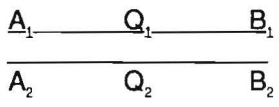
Detección de QTL en Vacuno de Leche

Luis Gomez-Raya
Department of Animal Science
Agricultural University of Norway
Box 5025, N-1432 Ås, Norway

Introducción

Los métodos tradicionales para incrementar la producción y la resistencia a enfermedades en vacuno lechero se han basado en la utilización de métodos estadísticos. Una de las asunciones más críticas de estos métodos es atribuir la expresión de los caracteres productivos a un componente ambiental y a otro de origen genético con un número muy elevado de *loci* de efecto muy pequeño. La utilización de estos métodos ha permitido un incremento considerable en la producción lechera. En menos de 20 años se ha pasado de 4500 kg por vaca y año a más de 6800 kg (Pearson et al., 1990). La asunción de un número elevado de *loci* de efecto pequeño fue necesaria debido a la carencia de métodos para identificar y localizar los *loci* implicados en la expresión de caracteres productivos. El desarrollo de las técnicas de biología molecular en los últimos años hace posible la identificación y localización de éstos. La detección de *loci* que afectan a caracteres quantitativos (QTL, usando las iniciales de la acepción inglesa) es la busqueda de los genes responsables de producción con la ayuda de marcadores genéticos. Habitualmente se consideran dos clases de marcadores genéticos: tipo I y tipo II. Los marcadores tipo I o genes candidatos son *loci* funcionales, por ejemplo, las caseínas para producción de proteínas en la leche. Los marcadores tipo II son marcadores distribuidos por todo el genoma y áltamente polimórficos, por ejemplo, ADN microsatélite. La información que los marcadores proporcionan se ilustra a continuación: consideremos un progenitor que es heterozigoto para marcadores genéticos A (con alelos A_1 y A_2) y B (con alelos B_1 y B_2) y también para un QTL, Q (con alelos Q_1 y Q_2), con una disposición de las cromátidas como se muestra en la figura. Este individuo produce los siguientes tipos de gametos identificables por los marcadores genéticos:



A_1B_1 no recombinante
A_1B_2 recombinante
A_2B_1 recombinante
A_2B_2 no recombinante

La herencia de alelos alternativos para el QTL (tomada como la probabilidad dado el tipo de gameto heredado) se contrasta con la producción en los descendientes de este progenitor. Si se genotipea un solo marcador y es el mismo QTL entonces se trata de marcadores tipo I. Si se genotipea un solo marcador tipo II (ej. A) y no es el mismo QTL entonces los dos subgrupos de progenie son una mezcla de individuos A_1B_1-A_1B_2 y A_2B_1-A_2B_2, proporcionando menor información de las diferencias reales entre la progenie que hereda los alelos alternativos del QTL. Si se genotipean los dos marcadores A y B entonces se utilizan marcadores laterales («flanking markers») y el mapeo que se realiza es de intervalos.

En las secciones siguientes se discuten diseños experimentales, requerimientos, limitaciones y perspectivas para la detección de QTL en vacuno lechero.

Diseños Experimentales en Vacuno

Dos tipos de diseños experimentales han sido propuestos: el diseño de hijas y el diseño de nietas. En el diseño de hijas, el contraste se realiza entre los subgrupos de progenie que heredan alelos paternales alternativos. En el diseño de nietas, el contraste es entre los subgrupos de nietas cuyos padres heredan alelos alternativos. En este diseño se realizan genotipeados de los abuelos y de los padres mientras que la poducción se registra en las nietas. Este es el diseño experimental que más se esta utilizando porque requiere un menor número de genotipeados para un poder estadistico dado (Weller et al., 1990).

Requerimientos para la Detección de QTL en Vacuno Lechero

Los gastos de mantenimiento de vacuno son muy elevados para su utilización en experimentos encaminados a la deteccion de QTL. Por lo tanto, la mayor parte de los estudios que se están llevando a cabo utilizan las poblaciones comerciales. Este material es menos apropiado que disponer de cruces entre poblaciones divergentes porque se espera que la heterozigosidad de marcadores genéticos y QTL sea menor (50% en el mejor de los casos). Los requerimientos para detección de QTL en todo el genoma utilizando marcadores altamente polimórficos como el ADN satélite son:

a) Disponibilidad de registros de producción o resistencia a enfermedades. Estos son normalmente los mismos que se utilizan en las evaluaciones genéticas rutinarias.

Tabla 1. Poder estadístico en un diseño de nietas con un error de tipo I de .01 y estructura de población de 6 toros con un promedio de 25 hijos por toro y 60 nietas por hijo. La frequencia de toros heterozigotos es .5. Se consideran heredabilidades (h^2) .10, .20, y .30.

Efecto del QTL*	h^2 = .10	h^2 = .20	h^2 = .30
.10	.03	.02	.02
.20	.17	.10	.07
.30	.50	.30	.20
.40	.76	.58	.43
.50	.90	.78	.65

* Efecto del QTL en desviaciones estándar fenotípicas

b) Disponibilidad de mapas genéticos con una distancia apróximada de 20cM entre marcadores consecutivos. Se han publicado varios mapas de vacuno (Barendse et al., 1994; Bishop et al.; 1994; Ma et al. 1996, Barendse et al., 1997), estando el mapa más completo disponible en internet (http://sol.marc.usda.gov/genome/cattle/cattle.html). En total hay descritos cerca de 2000 marcadores con una densidad promedio de alrededor de 2cM.

c) Una estructura de población que permita obtener un alto poder estadístico (probabilidad de detectar un QTL cuando existe). En la Tabla 1 se muestra el poder utilizando un diseño de nietas en una población con una estructura como la española con 6 toros (que tengan 15 o más hijos) con un promedio de 25 hijos por toro y una media de 60 nietas por hijo. Sólo sería posible detectar QTL con efectos relativamente largos.

Organización de un Projecto de Detección de QTL usando un Diseño de Nietas

La organización de un proyecto para la detección de QTL requiere la coordinación de científicos en áreas diferentes. Cuando se utiliza un diseño de nietas se deben cubrir las siguientes tres áreas:

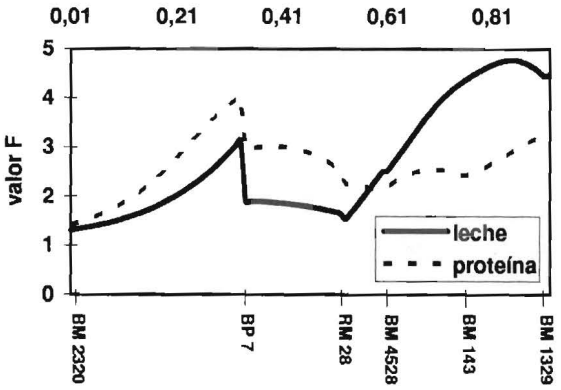
1) Recogida de registros de producción de las nietas para los caracteres de interés.
2) Genotipeado de toros y de sus hijos.
3) Desarrollo de métodos estadísticos e informáticos para el manejo y análisis de los datos.
   3.1) Creación y manejo de una base de datos correspondiente a los marcadores genéticos y a los de producción.

Es conveniente que la base de datos se pueda actualizar a medida que se progresa en la determinación de los genotipos, con lo que nuevos marcadores pueden utilizarse en areas cromosómicas con un número bajo de toros informativos.

3.2) Construcción de un mapa de ligamiento de marcadores. Se requieren distancias genéticas entre todos los marcadores para su uso posterior en mapeo de intervalos. Es importantante utilizar el método de máxima verosimilitud para estimar la fracción de recombinación entre marcadores porque utiliza toda la información disponible en los hijos de los toros, incluso cuando el genotipo del toro y de su hijo son idénticos y no puede deducirse el alelo heredado por el hijo.

3.3) Detección de QTL utilizando mapeo de intervalos (Lander y Botstein, 1989). El método se basa en calcular la probabilidad condicional de que un QTL esté en un punto dado del cromosoma (utilizando los marcadores más próximos) y contrastar dentro de toros (por la producción de sus nietas) la herencia de alelos alternativos del toro a través de sus hijos. El mapa de ligamiento entre marcadores es necesario para el cálculo de la probabilidad condicional de que un QTL esté en un punto dado del cromosoma. A continuación se repite el análisis pero se avanza, por ejemplo, 1 cM y así sucesivamente hasta completar todo el cromosoma. El resultado final es un conjunto de valores del parámetro con que se realizan los test de hipótesis (generalmente «lod score» en el método de máxima verosimilitud y valores F para métodos utilizando modelos lineares) correspondientes a los distintos puntos del cromosoma. Por ejemplo, los valores F para la producción de proteína y leche correspondientes al cromosoma 6 en ganado vacuno noruego se muestran en la Figura 1 (Gomez-Raya et al., 1996). Los picos de la gráfica indicarían la presencia y localización de QTL si los valores están por encima de un umbral. El valor umbral en el ejemplo de la Figura 1 es 2.80, a un nivel de confianza del .01, y utilizando el método usual de test de hipótesis basado en que los contrastes se realizan una sola vez. Cuando los contrates se realizan muchas veces, como en el mapeo de intervalos, los valores umbral no son estríctamente válidos. Sin embargo, aunque los resultados no sean concluyentes, uno de los picos de la figura indicaría la existencia de un QTL afectando a la producción de proteínas cerca del marcador BP7. Este resultado es consistente con los obtenidos por Lien et al. (1995), quienes encontraron asociación entre haplotipos de caseínas y caracteres de producción

Figura 1. Valores F utilizando mapeo de intervalos para la produción de leche y proteína en el cromosoma 6 en ganado noruego (Gomez-Raya et al., 1996). La abscisa en la parte superior representa las distancias genéticas cubiertas en el cromosoma. La abscisa en la parte inferior son los marcadores genéticos.



lechera en la misma población, ya que el marcador BP7 está localizado cerca de las caseínas (Bishop et al., 1994). El otro pico entre marcadores BM143 y BM1329 afecta a la producción de leche, pero no de proteínas. Resultados similares en esta parte del cromosoma 6 se han descrito por varios autores (Georges et al. 1995; Spelman et al. 1996; Vilki et al., 1996; Kühn et al., 1996). El problema de test múltiples se resolvería utilizando tests de permutaciones (Churchill y Doerge, 1994) basados en atribuir aleatoriamente las producciones de las nietas a sus padres un número muy elevado de veces y computar ese mismo número de veces el parámetro para el test de hipótesis. De esta forma se puede obtener empíricamente la distribucción del parámetro bajo la hipótesis nula y, por lo tanto, determinar los valores umbral.

Limitaciones y Perspectivas para la Detección de QTL en Vacuno de Leche

Hasta la fecha sólo se ha publicado el estudio de Georges et al. (1995) utilizando un diseño de nietas en la población Holstein de USA y marcadores distribuidos por todo el genoma. Estos autores identifican cinco fragmentos cromosómicos (en los cromosomas 1, 6, 9, 10 y 20) afectando caracteres de producción lechera. Los métodos estadistícos empleados por los autores no tienen en cuenta el hecho de que se realizan tests múltiples (no utilizan test de permutaciones) y los análisis se llevan a cabo independientemente para cada familia. Otros estudios utilizando un

diseño de nietas se llevan a cabo en Bélgica-Holanda (Spelman et al. 1996), Finlandia (Vilki et al., 1996), Alemania (Kühn et al., 1996) y Noruega (Gomez-Raya et al., 1996) pero hasta la fecha sólo se ha publicado información parcial sobre algunos cromosomas.

Hay dos problemas no resueltos completamente. El primero es cómo determinar valores umbral para más de un QTL simultáneamente. Doerge y Churchill (1996) proponen dos métodos alternativos pero de difícil implementación a medida que se incrementa en el número de QTL. La segunda limitación es que los métodos de detección utilizando marcadores cada 20 cM no son capaces de determinar la localización de QTL de una manera muy precisa, debido a que la información para la localización la proporcionan los recombinantes y éstos ocurren infrequentemente.

Como se decía anteriormente, los métodos de mejora tradicionales asumían un número muy elevado de *loci* con efecto desconocido. La información sobre QTL detectados usando los métodos discutidos anteriormente podría incluirse en programas de selección asistida de marcadores (ej. Ruane y Colleau, 1996). Sin embargo, el riesgo de utilizar QTL «estadísticos» (en el sentido que la evidencia sobre su presencia es sólo estadística) puede ser de difícil aceptación por la industria. Desde el punto de vista científico, el interés reside en la identificación de los genes con lo que se podrían dilucidar las bases genéticas de los caracteres productivos. Por lo tanto, el interés final de los métodos de detección de QTL es la caracterización de éstos. Dos opciones serán utilizadas para ello: mapeo comparativo («comparative mapping») y clonaje de posición («positional cloning»). El rápido desarollo del mapa genético y de secuenciación del genoma humano (ver información en internet: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/science96/) podría utilizarse para la identificación de los *loci* responsables de producción por mapeo comparativo ya que los mamíferos comparten entre un 70 y 80% de las secuencias de ADN que codifican proteínas. Una vez que se detecte un QTL en un fragmento cromosómico de unos 20cM, utilizando mapeo de intervalos, se pueden realizar nuevos tests empleando polimorfismos en los genes funcionales encontrados en la correspondiente área cromosómica en humanos. El clonaje de posición es una técnica en biólogia molecular que puede permitir la caracterización de los QTL pero requiere fragmentos de alrededor de 1.5cM. Por lo tanto, se requieren métodos más

precisos que los de mapeo de intervalo actuales para poder realizar clonaje de posición.

Otro procedimiento alternativo para la detección de QTL es el mapeo de genes idénticos por descendencia (Lander y Botsein, 1987). Estos métodos se basan en comparar haplotipos de individuos emparentados que presentan los mismos síntomas de una enfermedad. Se espera que estos individuos compartan en una mayor frecuencia haplotipos ligados a un gen de la enfermedad que otros marcadores no ligados. Charlier et al. (1996) han logrado mapear el gen de la sindactilia utilizando esta técnica.

Los resultados esperanzadores utilizando los métodos discutidos anteriormente muestran que es posible detectar y caracterizar QTL que afectan a caracteres productivos o a enfermedades. Con el desarrollo de estos métodos en los próximos años será posible identificar las bases genéticas de la variación observable a nivel fisiológico y, potencialmente, producir alimentos más eficientemente.

Agradecimientos

Se agradece la financiación del «Norwegian Research Council». El autor agradece a Joan Tibau comentarios sobre el manuscrito y a Juan Peña (CONAFE) la información sobre la estructura de población vacuna en España.

Bibliografia

Barendse, W. et al. 1994. Nature Genetics. 6:227-335.
Barendse, W. et al. 1997. Mamalian Geneme. 8:21-28.
Bishop M.D. et al. 1994. Genetics.136:619-639.
Charlier C. et al. 1996. Genome Research. 6:580-589.
Churchill G.A. and R.W. Doerge. 1994. Genetics. 138:963-971.
Doerge R.W. and G.A. Churchill. 1996. Genetics. 285-294.
Georges M. et al.. 1995. Genetics. 139:907-920.
Gomez-Raya L. et al. 1996. 47th Annual Meeting of the EEAP. pg 39. Lillehammer
Kühn, C.H. et al. 1996. Abstract of the XXVth International Conference on Animal Genetics, Tours, July 21-25, 1996, pg 164.
Lander S.E. y D. Botstein.1987. Science. 236:1567-1570.
Lander S.E. y D. Botstein.1989. Genetics. 121:185-199.
Lien S., et al. 1995. Journal of Dairy Science. 78: 2047-2056.
Ma R.Z. et al. 1996. Journal of Heredity. 87:261-271.
Pearson, R.E. et al. 1990. Proc. of the 4th World Congress. Edinburgh, 14:104-113.
Ruane J. y J.J. Colleau.1996. Journal of Dairy Science. 1666-1678.
Spelman R.J. et al. 1996. Genetics: 1799-1808.
Vilkki H.J. et al., 1996. 47th Annual Meeting of the EEAP. 15-29. Lillehammer.
Weller et al., 1990. Journal of Dairy Science. 73:2525-2537.