

ARTÍCULO ORIGINAL

## Polimorfismo genético en los receptores de la hormona del crecimiento y prolactina en el Siboney de Cuba. Desarrollo de metodologías

A. Acosta<sup>I</sup>, R. Ronda<sup>I</sup>, F. López<sup>II</sup>, Z. Fernandes<sup>III</sup>, M.A. Gomes-Filho<sup>III</sup>, O. Uffo<sup>I\*</sup>, S.B.P. Barbosa<sup>II</sup>

<sup>I</sup>Laboratorio de Genética Molecular (GenMol), Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) PO Box 10, San José de las Lajas, CP 32700, Mayabeque, Cuba. **Correspondencia del autor:** Odalys Uffo Reinosa (Fax: + 5347-868104, Tel: + 5347-863145, Correo electrónico: [uffo@censa.edu.cu](mailto:uffo@censa.edu.cu)); <sup>II</sup>Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste (PROGENE), Departamento de Zootecnia, UFRPE, Pernambuco, Brasil; <sup>III</sup>Laboratório Fisiologia Animal Molecular Aplicada (FAMA), Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE, Pernambuco, Brasil.

**RESUMEN:** Se han realizado estudios previos para la determinación del genotipo del SNP en el exón ocho del gen receptor de la hormona del crecimiento (GHR), causante de la sustitución aminoacídica F279Y y el SNP en el exón tres del gen receptor de la prolactina (PRLR) que provoca la sustitución aminoacídica S18N. Se describe que ambos polimorfismos están fuertemente asociados al rendimiento y componentes lácteos. Nuestro objetivo fue describir dos nuevas metodologías para identificar dichos polimorfismos y determinar las frecuencias génicas para ambos *loci* en la raza Siboney de Cuba (N=130). Las metodologías propuestas fueron la amplificación creando el sitio de restricción (ACRS) en el *locus* GHR y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) combinada con polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) en el *locus* PRLR. Se identificaron los tres genotipos en ambos *loci*, con frecuencias en el *locus* GHR de 0.517, 0.428 y 0.025 para los genotipos FF, FY y YY respectivamente, mientras que la frecuencia de los genotipos SS, SN y NN fueron de 0.686, 0.24 y 0.074 en el *locus* PRLR. Ambos *loci* se encuentran desviados de la condición de equilibrio Hardy-Weinberg ( $p < 0.05$ ).

**Palabras clave:** bovino, gen GHR, gen PRLR, frecuencia alélica.

---

### Genetic polymorphism in growth hormone receptors and prolactin in Siboney de Cuba. Development of methodologies

**ABSTRACT:** There are several previous studies on the typing of SNP in exon eight of the growth hormone receptor gene (GHR) causing F279Y amino acid substitution, and SNP in exon three of the prolactin receptor gene (PRLR) causing S18N amino acid substitution. Both polymorphisms have been strongly associated with milk yield and milk components. The aim of the present study was to describe two new methods to identify these polymorphisms and determine gene frequencies for both *loci* in the breed Siboney de Cuba (N = 130). The genetic polymorphism of the GHR *locus* was detected by amplification creating restriction sites (ACRS), and the genetic polymorphism of the PRLR *locus* was detected by polymerase chain reaction (PCR) combined with restriction fragment length polymorphism (RFLP). Three genotypes were identified in both *loci*, with frequencies in the GHR *locus* of 0.517, 0.428 and 0.025 for genotypes FF, FY and YY respectively; and the frequency of genotypes SS, NS and NN were 0.686, 0.24 and 0.074 in the PRLR *locus*. Both *loci* do not fit Hardy-Weinberg equilibrium in this population ( $p < 0.05$ ).

**Key words:** cattle, GHR gene, PRLR gene, allele frequency.

---

## INTRODUCCIÓN

Por las diversas funciones que tienen en el organismo, los genes que codifican para la hormona del crecimiento (GH) y la prolactina (PRL) han sido incluidos en numerosos estudios. De la GH se conoce su especial participación en crecimiento pos-natal y producción de leche en mamíferos (1,2). La PRL es un regulador esencial del desarrollo de la glándula mamaria, que actúa en sinergismo con otras hormonas durante la pubertad y la preñez (3,4,5,6). La actividad de estas hormonas es mediada por receptores ubicados en la membrana celular para la GH; es el receptor de la hormona de crecimiento (GHR) quien regula su función (7,8) y la actividad de la PRL está regulada por el receptor de la prolactina (PRLR), que participa en numerosas actividades endocrinas (9,10,11) y es un miembro de la familia de las citoquinas receptoras de superficie de membrana celular (12,13).

En el bovino, el GHR está codificado por un único gen que se localiza en el cromosoma 20 (14). Dicho gen está constituido por nueve exones (enumerados del 2-10), siendo la parte que se traduce en proteína y una extensa región no codificante en la región 5', la que origina diferentes variantes de mRNA (15). El gen que codifica para PRLR también se ubica en el cromosoma 20 en el bovino, a una distancia aproximada de 7Mb del GHR (16) y se describe con un total de 10 exones, de los cuales del 3 al 10 son los exones codificantes (17).

En el gen que codifica para GHR se ha prestado especial atención al polimorfismo F276Y por encontrarse evidencias de alto grado de influencia en el porcentaje de proteína y grasa (8) y en el rendimiento en la producción de leche (18,19,20). Por otra parte, el polimorfismo S18N del gen que codifica para PRLR se asocia al rendimiento de la producción láctea y sus componentes (8,21,22).

Para la identificación de estos polimorfismos genéticos se utilizaron metodologías como el alelo discriminante y la extensión de oligonucleótidos en el estudio realizado por Viitala *et al.* (8) y la secuenciación en los estudios de Blott *et al.* (18) y Waters *et al.* (19). El uso de estas metodologías precisa de un equipamiento costoso que encarece la técnica y disminuye las posibilidades de procesamiento de un elevado número de muestras. Por ello se han realizado investigaciones donde se hace uso de la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR) combinada con polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphism, RFLP) en estudios de polimorfismos del *locus* GHR (23,24).

En tal sentido, se propone el empleo de la metodología amplificación creando el sitio de restricción (amplification created restriction sites ACRS) para identificar el polimorfismo F276Y en el *locus* GHR y las metodologías PCR-RFLP en la identificación de las variantes polimórficas S18N del *locus* PRLR. Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue describir dos nuevas metodologías para identificar los polimorfismos F276Y del *locus* GHR y S18N del *locus* PRLR, así como determinar las frecuencias génicas para ambos *loci* en la raza Siboney de Cuba. Dichas metodologías podrán ser utilizadas en las evaluaciones genéticas del ganado bovino en general, tomando las regiones estudiadas aquí como genes candidatos a ser incluidos en los programas de selección genética, con particular importancia en la implementación de la selección asistida por marcadores dirigida a la mejora de la calidad de la leche.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material genético

Se incluyeron en el estudio un total de 130 vacas de la raza Siboney de Cuba, a las que se les extrajo sangre periférica, con pleno cumplimiento de las normas del comité de ética y bienestar animal. Se emplearon 0.5mL de EDTA 0.5M como anticoagulante y se procedió a la extracción y purificación del ADN mediante el método de precipitación salina descrito por Miller *et al.* (25). Se determinaron las concentraciones de ADN por espectrofotometría, con lecturas de absorbancia a 260nm y se procedió a realizar las correspondientes diluciones para trabajar con muestras con una concentración de 20pmol/μL.

### Genotipado de los receptores de GH y PRL

Para el estudio de los polimorfismos que se muestran en la Tabla 1, se desarrolló la metodología de amplificación con creación de sitio de restricción en el *locus* GHR, donde se colocó el nucleótido A en la posición 23 del GHR\_1 en el extremo 3' y la metodología de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción para el caso PRLR.

Los oligonucleótidos empleados en la reacción en cadena de la polimerasa se diseñaron con el empleo del programa Vector NTI Advance™ 11.0 (Invitrogen Corporation 2008) (Tabla 2). El volumen final de la reacción fue de 25μL constituida por buffer de reacción 10X (conteniendo 10mM TrisHCl, pH 9.0; 50mM KCl y 0.1% Triton X-100), 50mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25mM dNTPs, 20nmol/μL de oligonucleótido correspondiente y 5U de ADN polimerasa comercial (Fermentas), con 50ng/μL de ADN molde completando el volumen final con agua. El programa de amplificación empleado para ambos

**TABLA 1.** Ubicación de los polimorfismos estudiados./ *Location of the studied polymorphisms*

<i>Locus</i>	Nombre del Gen	Ubicación en Genbank	Sustitución	Polimorfismo	Exón
GHR	Growth Hormone Receptor	AM161140	4962 (T/A)	F279Y	8
PRLR	Prolactin Receptor	AJ966356	1267-68 (GT/AC)	S18N	3

**TABLA 2.** Oligonucleótidos empleados en la amplificación de los fragmentos GHR y PRLR./ *Used oligonucleotides in the amplification of GHR and PRLR fragments*

<i>Locus</i>	Nombre	Oligonucleótidos	Fragmento Amplificado	Ta (°C) <sup>1</sup>
		(5'-3')		
GHR	GHR_1	ATACTTGGGCTAGCAGTGACATAAT	242pb	51
	GHR_2	GATAAAACTGAGACCTGTGTTGTCT		
PRLR	PRLR_1	CCTGTGGAAAGAGGAAGGAG	171pb	55
	PRLR_2	GACTGTGATGGATTCTCCCC		

<sup>1</sup> Temperatura de alineamiento.

*locus* fue similar, solo varió la temperatura de alineamiento. El mismo constó de un ciclo de 94°C por 5min en la etapa de desnaturalización, seguido por 32 ciclos de 94°C por 1min, 1min de alineamiento y 72°C por 1min, el tiempo final de extensión fue de 5min a 72°C. Se utilizó un termociclador Mastercycler Eppendorf® de 96 pocillos.

Después de proceder a chequear la amplificación por electroforesis en gel de agarosa 2%, utilizando Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnología) como agente intercalante, se tomaron 10µL del producto amplificado y se procedió a la digestión con las enzimas específicas de la casa comercial Promega, para cada uno de los fragmentos las cuales se muestran en la Tabla 3. La temperatura de incubación fue de 37°C durante 3 horas. Para la comprobación de la digestión se se realizó en gel electroforesis de agarosa al 2%, TBE 0.5X, con tinción de Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnología), empleando 0.3µL por cada 5µL de producto digerido, comparado con un marcador de peso molecular de 100pb (Promega) y observado bajo luz UV en transiluminador (CONSORT).

#### Procesamiento estadístico

El programa GENEPOP versión 3.4 (26,27) fue empleado para realizar el cálculo de las frecuencias alélicas, genotípicas y la prueba exacta de la desviación de los *locus* del estado de equilibrio Hardy-Weinberg. El cálculo de la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) por *locus* se realizó usando el programa ARLEQUIN (28).

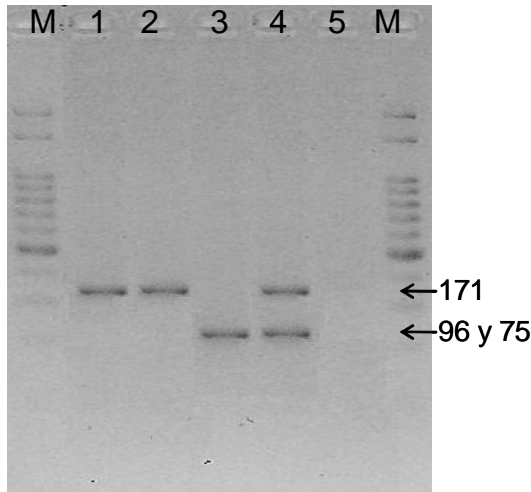
**TABLA 3.** Enzimas de restricción empleadas en el genotipado de los fragmentos amplificados./ *Used restriction enzymes to genotype the amplified fragment*

<i>Locus</i>	Enzima	Buffer Específico	Sitio de corte
GHR	<i>SspI</i>	NEBuler 2	5'..AAT*ATT..3'
			3'..TTA*TAA..5'
PRLR	<i>DdeI</i>	NEBuler 3	5'..C*TNAG..3'
			3'..GANT*C..5'

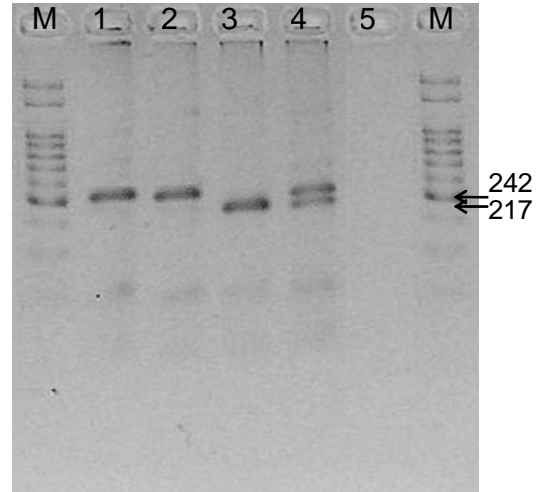
## RESULTADO Y DISCUSIÓN

A partir del empleo de los oligonucleótidos diseñados se obtuvo un fragmento amplificado de 242pb para el *locus* GHR, permitiéndose la creación de un sitio de restricción reconocido por la enzima *SspI* que permitió identificar las dos variantes alélicas relacionadas con el polimorfismo proteico F279Y (Figura 1). En el *locus* PRLR, el fragmento amplificado fue de 171pb, donde se incluyó el sitio de restricción reconocido por la enzima *DdeI* lo que permitió identificar las variantes alélicas relacionadas con el polimorfismo proteico S18N en dicho *locus* (Figura 2).

El alelo F del *locus* GHR tuvo una mayor frecuencia, con valores de 0.746 (Tabla 4). El comportamiento de la frecuencia de este alelo es similar en otras razas estudiadas. Por ejemplo en siete razas estudiadas por Fontanesi *et al.* (23) (Holstein Friesian Italiano, Brown



**FIGURA 1.** Amplificación y digestión del GHR, Línea M: MPM 100pb, Línea 1: producto amplificado, Línea 2: genotipos FF, Línea 3: genotipos YY, Línea 4: genotipos FY, Línea 5: control negativo./ *GHR amplification and digestion. Line M: MWM 100bp, Line 1 amplified product, Line 2: FF genotype, Line 3: YY genotype, Line 4: FY genotype, Line 5: negative control.*



**FIGURA 2.** Amplificación y digestión del PRLR, Línea M: MPM 100pb, Línea 1: producto amplificado, Línea 2: genotipos NN, Línea 3: genotipos SS, Línea 4: genotipos NS, Línea 5: control negativo./ *PRLR amplification and digestion, Line M: MWM 100bp, Line 1 amplified product, Line 2: NN genotype, Line 3: SS genotype, Line 4: NS genotype, Line 5: negative control*

Italiano, Simmental Italiano, Jersey, Rendena, Reggiana y Modenese) se aprecian valores de frecuencias del alelos F que van desde 0.772 a 0.947. Igualmente en los seis grupos de datos estudiados por Blott *et al.* (18) se aprecia el alelo F con una mayor frecuencia, con valores que van desde 0.825 a 0.94. En cambio, los estudios realizados en Holstein Chino mostraron frecuencias del alelo F inferiores al alelo Y con valores de 0.366 y 0.634, respectivamente (24).

En el *locus* PRLR el alelo S (Tabla 4) fue el de mayor frecuencia. Los estudios realizados por Lü *et al.* (29) informan frecuencias del alelo S que van desde 0.596 a 0.802 en las cinco razas nativas Chinas, por lo que la frecuencia encontrada en el Siboney de Cuba

se encuentra próxima a estas razas. En el Holstein Chino también se describe el alelo S con una mayor frecuencia, pero su valor está más cercano a la frecuencia del alelo N por el gran número de animales homocigotos para el mismo (22).

Se observaron los tres genotipos en ambos *loci*. En el caso del *locus* GHR se han descrito los tres genotipos en la mayoría de las razas estudiadas. Tal es el caso de los seis grupos estudiados por Blott *et al.* (18), la población Holstein estudiada por Li-Juan *et al.* (24) y las siete poblaciones estudiadas por Fontanesi *et al.* (23). En tres de ellas no se observó el genotipo YY (Brown Italiano, Jersey y Modenese). En la mayoría de las razas estudiadas el genotipo con una mayor

**TABLA 4.** Frecuencia alélica y genotípica, heterocigocidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) y prueba exacta de equilibrio Hardy-Weinberg./ *Allele and genotype frequency, heterocycosity ( $H_o$ ), expected heterocycosity ( $H_e$ ) and Hardy-Weinberg equilibrium test*

<i>Locus</i>	<i>Alelos</i>		<i>Genotipos</i>		$H_o$	$H_e$	<i>P-valor</i>
GHR	F	0.746	FF	0.517	0.458	0.381	0.030*
	Y	0.254	FY	0.458			
			YY	0.025			
PRLR	S	0.806	SS	0.686	0.240	0.314	0.016*
	N	0.194	SN	0.240			
			NN	0.074			

\* $p < 0.05$

frecuencia fue FF (18,23), con excepción del comportamiento de este *locus* en el Holstein Chino donde el genotipo más frecuente fue el YY (24). La heterocigosidad observada es superior a la esperada en el Siboney, observándose un desvío del estado de equilibrio Hardy-Weinberg ( $p < 0.05$ ). Similar estado de desviación del estado de equilibrio Hardy-Weinberg se describe en la raza Holstein Chino (24), mientras que para las siete razas estudiadas por Fontanesi *et al.* (13) no se observa en ninguna de ellas un desvío significativo de dicho estado de equilibrio.

El genotipo SS es el de mayor frecuencia encontrado en el *locus* PRLR para el Siboney. De forma similar se comporta la raza estudiada por Zhang *et al.* (22), donde la heterocigosidad observada es menor que la esperada con una desviación significativa de la condición de equilibrio Hardy-Weinberg ( $p < 0.05$ ). En las razas estudiadas por Lü *et al.* (29) se observó en una de ellas (Qinchuan) una desviación muy significativa del estado de equilibrio Hardy-Weinberg para este *locus* ( $p < 0.01$ ). En el Holstein Chino también se observó este *locus* fuera del estado de equilibrio Hardy-Weinberg (22).

Las metodologías desarrolladas sirven de base para la utilización en los protocolos de tipificación para la determinación de la estructura genética de poblaciones bovinas, específicamente para los dos *loci* estudiados y a su vez, posibilitan la inclusión de ambos receptores como indicadores de selección en los programas de mejoramiento genético, específicamente dirigidos a la mejora de la calidad de la leche en bovinos.

## CONCLUSIONES

Se dispone de dos metodologías que permiten identificar los polimorfismos F276Y del *locus* GHR y S18N del *locus* PRLR, cuya información pudiese ser utilizada en programas de selección asistida por marcadores, las cuales permitieron identificar las dos variantes alélicas en los *loci* estudiados y a su vez determinar que ambos *loci* se encuentran desviados de la condición de equilibrio Hardy-Weinberg.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer el soporte financiero brindado por el convenio CAPES/MES (Brasil/Cuba), Brasil para la realización de esta investigación. También agradecemos las facilidades brindadas por la Dirección Nacional de Genética y la Empresa Pecuaria Genética Valles de Perú para la obtención de muestras del rebaño Siboney de Cuba.

## REFERENCIAS

1. Etherton TD. Somatotropic function: The somatomedin hypothesis revisited. *J Anim Sci.* 2004; 82:239-244.
2. Etherton TD, Bauman DE. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol Reviews.* 1998; 78:745-761.
3. Clevenger CV, Furth PA, Hankinson SE, Schuler LA. The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocr Rev.* 2003; 24:1-27.
4. Kelly PA, Bachelot A, Kedzia C, Hennighausen L, Ormandy CJ, Kopchick JJ, Binart N. The role of prolactin and growth hormone in mammary gland development. *Molec Cell. Endocrin.* 2002; 197(1-2):127-131.
5. Auchtung T. Effects of photoperiod during the dry period on prolactin, prolactin receptor, and milk production of dairy cows. *J Dairy Sci.* 2005; 88(1):121-127.
6. Lee SA, Lee SA, Haiman CA, Burt NP, Pooler LC, Cheng I, et al. A comprehensive analysis of common genetic variation in prolactin (PRL) and PRL receptor (PRLR) genes in relation to plasma prolactin levels and breast cancer risk: the Multiethnic Cohort. *BMC Medical Genetics.* 2007; 8:72.
7. Kopchick JJ, Andry JM. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Molec. Genetics Metab.* 2000; 71:293-314.
8. Viitala S, Szyda J, Blott S, Schulman N, Lidauer M, Maki-Tanila A, Georges M, Vilkki J. The Role of the Bovine Growth Hormone Receptor and Prolactin Receptor Genes in Milk, Fat and Protein Production in Finnish Ayrshire Dairy Cattle. *Genetics.* 2006; 173:2151-2164.
9. Kelly PA, Binart N, Lucas B, Bouchard B, Goffin V. Implications of multiple phenotypes observed in prolactin receptor knockout mice. *Frontiers neuroendocrinol.* 2001; 22(2):140-145.
10. Kelly PA, Binart N, Freemark M, Lucas B, Goffin V, Bouchard B. Prolactin receptor signal transduction pathways and actions determined in prolactin receptor knockout mice. *Biochem So Transac.* 2001; 29(2): p. 48-51.

11. Vaclavicek A, Hemminki K, Bartram CR, Wagner K, Wappenschmidt B, Meindl A, et al. Association of prolactin and its receptor gene regions with familial breast cancer. *J Clin Endocrin & Metab.* 2006; 91(4):1513.
12. Bazan JF. A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164:788.
13. Fleenor D, Arumugam R, Freemark M. Growth hormone and prolactin receptors in adipogenesis: STAT-5 activation, suppressors of cytokine signaling, and regulation of insulin-like growth factor I. *Hormone Res Pediatrics.* 2006; 66(3):101-110.
14. Moody DE, Pomp D, Barendse W, Womack JE. Assignment of the growth hormone receptor gene to bovine chromosome 20 using linkage analysis and somatic cell mapping. *Anim Genet.* 1995; 26:341-343.
15. Jiang H, Lucy MC. Variants of the 5'-untranslated region of the bovine growth hormone receptor mRNA: isolation, expression and effects on translational efficiency. *Gene* 2001; 265: 45-53.
16. Turner LB, Harrison BE, Bunch RJ, Porto Neto LR, Li Y, Barendse W. A genome-wide association study of tick burden and milk composition in cattle. *Animal Prod Sci.* 2010; 50(4):235-245.
17. Lü A, Hu X, Chen H, Dong Y, Zhang Y, Wang X. Novel SNPs of the Bovine PRLR Gene Associated with Milk Production Traits. *Biochem Genetics.* 2011; 29(3-4):177-189.
18. Blott S, Kim JJ, Moisisio S, Schmidt-Kuntzel A, Cornet A, Berzi P, et al. Molecular dissection of a quantitative trait locus: a phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. *Genetics.* 2003; 163(1):253-266.
19. Waters SM, McCabe MS, Howard DJ, Gibson L, Magee DA, MacHughn DE, et al. Associations between newly discovered polymorphisms in the *Bos taurus* growth hormone receptor gene and performance traits in Holstein-Friesian dairy cattle. *Animal Genetics* 2011; 42(1):39-44.
20. Rahmatalla SA, Müller U, Strucken EM, Reissmann M, Brockmann GA. The F279Y polymorphism of the GHR gene and its relation to milk production and somatic cell score in German Holstein dairy cattle. *J Appl Genetics.* 2011; 52(4):459-465.
21. Scotti E, Fontanesi L, Russo V. Mutations in the bovine prolactin receptor (PRLR) gene: allele and haplotype frequencies in the Reggiana cattle breed. *Italian J Anim Sci.* 2007; 6(1S):207.
22. Zhang J, Zan L, Fang P, Zhang F, Shen G, Tian W. Genetic variation of PRLR gene and association with milk performance traits in dairy cattle. *Canadian J Anim Sci.* 2008; 88(1):33-39.
23. Fontanesi L, Scotti E, Tazzoli M, Beretti F, Dall'Olio S, Davoli R, et al. Investigation of allele frequencies of the growth hormone receptor (GHR) F279Y mutation in dairy and dual purpose cattle breeds. *Italian J Anim Sci.* 2007; 6(4):415-420.
24. Li-Juan W, Qiu-Ling L, Quang-fa W, Hong-Mei W, Jian-Bin L, Yun-Dong G, et al. CRS-PCR polymorphisms of the GHR gene and its relationship with milk production traits in Chinese Holstein cows. *Chinese J Agricult Biotechnol.* 2009; 6(03):215-219.
25. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.* 1988; 16:12-15.
26. Raymond M, Rousset F. Genepop (Version-1.2) - Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J Heredity.* 1995; 86(3): 248-249.
27. Rousset F. Genepop'007: a complete reimplement of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources,* 2008; 8:103-106.
28. Excoffier L, Laval G, Schneider A. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 2005. 1: p. 47-50.
29. Lü A, Hu X, Chen H, Dong Y, Pang Y. Single nucleotide polymorphisms of the prolactin receptor (PRLR) gene and its association with growth traits in Chinese cattle. *Molec Biol Report.* 2011; 38(1):261-266.

**Recibido: 23-5-2012.**

**Aceptado: 25-6-2012.**