S.; Eke's, K. 1988. Some metabolic characteristics of dairy cows with different post partum ovarian function. *J. Vet. Med.* 35: 506-15.
- Ingvarsen, K.L. 2006. Feeding- and management-related diseases in the transition cow. Physiological adaptations around partum and strategies to reduce feeding-related diseases. *Anim. Feed Sci. and Technology* 126: 175-213.
- Ingvarsen, K.L.; Dewhurst, R.J.; Friggens, N.C. 2003. On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livest. Prod. Sci.* 73: 277-308.
- Ingvarsen, K.L.; Andersen, J.B. 2000. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *J. Dairy Sci.* 83: 1573-1597.

- Kawasaki, E.S. 1990. Simple preparation from blood, cells and others fluids. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, (ed) PCR Protocols. A guide to Methods and application. New York: Academic Press: 3-12.
- Kelly, E.L.; 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(147-148): 7-14.
- Kobayashi, Y.; Boyd, C.K.; Bracken, C.J.; Lamberson, W.R.; Keisler, D.H.; Lucy, M.C. 1999. Reduced growth hormone receptor (GHR) messenger ribonucleic acid in liver of periparturient cattle is caused by a specific down-regulation of GHR1A that is associated with decreased insulin-like growth factor I. *Endocrinology*. 140: 3947–54.
- Kolver, E.S.; Muller, L.D. 1998. Performance and Nutrient Intake of High Producing Holstein Cows Consuming Pasture or a Total Mixed Ration. *J. Dairy Sci.* 81: 1403-1411.
- Kornalijnslijper, E.; Beerda, B.; Daemen, I.; van der Werf, J.; van Werven, T.; Niewold, T.; Rutten, V.; Noordhuizen-Stassen, E. 2003. The effect of milk production level on host resistance of dairy cows, as assessed by the severity of experimental *Escherichia coli* mastitis. *Vet. Res.* 34: 721–736.
- Kovács, K.; Völgyi-Csík, J.; Zsolnai, A.; Györkös, I.; Fésüs, L. 2006. Associations between the AluI polymorphism of growth hormone gene and production and reproduction traits in a Hungarian Holstein–Friesian bull dam population. *Arch. Tierz.* 49: 236-249.
- Lechniak, D.; Adamowicz, T.; Stanislawski, D.; Kaczmarek, D. 2002. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes in relation to GH gene polymorphism (Leu/Val). *Reprod. Nutr. Dev.* 42: 275-280.

- Lechniak, D.; Machnik, G.; Szydlowski, M.; Switonski, M. 1999. Growth hormone gene polymorphism and reproductive performance of AI bulls. *Theriogenology* 52: 1145-1152.
- Lee, B.K.; Lin, G.F.; Crooker, B.A.; Murtaugh, M.P.; Hansen, L.B.; 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.
- Leslie, K.E.; Duffield, T.F.; Schukken, Y.H.; LeBlanc, S.J. 2000. The influence of negative energy balance on udder health. *Proc. Natl. Mast. Council. Regional Meeting* 25-33.
- Li, C.; Basarab, J.; Snelling, W.M.; 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.
- Lien, S.; Karlsen, A.; Klemetsdal, G.; Vage, D.I.; Olsaker, I.; Klungland, H.; Aasland, M.; Heringstad, B.; Ruane, J.; Gomez-Raya, L. 2000. A primary screen of the bovine genome for quantitative trait loci affecting twinning rate. *Mammalian Genome* 11: 877-882.
- Lincoln, D.T.; Sinowatz, F.; el-Hifnawi, E.; Hughes, R.L.; Waters, M. 1995. Evidence of a direct role for growth hormone (GH) in mammary gland proliferation and lactation. *Anat. Histol. Embryol.* 24:107-115.
- Lucy, M.C.; Veerkerk, G.A.; Whyte, B.E.; Macdonald, K.A.; Burton, L.; Cursons, R.T.; Roche, J.R.; Holmes, W. 2009. Somatotropic axis components and nutrient partitioning in genetically diverse dairy cows managed under different feed allowances in pasture system. *J. Dairy Sci.* 92(2): 526:39.
- Lucy, M.C. 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J.*

- Dairy Sci. 84: 1277-1293.
- Lucy, M.C.; Hauser, S.D.; Eppard, P.J.; Krivi, G.G.; Clark, J.H.; Bauman, D.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.
- Lucy, M.C.; Hauser, S.D.; Eppard, P.J.; Krivi, G.G.; Collier, R.J. 1991. Genetic polymorphism within the bovine somatotropin (bST) gene detected by polymerase chain reaction and endonuclease digestion. *J. Dairy Sci.* 74 (Suppl 1): 284.
- Lynch, M.; Walsh, B. 1998. *Genetics and Data Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Maj, A.; Snochowski, M.; Siadkowska, E.; Rowinska, B.; Lisowski, P.; Robakowska-Hyzorek, D.; Oprzadek, J.; Grochowska, R.; Kochman, K.; Zwierzchowski, L. 2008. Polymorphism in genes of growth hormone receptor (GHR) and insulin-like growth factor-1 (IGF1) and its association with both the IGF1 expression in liver and its level in blood in Polish Holstein-Friesian cattle. *Neuro Endocrinol. Lett.* 29(6): 981-989.
- Meikle, A.; Kulcsar, M.; Crespi, D.; Chilliard, Y.; La Manna, A.; Balogoh, O.; Keresztes, M.; Delavaud, C.; Huszenicza, G.; Cavestany, D.; Chilibröste, P. 2006. Suplementación energética posparto, perfiles endocrinos y longitud del anestro posparto en vacas lecheras. In: XXXIV Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandu, Uruguay.
- Meikle, A.; Kulcsar, M.; Chilliard, Y.; Febel, H.; Delavaud, C.; Cavestany, D.; Chilibröste, P. 2004. Effects of Parity and Body Condition Score at Calving on Endocrine and Reproductive Parameters of the Dairy Cow under Grazing Conditions. *Reproduction* 127: 727-737.

- Mullen, M.P.; Berry, D.P.; Howard, D.J.; Diskin, M.G.; Lynch, C.O.; Giblin, L. Kenny, D.A.; Magee, D.A.; Meade, K.G.; Waters, S.M. 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.
- Pullen, D.L.; Palmquist, D.L.; Emery, R.S. 1989. Effect on days of lactation and methionine hydroxy analog on incorporation of plasma fatty acids into plasma triglycerides. *J. Dairy Sci.* 72: 49-58.
- Radcliff, R.P.; McCormack, B.L.; Crooker, B.A.; Lucy, M.C. 2003. Growth Hormone (GH) Binding and Expression of GH Receptor 1A mRNA in Hepatic Tissue of Periparturient Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* Vol. 86, No. 12.
- Renaville, R.; Hammadi, M.; Portetelle, D. 2002. Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. *Dom. Anim. Endocrinol.* 23: 351–360.
- Rhodes, F.M.; Clark, B.A.; Nation, D.P.; Taufan, V.K.; MacMillan, K.L.; Day, M.L. 1998. Factors influencing the prevalence of postpartum anoestrus in New Zealand dairy cows. *Proc. NZ Soc. Anim. Prod.* 58:79-81.
- Roche, J.R.; Kolver, E.S.; Kay, J.K. 2005. Influence of precalving feed allowance on periparturient metabolic and hormonal responses and milk production in grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88: 677-689.
- Rothschild, M.F.; Messer, L.A.; Vincent, A. 1997. Molecular approaches to improved pig fertility. *J. Reproduction and Fertility* 52 (Suppl.): 227-236.
- Rousset, F. 2008. Genepop v4: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Res.* 8: 103-106.
- Rupprechter, G.; Carriquiry, M.; Ramos, J.M.; 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: 1-35.
- Ruprechter, G.; Nicolini, P.; Meikle, A.; Carriquiry, M. 2009. 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. *Veterinaria*, Montevideo, 45: 173-176.
- Sabour, M.P.; Lin, C.Y.; Smith, C. 1997. Association of genetic variants of bovine growth hormone with milk production traits in Holstein cattle. *J. Anim. Breed. Genet.* 114: 435-442.
- Schlee, P.; Graml, R.; Schallenberger, E.; Schams, D.; Rottmann, Q.; Olbrich-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.
- Schoenle, E.; Zapf, J.; Humbel, R.E.; Froesch, E.R. 1982. Insuline like growth factor I stimulates growth in hypophysecomized rats. *Nature* 296:252.
- Shariflou, M.R.; Moran, C.; Nicholas, F.W. 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.
- Siadkowska, E.; Zwierzchowski, L.; Oprazadek, 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.
- Sinowatz, F.; Schams, D.; Kölle, S.; Plath, A.; Lincoln, D.; Waters, M.J. 2000. Cellular localisation of GH receptor in the bovine mammary gland during mammogenesis, lactation and involution. *J. Endocrinol.* 166(3): 503-10.

- Sjogren, K.; Liu, J.L.; Blad, K.; Skrtic, S.; Vidal, O.; Wallenius, V.; LeRoith, D.; Tornell, J.; Isaksson, O.G.; Jansson, J.O.; Ohlsson, C. 1999. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 7088–7092.
- Staples, C.R.; Thatcher, W.W.; Clark, J.H. 1990. Relationship between ovarian activity and energy balance during the early postpartum period of high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 73: 938- 47.
- Sumantran, V.N.; Tsai, M.L.; Schwartz, J. 1992. Growth hormone induces c-fos and c-jun expression in cells with varying requirements for differentiation. *Endocrinol.* 130: 2016–2024.
- Svennersten-Sjaunja, K.; Olsson, K. 2005. Endocrinology of milk production. *Dom. Anim. Endocrinol.* 29: 241-258.
- Taylor, V.J.; Cheng, Z.; Pushpakumara, P.G.A.; Beever, D.E.; Whates, D.C. 2004. Relationships between the plasma concentration of insulin-like growth factor-I in dairy cows and their fertility and milk yield. *The Veterinary Record* 155: 583-588.
- Van der Werf, J.H.J.; Verburg, F.J.; Garssen, G.J. 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 EAAP. (Abstract). Lillehammer, Norway* 1. 310.
- Vanderkooi, W.K.; Vandehaar, M.J.; Sharma, B.K.; Binelli, M.; Tucker, H.A.; Akers, R.M.; Moseley, W.M. 1995. Comparison of growth hormone-releasing factor and somatotropin: the somatotropic axis in lactating primiparous cows. *J. Dairy Sci.* 78: 2140-2149.
- Vázquez-Añon, M.; Bertics, S.; Luck, M.; Grummer, R.R.; Pinheiro, J. 1994. Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 77: 1521-1528.

- Wathes, D.C.; Bourne, N.; Cheng, Z.; Mann, G.E.; Taylor, V.J.; Coffey, M.P. 2007. Multiple correlation analysis of metabolic and endocrine profiles with fertility in primiparous and multiparous cows. *J. Dairy Sci.* 90: 1310-1325.
- Weber, W.J.; Wallace, C.R.; Hansen, L.B.; Chester-Jones, H.; Crooker, B.A. 2007. Effects of Genetic Selection for milk yield on somatotropin, Insuline-Like Growth factor I and Placental Lactogen in Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 90: 3314-3325.
- Weir, B.S.; Cockerham, C.C. 1984. Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evol.* 38: 1358-1370.
- Yao, J.; Aggrey, S.E.; Zadworny, D.; Hayes, J.F.; Kuhnlein, U. 1996. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by singlestrand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk protein traits in Holsteins. *Genetics* 144(4): 1809-1816.
- 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.