ITEA (2000), Vol. 96A N.° 3, 173-183

UTILIZACIÓN DEL *GENOME SCAN* PARA LA DETECCIÓN DE REGIONES CROMOSÓMICAS QUE EXPLIQUEN PARTE DE LA VARIANZA ADITIVA Y EL POSTERIOR ESTUDIO DE GENES CANDIDATOS

J.J. Arranz

Dpto. Producción Animal I, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León, España

Introducción

Los caracteres productivos objeto de selección en las especies domésticas son, en general, de tipo cuantitativo. La variación observada en el fenotipo es el resultado de la acción directa de un número grande de genes con efecto individual pequeño y aditivo, de la interacción entre alelos del mismo o distinto gen, del efecto de factores ambientales diversos y de la interacción entre genes y ambiente (FALCONER y MACKAY, 1996). La contribución a la varianza aditiva de estos genes, denominados genéricamente QTLs (iniciales del término inglés *Quantitative Trait Loci*), ha sido tema de estudio desde los inicios de la investigación genética (SAX, 1923). El conocimiento de la arquitectura molecular de estos caracteres productivos, podría incrementar la respuesta a la selección y como consecuencia su eficacia, disminuyendo además las limitaciones derivadas del intervalo generacional.

Los principios para la localización de los QTLs son lo mismos que las del análisis de ligamiento entre dos genes mayores. La diferencia es que desconocemos a priori el genotipo para el locus cuantitativo, que consideramos heterocigoto cuando se observen diferencias significativas entre las dos clases fenotípicas, definidas por los alelos alternativos del marcador. Por lo tanto, los elementos necesarios para la detección y localización de QTLs son los mismos que para la elaboración de los mapas de ligamiento entre marcadores, es decir:

- Diseños familiares en los cuales esté segregando el carácter cuantitativo.
- Número suficiente de marcadores que cubran la totalidad del genoma.
- Métodos estadísticos que nos permitan detectar la asociación entre un marcador y un QTL segregante.

Diseños experimentales

Aunque históricamente se han propuesto un gran número de diseños experimentales para la detección de QTLs utilizando marcadores, pueden dividirse en dos grandes grupos, en función de las poblaciones en las que se quiere localizar estos loci (LYNCH y WALSH, 1997):

- Diseños para la localización en "líneas consanguíneas" creadas específicamente para los experimentos o en razas alejadas genéticamente. La localización de QTLs parte del principio de la existencia de dese-

quilibrio de ligamiento entre ellos y el marcador genético. La diferencia fenotípica de las medias entre individuos homocigóticos para el marcador se utiliza como indicadora de la eficiencia del diseño. Para generar desequilibrio de ligamiento es necesario realizar los apareamientos entre líneas parentales que difieren en los genotipos del QTL y de los marcadores, para obtener una F_1 heterocigótica para ambos. A partir de esta generación, se busca la asociación por retrocruzamiento o mediante la producción de una tercera generación segregante F_2.

• Diseños para la localización en poblaciones comerciales o *outbred*. Como tal entendemos poblaciones utilizadas rutinariamente en los sistemas habituales de producción animal. Hacen referencia, fundamentalmente, a los diseños hija y nieta (WELLER *et al.*, 1990); ambos basados en poblaciones de medio hermanos. En el primero, se buscan asociaciones entre las regiones genómicas flanqueadas por marcadores y las producciones de las hijas de varios sementales. Se obtendrán dos grupos de hijas de acuerdo al cromosoma paterno, y a su vez la presencia de alelos alternativos del QTL tenderán a generar diferencias en la media del carácter cuantitativo de cada grupo. WELLER *et al.* (1990) proponen otra alternativa al caso anterior para optimizar el análisis, añadiendo una generación adicional al diseño experimental. Los genotipos se analizan en los hijos y el carácter cuantitativo es medido en las nietas del reproductor y, mediante un test de progenie, se estima el valor genético del hijo para ese carácter.

La utilización de un determinado diseño experimental depende de las particularidades de las poblaciones originarias, del número y tipo de marcadores disponibles y de las características de los fenotipos que se miden en las poblaciones. Normalmente, el diseño elegido es aquel que optimiza la potencia estadística del experimento de detección de QTLs, sin olvidar las limitaciones económicas que suelen conllevar estas experiencias.

La mayoría de los estudios sobre búsqueda de QTLs en animales domésticos, se basan en el cruzamiento de razas alejadas genéticamente, tanto en ganado porcino (cruzamientos entre razas de origen europeo y asiático, o cerdo europeo con jabalí), como en vacuno (cruzamiento entre razas europeas o entre éstas y cebúes) o en avicultura con los cruces entre líneas de ponedoras y de producción de carne (broilers).

En este tipo de cruzamientos, se asume que ambas poblaciones poseen alelos alternativos del QTL, fijados en cada una de las razas (HALEY *et al.*, 1994). La ausencia de variabilidad con respecto al QTL, impide una aplicación directa en los programas de selección que utiliza cada una de las dos líneas implicadas. Su utilización requiere técnicas de introgresión. Estudios recientes, han desarrollado metodologías que no asumen la fijación de los alelos alternativos del QTL, sino frecuencias muy diferentes entre las razas. En consecuencia, varios alelos se encuentran segregando en alguna de las familias, con frecuencias muy distintas, de forma que los QTLs detectados sí podrían ser utilizados directamente en los programas de selección (ALFONSO y HALEY, 1998; PÉREZ-ENCISO y VARONA, 2000).

El diseño de medio hermanos, ya sea de dos (hija) o tres (nieta) generaciones, ha sido aplicado con notable éxito en el ganado vacuno de producción láctea (GEORGES *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos están siendo ya utilizados por compañías comerciales en sus programas de selección (BOVENHUIS y SPELMAN, 1998).

Cuadro 1
Tamaño estimado de diferentes experimentos para la localización de QTL

Diseño experimental	Tamaño de la población	Efecto del QTLr
Retrocruzamiento	525-2.100	0,282 s.d
F_2	1.050-2.100 (p = 0,5)	0,282 s.d
Diseño hija	2.000	0,5-1 s.d.
Diseño nieta	1.000	0,2 s.d.

Por lo que se refiere al tamaño teórico de los diseños experimentales, las estimaciones realizadas dependen del tipo de diseño, de la frecuencia de los alelos del locus cuantitativo en la población, de la heredabilidad del carácter y del efecto fenotípico del QTL. En el cuadro 1 se muestran algunas de las estimaciones recogidas de la bibliografía. Como se puede observar el tamaño teórico oscila entre 525 y más de 4.000 animales (SOLLER *et al.*, 1976; WELLER *et al.*, 1990; CARTA y ELSEN, 1999). El tamaño de los experimentos que se están llevando a cabo en la actualidad es bastante variable. En el caso de los diseños de cruzamiento entre razas oscilan entre 500 a 1.000 animales y en los diseños de medio hermanos incluyen alrededor de 1.000 animales.

Metodología estadística

Por lo que respecta a la metodología estadística utilizada en la detección de QTLs, durante la última década se han desarrollado una gran cantidad de procedimientos y algoritmos diferentes. Los primeros fueron diseñados para un solo marcador, sin tener en cuenta la existencia de ligamiento con otros marcadores (SOLLER y GENIZI, 1976; WELLER *et al.*, 1990) y empleaban sistemas de análisis de varianza o máxima verosimilitud. Actualmente, la metodología utilizada se basa en el análisis de intervalos flanqueados por marcadores informativos, que nos permiten conocer el origen del fragmento cromosómico de forma condicionada al genotipo de los dos marcadores flanqueantes. Los métodos estadísticos más frecuentemente empleados son el análisis de regresión (KNOTT *et al.*, 1966; KNOTT *et al.*, 1997) y el de máxima verosimilitud (LANDER y BOTSTEIN, 1989; GEORGES *et al.*, 1995), que producen unos resultados muy similares. También se han desarrollado técnicas que pueden ser utilizadas en variables que no siguen una distribución normal, basadas en el test de rangos de Wilcoxon (COPPIETERS *et al.*, 1998a).

Existen otros tipos de análisis con un gran potencial pero que no están completamente implementados para el análisis rutinario, son los métodos bayesianos y de estimación de componentes de varianza. La estimación de componentes de varianza se ha desarrollado mediante máxima verosimilitud (GOLDAR, 1990) o máxima verosimilitud restringida (GRIGNOLA *et al.*, 1996), que plantean problemas cuando los marcadores no son completamente informativos o cuando existen individuos en el pedigrí sin dato genotípico.

Los métodos bayesianos presentan una serie de ventajas claras, como la posibilidad de incluir el número de QTLs en cada cromosoma como parámetro no conocido, la de

tener en cuenta todas las relaciones existentes entre los animales o la de obtener parámetros menos sesgados en las poblaciones sometidas a selección (HOESCHELE *et al.*, 1997). Se ha aplicado con algún problema a pedigríes complejos (HOESCHELE *et al.*, 1997), aunque los avances en esta metodología podrían hacer que se convierta en una de las rutinarias en los próximos años (BINK y VAN ARENDONK, 2000; GEORGE *et al.*, 2000).

Un aspecto a tener en cuenta, es el cálculo de los niveles de significación. La realización de un elevado número de test estadísticos a lo largo del genoma, para buscar asociaciones positivas entre los marcadores y los caracteres objeto de estudio, hace que la cantidad de falsos positivos que se pueden encontrar sea muy elevada, aunque "α" sea muy pequeña en cada uno de los tests. Los procedimientos más frecuentes para fijar los niveles de significación son los del cálculo empírico para cada carácter mediante permutaciones (CHURCHILL y DOERGE, 1994) o la utilización de la corrección de Bonferroni para tests múltiples (Lynch y Walsh, 1997).

Marcadores genéticos

Además de los diseños familiares y los métodos estadísticos, el último aspecto fundamental en la detección de QTLs son los marcadores genéticos. Los primeros estudios realizados emplearon marcadores morfológicos y posteriormente grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos (NEIMANN-SORENSEN y ROBERTSON, 1961). Pero no fue hasta la llamada "revolución genética", que aplicó la tecnología del DNA recombinante, cuando se dispuso de un número suficiente de marcadores que permitieran una búsqueda sistemática en el genoma de los genes que controlan un carácter cuantitativo, empleando el denominado *genome scan.*

Los primeros mapas de ligamiento realizados en mamíferos empleaban los RFLPs como marcadores, pero fue a partir del descubrimiento de la PCR y los microsatélites, cuando es posible obtener mapas genéticos densos de la práctica totalidad de especies domésticas (ARCHIBALD *et al.*, 1995; KAPPES *et al.*, 1997; CRAWFORD *et al.*, 1996) y se empiezan a desarrollar los primeros proyectos de detección y localización de QTLs en estos animales. En la actualidad, los polimorfismos del tipo SNPs (snips), producidos por una mutación puntual en la secuencia de DNA, parecen ser los marcadores que sustituirán en un futuro cercano a los microsatélites. Este último tipo de marcadores está siendo utilizado con gran éxito, tanto en el hombre como en el ratón, merced a su elevado número y distribución uniforme a lo largo del genoma, y a la facilidad de automatización para su identificación, basada en la tecnología de micropunteo (*microarray*) o fotoactivación que permite aplicar los denominados DNA-chips (LINDBLAD-TOH *et al.*, 2000). En los animales domésticos se encuentran en sus primeras etapas de desarrollo y empiezan a surgir los primeros prototipos de marcadores que cubran el conjunto del genoma en diversas especies, para la posterior producción de los DNA-chips.

En el ámbito de la producción animal, casi todos los estudios realizados o en proceso para la detección de caracteres complejos emplean los microsatélites como marcadores. Los microsatélites son secuencias simples de DNA repetido. Son simples debido a que el tamaño de la unidad iterativa es pequeña (de 2 a 5 nucleótidos). Son muy abundantes en el genoma y se encuentran

distribuidos de una manera prácticamente uniforme a lo largo del mismo, poseen un elevado grado de polimorfismo, presentan herencia codominante y su detección puede automatizarse. Son estas características las que los convierten en marcadores casi ideales. Para poder aplicar el *genome scan* suele utilizarse un marcador polimórfico cada 20 cM. Con objeto de cubrir la totalidad del genoma se emplean, en las especies de animales domésticos, una media de 180 a 200 marcadores en una primera aproximación. Si tenemos en cuenta el tamaño de los diseños experimentales comentado con anterioridad, la realización de un *genome scan* implica la producción de más de 100.000 datos genotípicos.

Esta enorme demanda de trabajo rutinario hace necesario aplicar técnicas de alto rendimiento por persona y año. En un principio se utilizaron técnicas de amplificación conjunta (*multiplex*) utilizando marcado radiactivo y lectura de los alelos como valores relativos. Posteriormente, se han utilizado diversas tecnologías derivadas de la secuenciación automática, aunque parece que las técnicas fluorescentes basadas en la detección de 4 colores por línea de corrido electroforético desarrolladas por ABI y aplicadas posteriormente por otras firmas, son las más utilizadas en los proyectos de localización de QTLs que emplean microsatélites como marcadores (ZIEGLE *et al.*, 1992; SCHWENGEL *et al.*, 1994; HALL *et al.*, 1996).

El volumen de trabajo laboratorial necesario y la fiabilidad de la identificación genotípica de cada marcador que requiere el diseño experimental, hace que deba prestarse una atención especial a la metodología empleada. Brevemente, pasaremos a describir el proceso de identificación genotípica con la metodología de cuatro colores por línea utilizando secuenciadores automáticos. Los microsatélites se amplifican mediante PCR-multiplex de forma que con cada fluorocromo se amplifican de 2 a 4 marcadores. Una vez amplificados, se mezclan de forma proporcional, para que no exista contaminación cromática entre ellos y para que la intensidad sea similar. Finalmente, uno de los fluorocromos se reserva para el estándar de tamaño que servirá para la detección de la longitud de los alelos de cada animal. La mezcla de marcadores se separa mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes, en un secuenciador automático. Los datos de intensidad lumínica y de tiempo se registran en un ordenador. Finalizada la electroforesis, los datos brutos se analizan mediante un software diseñado específicamente para ello (GeneScan) y así la señal policromática detectada por el secuenciador se divide en cuatro señales monocromáticas. A partir del estándar se calcula el tamaño de los picos de los marcadores en los ficheros de resultados. A continuación, cada uno de los picos detectados se agrupa dentro de un marcador determinado y se le asigna una "etiqueta alélica", que es la que se utilizará posteriormente en los diferentes tipos de análisis.

Aunque el proceso es aparentemente sencillo y no parece presentar demasiadas fuentes de error, hay que tener en cuenta que, unido a esta potente tecnología encontramos una serie de problemas, a menudo no considerados a la hora de comenzar un proyecto de identificación de genotipos a gran escala, que pueden dar lugar a errores suficientes como para dificultar la correcta detección, localización y estimación de la magnitud del efecto de genes con influencia sobre un carácter cuantitativo (BRZUSTOWICZ *et al.*, 1993).

Entre los tipos de errores más frecuentemente detectados en nuestro laboratorio, podemos destacar los siguientes:

• Bandas sombra que dificultan la identificación genotípica de forma automática. Son específicas de cada secuencia amplificada y se pueden atenuar mediante cambios en las condiciones de PCR, aunque en algunas secuencias son difíciles de evitar (KNOWLES *et al.*, 1992).

• En algunos casos se observa una amplificación diferencial entre los dos alelos de un locus. Normalmente se debe a la existencia de una mutación en la zona complementaria de uno de los dos "primers" y puede determinar un primer grado en la aparición de alelos nulos, en los cuales uno de los dos alelos de los microsatélites no amplifica. En este caso, el marcador se trata como si tuviese un modo de herencia dominante (CALLEN *et al.*, 1993).

• La actividad "+A" de la Taq polimerasa se ha observado con cierta frecuencia y en algunas ocasiones ocasiona una diferente longitud del fragmento amplificado, lo que determina una mayor varianza en las clases alélicas e, incluso, un solapamiento entre las mismas (SMITH *et al.*, 1995).

• Fallos en la asignación del estándar interno. Esto conlleva que se realice una estimación diferente en el tamaño de los alelos, entre las diferentes líneas de un gel o entre geles distintos.

• Anomalías electroforéticas. Suele ser debidas a una migración electroforética errática de algún tipo cadenas de DNA, principalmente aquellas de naturaleza repetida. Ya que la estimación de la longitud alélica se realiza por comparación con un fragmento de tamaño de DNA conocido y de naturaleza no repetida y como resultado a un mismo alelo se le asignan longitudes distintas en geles diferentes (GHOSH *et al.*, 1997).

Por lo que se refiere a este último tipo, en un estudio realizado con medidas repetidas de un mismo individuo en geles distintos, se han identificado los siguientes factores de variación en la asignación alélica: gel, línea dentro del gel y, fundamentalmente, la interacción entre gel y marcador. En el cuadro 2 se resumen los factores de variación analizados y el porcentaje de varianza que explica cada uno de ellos. Como se puede observar, la combinación "Gel x Marcador" explica el mayor porcentaje de la varianza detectada en la asignación alélica. Estos resultados parecen indicar que ciertas secuencias microsatélites presentan una menor repetibilidad en el cálculo del tamaño de sus alelos, sin duda debido a que su composición en pares de bases hace que la migración electroforética sea más variable, al ser comparada con un estándar de tamaño compuesto por DNA de naturaleza no repetida.

Cuadro 2
Factores de variación en la asignación del tamaño de los alelos

	Significación	Varianza explicada
Gel	***	21%
Línea (gel)	***	3%
Gel x Marcador	***	68%
Alelo (marcador)	NS	

Estrategias alternativas

Existen una serie de estrategias que permiten reducir, de una manera significativa, el número de datos genotípicos necesarios para abordar una búsqueda de QTLs, sin que exista una pérdida notable de precisión. Estos procedimientos son interesantes desde el punto de vista de la reducción de costes laboratoriales y del tiempo necesario para la finalización del proyecto. El aspecto de la reducción del presupuesto es de particular relevancia, ya que la producción de un número tan elevado de datos genotípicos como los que se requieren para este tipo de proyectos, lleva asociado un alto coste en reactivos y personal, normalmente el más importante del proyecto, ya que la medición de los caracteres fenotípicos suele resultar menos gravosa. Entre dichas estrategias podemos destacar el "muestreo selectivo" y el *DNA pooling*.

El denominado muestreo selectivo o *selective genotyping* (Lander y Botstein, 1989) consiste en la elección para su análisis laboratorial, de los individuos con fenotipos extremos para el carácter que se desea analizar. Los fenotipos se adaptan mayoritariamente a una distribución normal y se suelen elegir entre el 40 y 50% de los individuos de la población, tomados de ambas colas de la distribución fenotípica. DARVASI y SOLLER (1992) demuestran que el genotipado selectivo puede determinar una considerable reducción del número de individuos analizados, sin disminuir de una forma considerable la potencia estadística del experimento. Este tipo de estrategia presenta como inconveniente principal que no es muy útil en casos de análisis para más de un carácter, ya que individuos con fenotipos extremos para uno pueden no serlo para otro.

El número de animales analizados se puede reducir también por medio de la mezcla de DNA (DNA pooling o Bulked segregant analysis). Es decir, en lugar de identificar los genotipos individualmente, el material genético de los individuos con similares fenotipos (alto y bajo), son separados en dos mezclas. De este modo, cada marcador podrá ser examinado mediante dos únicos análisis, uno por cada mezcla, de acuerdo a la intensidad de la banda que producen (DARVASI y SOLLER, 1994). Obviamente, los genotipos individuales para cada marcador no pueden ser determinados, pero sí pueden predecirse las frecuencias alélicas relativas, mediante un proceso de análisis densitométrico de las mezclas de ADN amplificado (KHATIB *et al.*, 1994).

Debido al error técnico que se comete en la determinación de las frecuencias alélicas, por la presencia de bandas superpuestas, es menos potente que el método anterior, pero resulta útil combinarlo con el método de muestreo selectivo, para el estudio en conjunto de diferentes caracteres. Un análisis de este tipo se ha aplicado, recientemente, a la búsqueda de QTLs en ganado vacuno lechero (LIPKIN *et al.*, 1998).

Otra estrategia de optimización del análisis de QTLs, aunque desde el punto de vista fenotípico, es la aplicación del "test de progenie". GEORGES *et al.* (1995) utilizan un diseño abuelo, donde el análisis de los genotipos se realiza en los hijos resultantes del apareamiento entre padres con méritos genéticos superiores ya probados, y el valor del carácter cuantitativo se obtiene mediante un "test de progenie", en función del comportamiento de sus hijas para el carácter de interés.

Análisis de los resultados

Una vez finalizada la determinación de genotipos se realiza la construcción del mapa de ligamiento y finalmente el análisis estadístico.

Los resultados que se obtienen en un *genome scan* suelen dar un intervalo de confianza de localización de los QTLs de unos 30-40 cM, demasiado grande para el inicio de estrategias de clonado posicional, e incluso poco eficiente para la utilización en MAS.

El primer paso para acortar el intervalo de confianza para la localización de un QTL es el aumento de densidad de marcadores. Dado que actualmente la mayoría de los mapas de ligamiento de las especies domésticas poseen una densidad media o elevada, se deberían utilizar los marcadores existentes en el intervalo de confianza de la localización del QTL. Si no fuesen suficientes, habría que recurrir a la producción de nuevos marcadores. La estrategia más sencilla sería la localización de nuevos microsatélites o SNPs en YAC o BAC que contienen a los marcadores del intervalo de confianza.

Por lo que se refiere al aumento de la densidad de recombinantes, en animales domésticos las estrategias diseñadas para animales de laboratorio (producción de líneas recombinantes, RIL, AIL, RPT, ISCS, etc.) (DARVASI, 1998) son poco eficaces debido al coste y al intervalo generacional. Por lo tanto, la única posibilidad de incrementar el número de recombinantes sería el aumento de tamaño del pedigrí a analizar. Otra posibilidad sería la utilización del desequilibrio de ligamiento existente en algunas poblaciones como es el caso del ganado vacuno de raza frisona (FARNIR *et al.*, 2000). Este método se ha mostrado muy útil en los caracteres monogénicos (CHARLIER *et al.*, 1996; HOUWEN *et al.*, 1994; DUNNER *et al.*, 1997) y con la misma base teórica puede ser aplicado a los caracteres cuantitativos. El principio se basa en que los individuos portadores de un mismo alelo "raro" descienden de un único individuo en el que se produjo la mutación, y portan un fragmento cromosómico común, cuya longitud es igual a 2/(n*x), siendo n el número de generaciones que separan el individuo fundador y el actual y "x" la longitud en cM.

Aplicación al cromosoma 14 del ganado vacuno

En un estudio de búsqueda de QTLs mediante *genome scan*, en ganado vacuno, utilizando un diseño abuelo, se detectó un fuerte efecto para el porcentaje de grasa, en la región proximal del cromosoma 14, que fue confirmado en una muestra independiente de animales (COPPIETERS *et al.*, 1998b). El intervalo de confianza para la localización de dicho QTL era de aproximadamente 40 cM, evidentemente demasiado grande para la realización de una aplicación directa en MAS o para un posible clonado posicional (10 cM $\approx$ 10 x 10^6 bp $\approx$ 300 genes). El proceso de "mapeo fino" de dicho QTL se presenta en RIQUET *et al.* (1999). Con el fin de lograr una localización más precisa de dicho QTL se siguieron los pasos siguientes:

1. Obtención de un mapa de alta resolución en la región proximal del cromosoma 14. La densificación en marcadores de la zona se realizó mediante la búsqueda de microsatélites y SNPs en BAC y YAC que contenían los marcadores utilizados en el primer análisis.

2. Identificación de las familas segregantes para el QTL. Las familias que superaron el nivel de significación del 5% (corregido mediante el procedimiento de Bonferroni) fueron seleccionadas como portadoras del QTL y del correspondiente fragmento circundante. En este caso se seleccionaron siete de los 29 sementales analizados como heterocigotos para dicho QTL.

3. Determinación de los genotipos para los nuevos marcadores producidos y determinación de la fase de ligamiento de los mismos en los sementales portadores del QTL.

4. Identificación de un haplotipo compartido en uno de los dos alelos de los sementales. Este haplotipo compartido por el conjunto de hijos portadores del alelo "+" o del "-" será el portador del QTL, y el tamaño del mismo dependerá del número de generaciones transcurridas entre los sementales tipificados y el antepasado común.

5. Finalmente, se verificó el efecto fenotípico del segmento portador del alelo del QTL en la población general. Para ello se realizó un análisis de las medias productivas de los individuos portadores de dicho haplotipo frente al resto de haplotipos. El resultado demuestra claramente que los individuos portadores del haplotipo "+" poseen una media fenotípica superior a los no portadores.

Mediante este procedimiento se caracterizó un segmento cromosómico de 5 cM, donde se ha localizado un QTL con efecto positivo sobre el porcentaje de grasa en la leche. El tamaño de este fragmento permite que pueda ser utilizado en selección asistida por marcadores y es el primer paso para la realización del posible clonado posicional.

El paso siguiente es el clonado posicional del QTL detectado, para ello se pueden utilizar diversas técnicas como el secuenciado de la región completa, *el zoo-blotting, exon trapping* o la utilización del mapeo comparado que permite la localización de genes candidatos posicionales. De todas formas, el trabajo requerido para el clonado posicional es muy laborioso y dilatado en el tiempo. Una vez identificado el gen deben caracterizarse su productos y regulación mediante técnicas de análisis de su expresión y de las proteínas producidas por el mismo.

Bibliografía

ALFONSO L., HALEY C.S., 1998. Power of different F2 schemes for QTL detection in livestock. Anim Sci; 66: 1-8.

ARCHIBALD A.L., HALEY C.S., BROWN J.F., COUPERWHITE S., MCQUEEN H.A., NICHOLSON D., COPPIETERS W., VAN DE WEGHE A., STRATIL A., WINTERO A.K., *et al.*, 1995. The PiGMaP consortium linkage map of the pig (Sus scrofa). Mamm Genome; 6: 157-175.

BRZUSTOWICZ L.M., MERETTE C., XIE X., TOWNSEND L., GILLIAM T.C., OTT J., 1993. Molecular and statistical approaches to the detection and correction of errors in genotype databases. Am J Hum Genet; 53: 1137-1145.

CARTA, A., ELSEN, J.M., 1999. Sire design power calculation for QTL mapping experiments. Genet Sel Evol, 31: 183-189.

CHARLIER C., FARNIR F., BERZI P., VANMANSHOVEN P., BROUWERS B., GEORGES M., 1996. IBD mapping of recessive traits in livestock: application to map the bovine syndactyly locus to chromosome 15. Genome Res; 6: 580-589.

CHURCHILL G.A., DOERGE R.W., 1995. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. Genetics, 138: 963-971.

COPPIETERS W., KVASZ A., FARNIR F., ARRANZ J.J., GRISART B., MACKINNON M., GEORGES M., 1998b. A Rank-based nonparametric method for mapping trait loci in outbred half-sib pedigrees: application to milk production in a grand-daughter design. Genetics, 149: 1547-1555.

COPPIETERS W., RIQUET J., ARRANZ J.J., BERZI P., CAMBISANO N., GRISART B., KARIM L., MARCQ F., MOREAU L., NEZER C., SIMON P., VANMANSHOVEN P., WAGENNAR D., GEORGES M, 1998a. A QTL with major effect on milk yield and composition maps to bovine chromosome 14. Mamm Genome, 9: 540-544.

CRAWFORD A.M., DODDS K.G., EDE A.J., PIERSON C.A., MONTGOMERY G.W., GARMONSWAY H.G., BEATTIE A.E., DAVIES K., MADDOX J.F., KAPPES S.W. *et al.*, 1995. An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. Genetics; 140: 703-724.

DARVASI A., SOLLER M., 1992. Selective genotyping for determination of linkage between a marker locus

and a quantitative trait locus. Theor Appl Genet; 85: 353-359.

DARVASI A., SOLLER M., 1994. Selective DNA pooling for determination of linkage between a molecular marker and a quantitative trait locus. Genetics; 138: 1365-1373.

DARVASI A., 1998. Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. Nat Genet; 18:19-24.

DUNNER S., CHARLIER C., FARNIR F., BROUWERS B., CANON J., GEORGES M., 1997. Towards interbreed IBD fine mapping of the mh locus: double-muscling in the Asturiana de los Valles breed involves the same locus as in the Belgian Blue cattle breed. Mamm Genome; 8: 430-435.

GEORGE A.W., MENGERSEN K.L., DAVIS G.P., 2000. Localization of a quantitative trait locus via a Bayesian approach. Biometrics; 56: 40-51.

GEORGES M., NIELSEN D., MACKINNON M., MISHRA A., OKIMOTO R., PASQUINO A.T., SARGEANT L.S., SORENSEN A., STEELE M.R., ZHAO X., WOMACK J.E., HOESCHELE I., 1995. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. Genetics. 139: 907-920.

GHOSH S., KARANJAWALA Z.E., HAUSER E.R., ALLY D., KNAPP J.I., RAYMAN J.B., MUSICK A., TANNENBAUM J., TE C., SHAPIRO S., ELDRIDGE W., MUSICK T., MARTIN C. *et al.*, 1997. Methods for precise sizing, automated binning of alleles, and reduction of error rates in large-scale genotyping using fluorescently labeled dinucleotide markers. FUSION (Finland-U.S. Investigation of NIDDM Genetics) Study Group. Genome Res.; 7: 165-178.

GOLDGAR D.E., 1990. Multipoint analysis of human quantitative genetic variation. Am J Hum Genet; 47: 957-967.

GRIGNOLA F.E., HOESCHELE I. Y TIER B., 1996. Mapping quantitative trait loci via residual maximum likelihood: I Methodology. Genet Sel Evol; 28: 479-490.

HALL J.M., LEDUC C.A., WATSON A.R., ROTER A.H., 1996. An approach to high-throughput genotyping. Genome Res. 6: 781-790.

HOESCHELE I., UIMARI P., GRIGNOLA F.E., ZHANG Q., GAGE K.M., 1997. Advances in statistical methods to map quantitative trait loci in outbred populations. Genetics; 147: 1445-1557.

HOUWEN R.H., BAHARLOO S., BLANKENSHIP K., RAEYMAEKERS P., JUYN J., SANDKUIJL L.A., FREIMER N.B., 1995. Genome screening by searching for shared segments: mapping a gene for benign recurrent intrahepatic cholestasis. Nat Genet.; 8: 380-986.

KAPPES S.M., KEELE J.W., STONE R.T., MCGRAW R.A., SONSTEGARD T.S., SMITH T.P.L., LOPEZ-CORRALES N.L., BEATTIE C.W., 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. Genome Res. 7: 235-249.

KHATIB H., DARVASI A., PLOTSKI Y., SOLLER M., 1994. Determining relative microsatellite allele frequencies in pooled DNA samples. PCR Methods and Applications. 4: 13-18.

KNOTT S.A., ELSEN J.M. Y HALEY C.S., 1996. Methods for multiple marker mapping of quantitative trait loci in half-sib populations. Theor Appl Genet; 93: 71-80.

KNOTT S.A., NEALE D.B., SEWELL M.M. Y HALEY C.S., 1997. Multiple marker mapping of quantitative trait loci in an outbred pedigree of loblolly pine. Theor Appl Genet; 94: 810-820.

KNOWLES J.A., VIELAND V.J., GILLIAM T.C., 1992. Perils of gene mapping with microsatellite markers. Am J Hum Genet.; 51: 905-909.

LANDER E.S., BOTSTEIN, D., 1989. Mapping mendelian factor underlying quantitative traits using RFLP linkage map. Genetics, 121: 185-199.

LINDBLAD-TOH K., WINCHESTER E., DALY M.J., WANG D.G., HIRSCHHORN J.N., LAVIOLETTE J.P., ARDLIE K., REICH D.E., ROBINSON E., SKLAR P., SHAH N., THOMAS D., FAN J.B., GINGERAS T., WARRINGTON J., PATIL N., HUDSON T.J., LANDER E.S., 2000. Large-scale discovery and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the mouse. Nat Genet; 24:381-386.

LIPKIN E., MOSIG M.O., DARVASI A., EZRA E., SHALOM A., FRIEDMANN A., SOLLER M., 1998. Quantitative Trait Locus mapping in dairy cattle by means of selective milk dna pooling using dinucleotide microsatellite markers: analysis of milk protein percentage Genetics; 149: 1557-1567.

LYNCH M., WALSH B., 1997. Genetics and Analysis of Quantitative Traits. Sinauer Associates Inc. Publishers. Sunderlan, Massachusset, USA.

NEJMANN-SORENSEN A., ROBERTSON A., 1961. The association between blood groups and several produc-

tion characteristics in three Danish cattle breeds. Acta Agric Scan, 11: 163-196.

PÉREZ-ENCISO M., VARONA L., 2000. Quantitative Trait Loci Mapping in F2 Crosses Between Outbred Lines. Genetics; 155: 391-405.

RIQUET J., COPPIETERS W., CAMBISANO N., ARRANZ J.J., BERZI P., DAVIS S.K., GRISART B., FARNIR F., KARIM L., MNI M., SIMON P., TAYLOR J.F., VANMANSHOVEN P., WAGENAAR D., WOMACK J.E., GEORGES M., 1999. Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in outbred populations: application to milk production in dairy cattle. Proc Natl Acad Sci U S A; 96: 9252-9257.

SAX K. (1923). The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in Phaseolus vulgaris. Genetics. 8: 552-560.

SCHWENGEL D.A., JEDLICKA A.E., NANTHAKUMAR E.J., WEBER J.L., LEVITT R.C., 1994. Comparison of fluorescence-based semi-automated genotyping of multiple microsatellite loci with autoradiographic techniques. Genomics; 22: 46-54.

SMITH J.R., CARPTEN J.D., BROWNSTEIN M.J., GHOSH S., MAGNUSON V.L., GILBERT D.A., TRENT J.M., COLLINS F.S., 1995. Approach to genotyping errors caused by nontemplated nucleotide addition by Taq DNA polymerase. Genome Res.; 5: 312-317.

SOLLER M., GENIZI A., 1978. The efficiency of experimental designs for the detection of linkage between a marker locus and a locus affecting a quantitative trait in segregating populations. Biometrics. 34: 47-55.

SOLLER M., GENIZI A., BRODY T., 1976. On power of experimental designs for detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines. Theor Appl Genet. 47: 35-39.

SPELMAN R.J. Y BOVENHUIS H., 1998. Moving from QTL experimental results to the utilization of QTL in breeding programmes. Anim Genet. 29: 77-84.

WELLER J.I., KASHI Y., SOLLER M., 1990. Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. J Dairy Sci.: 73: 2525-2537.

ZHANG Q., BOICHARD D., HOESCHELE I., ERNST C., EGGEN A., MURKVE B., PFISTER-GENSKOW M., WITTE L.A., GRIGNOLA F.E., UIMARI P., THALLER G., BISHOP M.D., 1998. Mapping quantitative trait loci for milk production and health of dairy cattle in a large outbred pedigree. Genetics; 149: 1959-1973.

ZIEGLE J.S., SU Y., CORCORAN, K.P., 1992. Application of automatic DNA sizing for genotyping microsatellite loci. Genomics, 4: 1026-1031