

# ESTUDIO DEL POLIMORFISMO HINFI DEL GEN PIT-1 Y SU ASOCIACIÓN CON CARACTERÍSTICAS DE TIPO, PRODUCCIÓN DE LECHE Y DÍAS ABIERTOS DE VACAS HOLSTEIN EN EL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

STUDY OF HINFI POLYMORPHISMS OF THE PIT-1 GENE AND THEIR ASSOCIATIONS WITH TYPE TRAITS, MILK YIELD AND DAYS OPEN IN HOLSTEIN COWS FROM ANTIOQUIA, COLOMBIA

Juan D. Corrales-Álvarez<sup>1,2,3</sup>, Mario F. Cerón-Muñoz<sup>1,4</sup>, Jhon J. Cañas-Álvarez<sup>1</sup>, Cristina Acevedo-Valladarez<sup>1</sup>, Jeannie C. Sepúlveda-Restrepo<sup>1</sup>, Samir J. Calvo-Cardona<sup>1</sup>, Manuel Moreno-Ochoa<sup>1</sup>

## Resumen

El objetivo de este estudio fue determinar las frecuencias alélicas y fenotípicas del polimorfismo de nucleótido simple (SNP) del exón VI del gen Pit-1 y su asociación con características de tipo, producción de leche y días abiertos. Se muestrearon un total de 390 vacas Holstein del departamento de Antioquia (Colombia), genotipificadas para el polimorfismo HinfI de Pit-1 por PCR-RFLP. Se encontraron los genotipos AA, AB y BB con frecuencia de 0,03, 0,43 y 0,53, respectivamente. El alelo A tuvo frecuencia de 0,35 y su presencia en el genotipo se asoció con mayor producción de leche, profundidad de la ubre y del cuerpo; la ausencia del alelo A en el genotipo se asoció con menores días abiertos. Este estudio indica que es posible desarrollar programas de selección usando el gen Pit-1 en bovinos Holstein del departamento de Antioquia.

*Palabras clave:* Colombia, marcadores moleculares, mejoramiento animal, Pit-1, vacas Holstein

## Abstract

The aim of this study was to determine allele and phenotypic frequencies for single nucleotide polymorphism (SNP) of exon VI in the Pit-1 gene and their associations with type traits, milk yield, and days open. A total of 390 Holstein cows from Antioquia (Colombia) were genotyped for the Pit-1 HinfI polymorphism by PCR-RFLP. We found AA, AB, and BB genotypes with a frequency of 0.03, 0.43, and 0.53, respectively. The A allele frequency was 0.35 and its presence in the genotype was associated with higher milk production, udder depth and body depth; the absence of the A allele in the genotype was associated with fewer days open. This study indicates that it is possible to develop breeding programs using the Pit-1 gene in Holstein cattle in the department of Antioquia.

*Key words:* animal breeding, Colombia, Holstein cows, molecular marker, Pit-1

## INTRODUCCIÓN

La producción de leche, días abiertos y características de tipo como: estatura, tamaño, profundidad de cuerpo, ancho de pecho, ángulo de la pezuña, ancho de la inserción de la ubre,

profundidad de la ubre, etc., han sido por años variables importantes para el mejoramiento en los hatos lecheros, ya que de ellas depende el rendimiento y la rentabilidad del ganadero. Estudios en genética molecular han identificado marcadores moleculares asociados a estas carac-

Recibido: mayo 2010; aceptado: noviembre 2010.

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Genética, Mejoramiento y Modelación Animal (GaMMA). Facultad de Ciencias Agrarias e Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, A. A. 1226. Medellín (Antioquia), Colombia.

<sup>2</sup> Joven investigador Colciencias, programa jóvenes investigadores e innovadores.

Correos electrónicos: <sup>3</sup> <zocorrales@gmail.com>; <sup>4</sup> <mceronm@hotmail.com>.

terísticas. Estos marcadores pueden ser usados con el fin de detectar y seleccionar reproductores con genotipos adecuados para una expresión fenotípica superior y poder seleccionar individuos a edades más tempranas (Bech y Kristiansen 1990, Renaville et al. 1997, Sorensen et al. 2002, Udina et al. 2001).

El factor de transcripción específico de la pituitaria (**Pit-1**) es conocido por ser un miembro de la familia de los factores de transcripción homeo-dominio, que activa la expresión genética para la tirotrópina, prolactina (**PRL**) y la hormona del crecimiento (**GH**); pero también ejerce un rol importante en la diferenciación y proliferación de las células de la pituitaria (Hoggard et al. 1993, Steinfeld et al. 1991). La inhibición de la síntesis de Pit-1 conduce a un notado decrecimiento en la proliferación de líneas celulares productoras de PRL y GH con una marcada disminución de la expresión de estas hormonas (McCormick et al. 1990). Como la PRL y GH son esenciales para el desarrollo de la glándula mamaria y la producción de leche (Bauman et al. 1985), el gen Pit-1 es un marcador potencial para evaluar la variación genética en características de producción y de tipo.

Algunos estudios han reportado la presencia de 2 alelos A y B para el polimorfismo HinfI del gen Pit-1 y su asociación con características productivas en bovinos lecheros (Renaville et al. 1997, Vargas et al. 2004, Woollard et al. 1994). Pit-1 se encuentra localizado en cromosoma 1 bovino (Woollard et al. 2000), donde se ha reportado que está asociado con producción de leche, características de tipo y parámetros reproductivos (Renaville et al. 1997, Vargas et al. 2004).

El objetivo de este estudio fue determinar las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo de nucleótido simple (**SNP**) Pit-1, y su asociación con producción de leche días abiertos y características de tipo de la raza Holstein en el departamento de Antioquia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Población y sistemas de producción.** Fueron muestreadas 390 vacas Holstein registradas en la Asociación Holstein de Colombia provenientes de hatos ubicados en el departamento de Antioquia los cuales presentaban un sistema de producción en pastoreo principalmente con *Pennisetum clandestinum*.

**Genotipificación.** De cada animal se colectó una muestra de aproximadamente 4 ml de sangre de la vena o arteria coccígea, en tubos con anticoagulante EDTA y almacenada a 4 °C hasta su procesamiento. Posteriormente se extrajo el ADN de acuerdo con el procedimiento descrito por Miller et al. (1988).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 25 µl que contenía 50 ng de ADN, *buffer* de reacción 1X, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,08 mM de cada dNTP; 5 pmol de primer y 1 U Taq DNA polimerasa (MBI Fermentas, Hanover, MD, USA); la PCR fue llevada a cabo usando un Termociclador T-Personal 48 (Biometría, Goettingen, Germany).

Para la amplificación del fragmento de 451 pb correspondientes al gen Pit-1 se utilizaron las secuencias de oligonucleótidos descritos por Woollard et al. (1994): 5'-AAACCATCATCTCCCTTCTT-3' y 5'-AATGTACAATGTGCCTTCTGAG-3' los cuales se ubican entre el intrón V y exón VI.

Las condiciones de PCR consistieron en una desnaturalización inicial de 95 °C por 5 minutos, seguido por 31 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 56 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos y una extensión final por 7 minutos a 72 °C. Los productos de la PCR fueron digeridos con la enzima de restricción HinfI y visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, la verificación de los resultados para este marcador del gen Pit-1 fue realizada por secuenciación

de 10 muestras en los laboratorios de Macrogen E. U. A., Corp.

**Datos productivos.** Los datos de producción de leche, días abiertos y características de tipo al primer parto fueron obtenidos de datos suministrados por la Asociación Holstein de Colombia, se trabajó con los registros de animales que fueron genotipificados; para la realización de la asociación con los datos productivos se contó con 321 registros de producción de leche al primer parto ajustada a los 305 días y edad adulta (Stanton et al. 1991), días abiertos entre el primer parto y el momento de la segunda preñez y evaluación lineal de las características: estatura, tamaño, ancho de pecho, profundidad del cuerpo, colocación de isquiones, ancho del isquion, calidad de hueso, colocación de los miembros, profundidad de la ubre, medio suspensorio, inserción anterior, colocación del pezón, largo del pezón y angularidad. La evaluación lineal fue realizada por la apreciación de clasificadores de la Asociación Holstein de Colombia.

**Análisis estadístico.** Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron clasificadas por conteo directo, y mediante la comparación de las frecuencias observadas y esperadas de los alelos por el método Chi-cuadrado se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg, estas rutinas están implementadas en el *software* GENPOPOP versión 4.0 (Raymond y Rousset 1995).

Se realizó un análisis de varianza para las características producción de leche y días abiertos teniendo en cuenta los efectos fijos de finca, año de parto y el efecto del alelo del gen Pit-1.

$$y_{ijkl} = \mu + \gamma_i + \lambda_j + \pi_k + e_{ijkl}$$

Donde  $y_{ijkl}$  es la producción de leche o días abiertos de la  $l$ -ésima vaca;  $\pi_k$  corresponde a la  $k$ -ésima presencia o ausencia del alelo A de Pit-1 [ $l = 1$  (AA, AB) o  $2$  (BB)],  $\lambda_j$  es el  $j$ -ésimo

Año de parto ( $j = 1999$  a  $2008$ ) y  $\gamma_i$  la  $i$ -ésima finca ( $j = 1$  a  $9$ ).  $\mu$  es la media general y  $e_{ijkl} \sim N(0, \sigma_e^2)$  es el error experimental.

Además, se realizaron análisis de varianza para las características de tipo teniendo en cuenta los efectos fijos de finca, grupo contemporáneo (año-ronda-clasificador) y el efecto del alelo del gen Pit-1 y como covariable la edad a la clasificación.

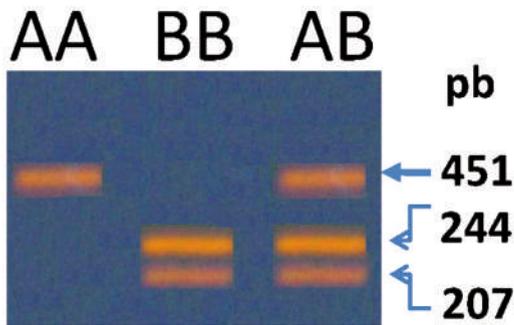
$$y_{ijklm} = \mu + \gamma_i + \vartheta_j + \beta_1(X_k) + \pi_l + e_{ijklm}$$

Donde  $y_{ijklm}$  es cada una de las 24 características de tipo evaluadas de la  $m$ -ésima vaca,  $\pi_l$  corresponde a la  $l$ -ésima presencia o ausencia del alelo A de Pit-1 ( $l = 1$  (AA, AB) o  $2$  (BB)),  $\vartheta_j$  es el  $j$ -ésimo grupo contemporáneo (año-ronda-clasificador) y  $\gamma_i$  la  $i$ -ésima finca ( $j = 1$  a  $9$ ),  $\mu$  es la media general,  $\beta_1$  es el coeficiente de regresión lineal de la edad de la vaca a la clasificación  $X_k$  y  $e_{ijklm} \sim N(0, \sigma_s^2)$  es el error experimental.

Los efectos del alelo A del gen Pit-1 con las características de tipo, producción de leche y días abiertos fueron determinados por el análisis de varianza usando el procedimiento modelo lineal general (GLM) del *software* estadístico SAS (SAS 2006). La comparación de medias fue realizada usando la prueba de Tukey y Kramer tomando como referencia un valor  $P \leq 0,06$ .

## RESULTADOS

El producto de la PCR fue de tamaño de 451 pb el cual fue sometido a digestión con la enzima HinfI revelando 3 genotipos: el genotipo BB con fragmentos de digestión de 244 y 207 pb, para el genotipo AB se encontraron fragmentos con tamaño de 451, 244 y 207 pb y para el genotipo AA un fragmento de 451pb (figura 1). Las frecuencias alélicas encontradas fueron de 0,65 para el alelo B y 0,35 para el alelo A.



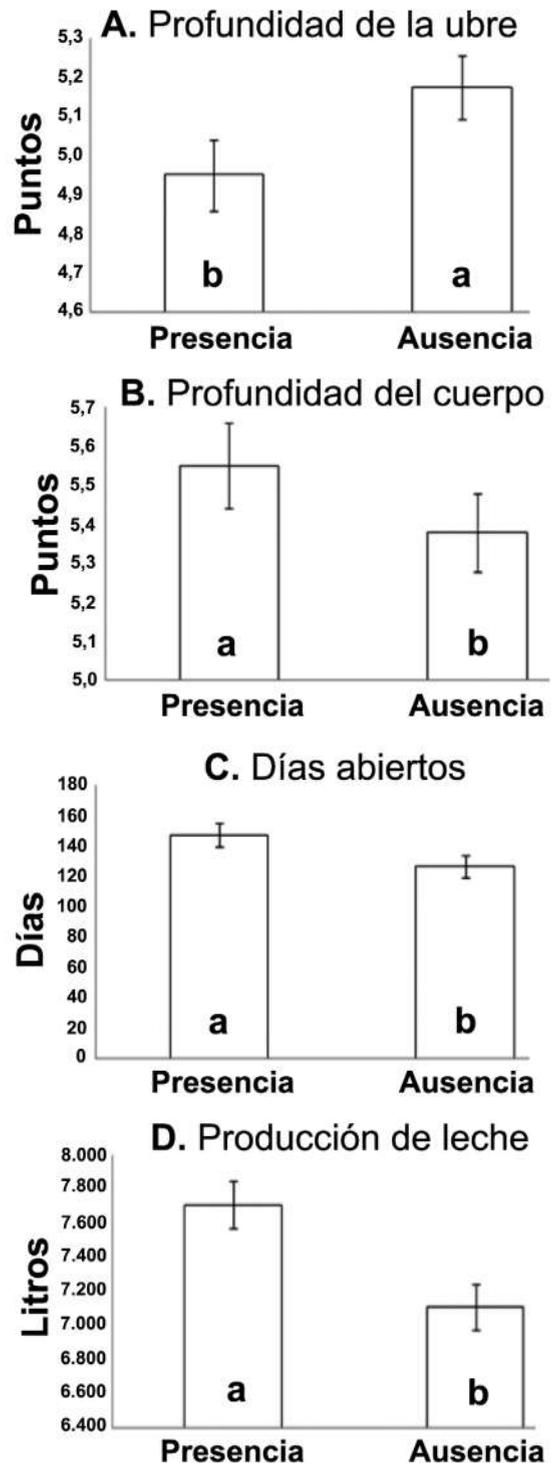
**Figura 1.** Patrón de bandas obtenido por amplificación del fragmento de 451 pb del gen Pit-1, digerido con la enzima HinfI

El genotipo BB presentó mayor frecuencia con el valor de 0,53, seguido del genotipo AB con 0,43, mientras que el genotipo menos frecuente fue el AA con frecuencia observada de 0,03 (tabla 1). Los resultados de la prueba Chi-cuadrado mostraron diferencia significativa entre las frecuencias genotípicas encontradas y las esperadas ( $P < 0,05$ ) lo que indica desequilibrio de Hardy-Weinberg.

**Tabla 1.** Frecuencias génicas y genotípicas para el polimorfismo HinfI del gen Pit-1 en ganado Holstein del departamento de Antioquia, Colombia

Raza	Frecuencias génicas		Frecuencia genotípicas		
	A	B	AA	AB	BB
Holstein	0,24	0,76	0,03 (11/390)	0,43 (168/390)	0,54 (211/390)

El mayor puntaje para profundidad del cuerpo se asoció con el alelo A ( $5,55 \pm 0,11$  puntos), mientras que en la profundidad de la ubre el alelo A se relacionó con menor puntaje ( $4,95 \pm 0,08$  puntos), comparado con la ausencia del alelo A que para profundidad del cuerpo y profundidad de la ubre la media fue de  $5,33 \pm 0,08$  y  $5,17 \pm 0,09$  puntos, respectivamente (figura 2A y B). La presencia del alelo A en el genotipo del gen Pit-1 se asoció con mayores días abiertos con media de  $147 \pm 12,01$  días, mientras que la ausencia del alelo A se relacionó con menor media de  $126 \pm 12,09$  días (figura 2C).



**Figura 2.** A. Medias ajustadas de profundidad de la ubre; B. profundidad del cuerpo; C. días abiertos, y D. producción de leche, de vacas Holstein del departamento de Antioquia, Colombia, con presencia o ausencia del alelo A del SNP del gen Pit-1 (medias con letras **a** y **b** difieren significativamente,  $P \leq 0,05$ )

El análisis de varianza entre la presencia o ausencia del alelo A del gen Pit-1 indicó diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) con producción de leche ajustada a los 305 días y edad madura (PL305EM). Se encontró media de PL305EM en las vacas que presentaban el alelo A de  $7.706 \pm 270$  litros, mientras las vacas que en su genotipo no tenían el alelo A la media fue de  $7.107 \pm 250$  litros (figura 2D).

## DISCUSIÓN

El alelo B del polimorfismo HinfI del exón VI del gen Pit-1 presentó mayor frecuencia que el alelo A, resultados similares a los reportados en estudios realizados en ganado Holstein de Chile e Italia (Renaville et al. 1997; Vargas et al. 2004). Comparando las frecuencias esperadas de las observadas, el genotipo AA y BB presentan menor frecuencia observada con respecto a lo esperado y el genotipo AB presenta mayor frecuencia observada que la esperada, resultados similares a los reportados en otros estudios en la raza Holstein (Dybus et al. 2004, Edriss et al. 2008, Hori y Barreras 2003).

El alelo A se asoció con mayor producción de leche y mayores días abiertos, resultados que concuerdan con los presentados por Vargas et al. (2004), quienes encontraron una asociación del alelo A con mayor producción de leche y menor capacidad reproductiva. Renaville et al. (1997) y Zwierzchowski et al. (2002) reportaron la asociación del alelo A con alta producción de leche. De Mattos et al. (2004) hallaron que los individuos heterocigóticos AB con presencia del alelo A fueron superiores en relación con el genotipo BB para producción de grasa en leche.

Lo anterior puede ser explicado por la responsabilidad del factor de transcripción Pit-1 en la expresión de los genes de la prolactina (PRL) y hormona de crecimiento (GH) en la glándula pituitaria anterior, porque la PRL y GH son esenciales para el desarrollo de la glándula mamaria

y la producción de leche, el gen Pit-1 tiene un potencial para explicar la variación genética en características como producción de leche (Zwierzchowski et al. 2002).

La asociación del alelo A con mayores días abiertos puede estar relacionado con el aumento de la producción lechera, la cual se presenta de manera antagónica con la fertilidad de las vacas, debido a las altas exigencias nutricionales y de manejo de las vacas de alta producción. Lucy et al. (1998) reportaron que la alta producción de leche afecta negativamente la concentración de progesterona en sangre causando infertilidad en las vacas lecheras.

Veerkamp y Brotherstone (1997) encontraron que vacas con mayor profundidad del cuerpo tenían mayor consumo de materia seca, lo que podría explicar la relación con la mayor profundidad de cuerpo y producción de leche. Jolanta et al. (2003) encontraron que los individuos AB para Pit-1 tenían mayor consumo de materia seca, comparado con los individuos BB.

La presencia del alelo A se relacionó con menor puntaje para profundidad de la ubre lo que indica que vacas que presentan este alelo en el genotipo tienden a tener una ubre más profunda con capacidad de almacenar y producir mayores cantidades de leche (Berry et al. 2004).

## CONCLUSIÓN

En la población Holstein de Antioquia se encontraron los alelos del polimorfismo del gen Pit-1 con frecuencia de 0,35 y 0,65, para los alelos A y B, respectivamente. El alelo A se asoció con mayor profundidad de la ubre, del cuerpo y producción de leche, efecto que presentaría una presión de selección desfavorable para los días abiertos.

Los polimorfismos del gen Pit-1 encontrados en la raza Holstein del departamento de Antioquia

(Colombia) pueden ser importantes como un complemento para la selección de individuos con alto valor genético y como alternativa de asociación a características cuantitativas de importancia zootécnica y su influencia en la producción, calidad y eficiencia reproductiva de animales productores de leche.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias al apoyo del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Fondo Nacional del Ganado; Universidad de Antioquia, Corporación Antioquia Holstein y Asociación Holstein de Colombia.

## REFERENCIAS

- Bauman DE, Eppard PJ, DeGeeter MJ, Lanza OM. 1985. Responses of high producing dairy cows to long-term treatment with pituitary somatotropin and recombinant somatotropin. *Journal of Dairy Science*, 68: 1352-1362.
- Bech AM, Kristiansen RK. 1990. Milk protein polymorphism in Danish dairy cattle and the influence of genetic variants on milk yield. *Journal Dairy Research*, 57: 53-62.
- Berry DP, Buckley F, Dillon P, Evans RD and Veerkamp RF. 2004. Genetic relationships among linear type traits, milk yield, body weight, fertility and somatic cell count in primiparous dairy cows. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 43: 161-176.
- De Mattos KK, Del Lama SN, Martínez ML, Freitas AF. 2004. Association of bGH and Pit-1 gene variants with milk production traits in dairy gyr bulls. *Brazilian Journal of Agricultural Research*, 39: 147-150.
- Dybus A, Szatkowska I, Czerniawska-Platkowska E, Grzesiak W, Wojcik J, Rzewucka E and Zych S. 2004. *Pit-1* HinfI gene polymorphism and its associations with milk production traits in polish Black and White cattle. *Archives Animal Breeding*, 47: 557-563.
- Edriss V, Edriss MA, Rahmani HR and Sayed-Tabatabaei BE. 2008. Pit-1 gene polymorphism of Holstein cows in Isfahan Province. *Biotechnology*, 7 (2): 209-212.
- Hoggard N, Callaghan K, Levy A, Davis JRE. 1993. Expression of Pit-1 and related proteins in diverse human pituitary adenomas. *Journal of Molecular Endocrinology*, 11: 283-290.
- Hori S, Barreras A. 2003. Relationships between DGAT1 and Pit-1 genes polymorphism and milk yield in Holstein cattle. *Journal of Animal Science*, 81 (Suppl. 1): 252
- Jolanta O, Flisikowski K, Zwierzchowski L, Dymnicki E. 2003. Polymorphisms at loci of leptin of leptin (Lep), Pit-1 and STA-TSA and their association with growth, feed conversion and carcass quality in Black and White bulls. *Animal Science Papers and Reports*, 21: 135-145.
- Lucy MC, Weber WJ, Baumgard LH, Seguin BS, Koenigsfeld AT, Hansen LB, Chester-Jones H, Crooker BA. 1998. Reproductive endocrinology of lactating dairy cows selected for increased milk production. *Journal of Animal Science*, 76 (Suppl. 1): 296.
- McCormick A, Brady H, Theill LE, Kaim M. 1990. Regulation of the pituitary specific homeobox gene GHF1 by cellautonomous and environmental cues. *Nature*, 345: 829-832.
- Miller SA, Dykes DD, Poletsky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16 (3): 1215.
- Raymond M, Rousset F. 1995. GENESPOP (Versión 3.3) population genetics software for exact test and ecumenism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249.
- Renaville R, Gengler N, Vrech E, Prandi S, Massart S, Corradini C, Bertozzi C, Mortiaux F, Burny A, Portelle D. 1997. Pit-1 gene polymorphism, milk yield and conformation traits for Italian Holstein Friesian bulls. *Journal of Dairy Science*, 80: 3431-3438.
- SAS (Statistical Analysis Systems). 2006. Statistical Analysis Systems. SAS® (versión 9.1) para Windows. User's Guide. Cary (North Carolina): Statistical Analysis Systems Institute. Inc. p. 846.
- Sorensen P, Grochowska R, Holm L, Henryon M, Lovendahl P. 2002. Polymorphism in the bovine growth hormone gene affects endocrine release in dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 85: 1887-1893.
- Stanton TL, Blake RW, Quaas RL, Van Vleck LD. 1991. Response to selection of United States Holstein sires in Latin America. *Journal of Dairy Science*, 74: 651-664.
- Steinfelder HJ, Hauser P, Nakayama Y, Radovick S, McClaskey JH, Taylor T, Weintraub BD, Wondisford FE. 1991. Thyrotropin-releasing hormone regulation of human TSHb expression: Role of a pituitary-specific transcription factor (Pit-1/GHF-1) and potential interaction with a thyroid hormone-inhibitory element. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88: 3130-3134.
- Udina IG, Turkova SO, Kostyuchenko MV, Lebedeva LA, Sulimova GE. 2001. Polymorphism of bovine prolactin gene: microsatellites, PCR-RFLP. *Russian Journal of Genetics*, 37: 407-411.
- Vargas LD, Gana V, Escudero I. 2004. Polimorfismo del gen Pit-1 en vacas lecheras de Chile central. *Archivos de Zootecnia*, 53: 217-220.
- Veerkamp RF, Brotherstone S. 1997. Genetic correlations between linear type traits, food intake, live weight and condition score in Holstein Friesian dairy cattle. *Animal Science*, 64: 385-392.
- Woollard J, Schmith CB, Freeman AE, Tuggle CK. 1994. Rapid communication: HinfI polymorphism at the bovine Pit-1 locus. *Journal of Animal Science*, 72: 3267.

- Woollard J, Tuggle CK, Ponce de Leon FA. 2000. Rapid communication: localization of POU1F1 to bovine, ovine, and caprine 1q21-22. *Journal of Animal Science*, 78: 242-243.
- Zwierzchowski L, Krzyzewski J, Strzalkowska N, Siadkowska E, Ryniewicz A. 2002. Effect of polymorphisms 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. *Animal Science Papers and Reports*, 20: 213-227.