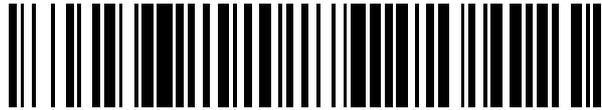


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 105**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2007 E 07702476 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 2069531**

54 Título: **QTL para resistencia a mastitis en ganado bovino**

30 Prioridad:

**06.02.2006 DK 200600164
30.01.2007 DK 200700147**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.10.2013

73 Titular/es:

**AARHUS UNIVERSITET (33.3%)
Nordre Ringgade 1
8000 Aarhus C, DK;
MTT AGRIFOOD RESEARCH FINLAND (33.3%) y
ESTONIAN UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**LUND, MOGENS SANDØ;
BENDIXEN, CHRISTIAN;
SAHANA, GOUTAM;
SØRENSEN, PETER;
SVENDSEN, SØREN;
THOMSEN, BO;
MAJGREN, BENTE FLÜGEL;
SABRY, AYMAN MAHMOUD;
ANDERSSON-EKLUND, INGRID LENA;
VILKKI, HELMI JOHANNA;
ISO-TOURU, TERHI KATARLINA;
VIITALA, SIRJA MARIA;
SCHULMAN, NINA FREDERIKA;
HASTINGS, NICOLA;
WILLIAMS, JOHN LEWIS WILLIAM;
WOOLLIAMS, JOHN ARTHUR;
FERNÁNDEZ ÀVILA, ANA ISABEL;
VIINALASS, HALDJA y
VÁRV, SIRJE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 425 105 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

QTL para resistencia a mastitis en ganado bovino.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para determinar la resistencia frente a mastitis en un sujeto bovino que comprende detectar al menos un marcador genético ubicado en el cromosoma bovino BTA9. Además, la presente invención se refiere al uso de un kit de diagnóstico para detectar la presencia o ausencia de al menos un marcador genético asociado con resistencia frente a mastitis.

Antecedentes de invención

10 La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria o ubre de la vaca que resulta de infección o traumatismo y se cree que la mastitis es la enfermedad más importante económicamente en el ganado bovino.

La enfermedad puede producirse por una variedad de agentes. La causa principal de la mastitis es la invasión de la glándula mamaria a través de la punta del pezón por microorganismos.

15 La mastitis puede ser clínica o subclínica, precediendo la infección subclínica a las manifestaciones clínicas. La mastitis clínica (CM) puede detectarse visualmente mediante la observación de glándulas mamarias rojas e hinchadas, es decir, ubre roja hinchada, y mediante la producción de leche coagulada. Una vez detectada, la leche de vacas con mastitis se mantiene separada del tanque de modo que no afecte a la calidad de la leche total.

20 La mastitis subclínica es un tipo de mastitis caracterizada por altos recuentos de células somáticas (SCS), una temperatura corporal normal o elevada y muestras de leche que deben dar resultados positivos en cultivo. Por tanto, la mastitis subclínica no puede detectarse visualmente por la hinchazón de la ubre o por la observación de la glándula o la leche producida. Debido a esto, los granjeros no tienen la opción de apartar la leche de las vacas con mastitis subclínica. Sin embargo, esta leche es de calidad inferior a la de las vacas no infectadas y por tanto puede contaminar el resto de la leche en el tanque.

25 La mastitis puede detectarse mediante el uso de recuentos de células somáticas (SCS) en los que se analiza una muestra de leche de una vaca para determinar la presencia de células somáticas (glóbulos blancos). Las células somáticas son parte del mecanismo de defensa natural de la vaca y los recuentos de células aumentan cuando la ubre resulta infectada. El número de células somáticas en una muestra de leche puede estimarse indirectamente mediante un viscosímetro de bola rodante y un contador Coulter.

30 Puesto que la mastitis da como resultado una cantidad y calidad reducidas de la leche y productos de la leche, la mastitis da como resultado pérdidas económicas para el granjero y la industria láctea. Por tanto, la capacidad para determinar la base genética de la resistencia frente a mastitis en un animal bovino es de importancia económica inmensa para la industria láctea, tanto en lo que se refiere a la producción de leche diaria, como también en la gestión de la cría, seleccionando sujetos bovinos con resistencia frente a mastitis. Sería deseable un método para seleccionar genéticamente sujetos bovinos con resistencia mejorada que diera vacas menos propensas a padecer mastitis.

35 Un enfoque para identificar determinantes genéticos para rasgos genéticos es el uso del mapeo del desequilibrio de ligamiento (LD) que tiene como objetivo aprovecharse de recombinantes históricos y se ha demostrado en algunas poblaciones de ganado, incluyendo ganado bovino lechero, que se extiende en segmentos de cromosomas muy largos cuando se compara con las poblaciones humanas (Famir *et al.*, 2000). Una vez mapeado, puede aplicarse de manera útil un locus de rasgos cuantitativos (QTL) en la selección asistida por marcador.

40 *Desequilibrio de ligamiento*

45 El desequilibrio de ligamiento refleja acontecimientos de recombinación que se remontan en la historia y el uso de mapeo del LD dentro de familias aumenta la resolución del mapeo. Existe LD cuando los haplotipos observados en una población no concuerdan con las frecuencias de haplotipo previstas multiplicando la frecuencia de marcadores genéticos individuales en cada haplotipo. Con respecto a esto, el término haplotipo significa un conjunto de marcadores genéticos estrechamente asociados presentes en un cromosoma que tienden a heredarse juntos. Con el fin de que el mapeo del LD sea eficaz, es necesario que la densidad de marcadores genéticos sea compatible con la distancia a través de la cual se extiende el LD en la población dada. En un estudio de LD en una población de ganado bovino lechero usando un alto número de marcadores genéticos (284 marcadores microsátélites autosómicos) se demostró que el LD se extiende varias decenas de centimorgans para los marcadores intracromosómicos (Farnir *et al.* 2000). De manera similar, Georges, M (2000) notificó que la ubicación de un marcador genético que está asociado con un fenotipo particular en ganado normalmente tiene un intervalo de confianza de 20-30 cM (correspondiente a quizá 500-1000 genes) (Georges, M., 2000). La existencia de desequilibrio de ligamiento se tiene en cuenta con el fin de usar mapas de regiones particulares de interés con alta confianza.

En la presente invención se han identificado locis de rasgos cuantitativos asociados a mastitis clínica y/o SCS en el cromosoma bovino BTA9, lo que permite un método para determinar si un sujeto bovino será resistente a mastitis.

Sumario de invención

- 5 Es de interés económico significativo dentro de la industria de ganado bovino poder seleccionar sujetos bovinos con resistencia frente a mastitis aumentada y de ese modo evitar pérdidas económicas en relación con animales que padecen mastitis. La predisposición genética para la resistencia frente a mastitis puede detectarse mediante la presente invención. La presente invención ofrece un método para determinar la resistencia frente a mastitis en un sujeto bovino basándose en marcadores genéticos que están asociados con y/o relacionados con resistencia frente a mastitis.
- 10 Por tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a un método para determinar la resistencia frente a mastitis en un sujeto bovino, que comprende detectar en una muestra de dicho sujeto bovino la presencia o ausencia de al menos un marcador genético que está ligado con al menos un rasgo indicativo de resistencia a mastitis, en el que dicho al menos un marcador genético está ubicado en el cromosoma bovino BTA9 en la región flanqueada por y que incluye los marcadores microsatélites polimórficos C6orf93 e inra084, en el que la presencia o ausencia de dicho al menos un marcador genético es indicativa de resistencia a mastitis de dicho sujeto bovino o descendencia del mismo.
- 15 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al uso de un kit de diagnóstico para detectar la presencia o ausencia en un sujeto bovino de al menos un marcador genético asociado con resistencia frente a mastitis, que comprende al menos una secuencia de oligonucleótidos y combinaciones de las mismas, seleccionándose las secuencias de nucleótidos de cualquiera de SEQ ID NO.: 75 a SEQ ID NO.: 98.
- 20

Descripción de los dibujos

- 25 Figura 1: Exploración de genoma de BTA9 en relación con resistencia a mastitis característica de familias de Roja Danesa. Los números se refieren al "número de libro genealógico". El eje X representa la distancia del cromosoma expresada en Morgan según las posiciones empleadas en este análisis. El eje Y representa los datos estadísticos de prueba del análisis de QTL expresados en el valor de F.
- Figura 2: Exploración de genoma de BTA9 en relación con recuento de células somáticas característico de familias de Roja Danesa. Los números se refieren al "número de libro genealógico". El eje X representa la distancia del cromosoma expresada en Morgan según las posiciones empleadas en este análisis. El eje Y representa los datos estadísticos de prueba del análisis de QTL expresados en el valor de F.
- 30 Figura 3: Exploración de genoma de BTA9 en relación con resistencia a mastitis característica de familias de Ayrshire Finlandesa. Los números se refieren al "número de libro genealógico". El eje X representa la distancia del cromosoma expresada en Morgan según las posiciones empleadas en este análisis. El eje Y representa los datos estadísticos de prueba del análisis de QTL expresados en el valor de F.
- Figura 4: Exploración de genoma de BTA9 en relación con recuento de células somáticas característico de familias de Ayrshire Finlandesa. Los números se refieren al "número de libro genealógico". El eje X representa la distancia del cromosoma expresada en Morgan según las posiciones empleadas en este análisis. El eje Y representa los datos estadísticos de prueba del análisis de QTL expresados en el valor de F.
- 35 Figuras 5a y 5b: Exploración de genoma de BTA9 en relación con resistencia a mastitis característica de familias de Roja y Blanca Sueca. Los números se refieren al "número de libro genealógico". El eje X representa la distancia del cromosoma expresada en Morgan según las posiciones empleadas en este análisis. El eje Y representa los datos estadísticos de prueba del análisis de QTL expresados en el valor de F.
- 40 Figuras 6a y 6b: Exploración de genoma de BTA9 en relación con recuento de células somáticas característico de familias de Roja y Blanca Sueca. Los números se refieren al "número de libro genealógico". El eje X representa la distancia del cromosoma expresada en Morgan según las posiciones empleadas en este análisis. El eje Y representa los datos estadísticos de prueba del análisis de QTL expresados en el valor de F.
- 45 Figura 7: Exploración de genoma de BTA9 en relación con resistencia a mastitis característica de familias de Holstein Danesa. Los números se refieren al "número de libro genealógico". El eje X representa la distancia del cromosoma expresada en Morgan según las posiciones empleadas en este análisis. El eje Y representa los datos estadísticos de prueba del análisis de QTL expresados en el valor de F.
- 50 Figura 8: Exploración de genoma de BTA9 en relación con recuento de células somáticas característico de familias de Holstein Danesa. Los números se refieren al "número de libro genealógico". El eje X representa la distancia del cromosoma expresada en Morgan según las posiciones empleadas en este análisis. El eje Y representa los datos estadísticos de prueba del análisis de QTL expresados en el valor de F.
- Figura 9: Perfil de QTL para el rasgo resistencia a mastitis que muestra un pico de LDLA/LD entre los marcadores

BMS2819 e INRA144 a 74,08 cM en ganado bovino de Roja Danesa. El eje X representa la distancia del cromosoma expresada en Morgan según las posiciones empleadas en este análisis. El eje Y representa los datos estadísticos de prueba de razón de verosimilitud del análisis de QTL.

5 Figura 10: Perfil de QTL para el rasgo recuento de células somáticas que muestra un pico de LDLA entre los marcadores BMS2819 e INRA144 a 74,075 cM en ganado bovino de Roja Danesa. El eje X representa la distancia del cromosoma expresada en Morgan según las posiciones empleadas en este análisis. El eje Y representa los datos estadísticos de prueba de razón de verosimilitud del análisis de QTL.

10 Figura 11: Perfil de QTL para el rasgo resistencia a mastitis que muestra un pico de LDLA entre los marcadores BM4208 e INRA144 en la raza Ayrshire Finlandesa. El eje X representa la distancia del cromosoma expresada en Morgan según las posiciones empleadas en este análisis. El eje Y representa los datos estadísticos de prueba de razón de verosimilitud del análisis de QTL.

15 Figura 12: Perfil de QTL para el rasgo resistencia a mastitis que muestra un pico de LDLA/LD entre los marcadores BMS2819 e INRA144 en ganado bovino de Ayrshire Finlandesa y Roja Danesa combinadas. El eje X representa la distancia del cromosoma expresada en Morgan según las posiciones empleadas en este análisis. El eje Y representa los datos estadísticos de prueba de razón de verosimilitud del análisis de QTL.

Figura 13: Perfil de QTL para el rasgo resistencia a mastitis que muestra un pico de LA a 60 - 80 cM entre los marcadores BMS2819 e INRA144 en ganado bovino de Roja y Blanca Sueca. El eje X representa la distancia del cromosoma expresada en Morgan según las posiciones empleadas en este análisis. El eje Y representa los datos estadísticos de prueba de razón de verosimilitud del análisis de QTL.

20 Figura 14: Perfil de QTL para SCS en ganado bovino de Roja y Blanca Sueca con evidencia de LDLA entre los marcadores BMS2819 e INRA084. El eje X representa la distancia del cromosoma expresada en Morgan según las posiciones empleadas en este análisis. El eje Y representa los datos estadísticos de prueba de razón de verosimilitud del análisis de QTL.

25 Figura 15: Perfil de QTL para el rasgo resistencia a mastitis que muestra un pico de LDLA/LD entre los marcadores BM4208 e INRA144 en análisis combinados de ganado bovino de Ayrshire Finlandesa, Roja Danesa y ganado bovino de Roja y Blanca Sueca. El eje X representa la distancia del cromosoma expresada en Morgan según las posiciones empleadas en este análisis. El eje Y representa los datos estadísticos de prueba de razón de verosimilitud del análisis de QTL.

30 Figura 16: Perfil de QTL para el rasgo resistencia a mastitis en ganado bovino de Holstein Danesa. El eje X representa la distancia del cromosoma expresada en Morgan según las posiciones empleadas en este análisis. El eje Y representa los datos estadísticos de prueba de razón de verosimilitud del análisis de QTL.

Figura 17: El efecto de los haplotipos sobre la resistencia a mastitis a 74,08 cM en Roja Danesa. Los efectos de los haplotipos están en el eje Y y el número de haplotipos está en el eje X. Al principio hay grandes agrupaciones de haplotipos de la madre seguidos por los haplotipos del padre.

35 Figura 18: El efecto de los haplotipos sobre la resistencia a mastitis a 74,08 cM en Ayrshire Finlandesa. Los efectos de los haplotipos están en el eje Y y el número de haplotipos está en el eje X. Al principio hay grandes agrupaciones de haplotipos de la madre seguidos por los haplotipos del padre.

40 Figura 19: El efecto de los haplotipos sobre la resistencia a mastitis a 74,08 cM en Roja Danesa y Ayrshire Finlandesa combinadas. Los efectos de los haplotipos están en el eje Y y el número de haplotipos está en el eje X. Al principio hay grandes agrupaciones de haplotipos de la madre seguidos por los haplotipos del padre.

Figura 20: El efecto de los haplotipos sobre la resistencia a mastitis a 74,08 cM en Roja Danesa, Ayrshire Finlandesa y Roja y Blanca Sueca combinadas. Los efectos de los haplotipos están en el eje Y y el número de haplotipos está en el eje X. Al principio hay grandes agrupaciones de haplotipos de la madre seguidos por los haplotipos del padre.

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención se refiere a determinantes genéticos de resistencia a mastitis en ganado bovino lechero. La aparición de mastitis, tanto mastitis clínica como subclínica implica pérdida económica sustancial para la industria lechera. Por tanto, es de interés económico identificar aquellos sujetos bovinos que tienen una predisposición genética para la resistencia a mastitis. Los sujetos bovinos con una predisposición genética de este tipo son portadores de rasgos deseados, que pueden pasarse a su descendencia.

50 El término "sujeto bovino" se refiere a ganado bovino de cualquier raza y pretende incluir tanto vacas como toros, ya sean animales adultos o recién nacidos. Con este término no se indica ninguna edad particular de los animales. Un ejemplo de un sujeto bovino es un miembro de la raza Holstein. En una realización preferida, el sujeto bovino es un miembro de la población de ganado bovino Holstein-Friesian. En otra realización, el sujeto bovino es un miembro de la población de ganado bovino Holstein Swartbont. En otra realización, el sujeto bovino es un miembro de la

5 población de ganado bovino Holstein Schwarzbunt Alemana. En otra realización, el sujeto bovino es un miembro de la población de ganado bovino Holstein estadounidense. En una realización, el sujeto bovino es un miembro de la raza Roja y Blanca Holstein. En otra realización, el sujeto bovino es un miembro de la población de ganado bovino Holstein Schwarzbunt Alemana. En una realización, el sujeto bovino es un miembro de cualquier familia, que incluye miembros de la raza Holstein. En una realización preferida, el sujeto bovino es un miembro de la población Roja Danesa. En otra realización preferida, el sujeto bovino es un miembro de la población Ayrshire Finlandesa. Aún en otra realización, el sujeto bovino es un miembro de la población Roja y Blanca Sueca. En una realización adicional, el sujeto bovino es un miembro de la población Holstein Danesa. En otra realización, el sujeto bovino es un miembro de la población Roja y Blanca Sueca. Aún en otra realización, el sujeto bovino es un miembro de la población Roja Nórdica.

10 En una realización de la presente invención, el sujeto bovino se selecciona del grupo que consiste en Roja y Blanca Sueca, Roja Danesa, Ayrshire Finlandesa, Holstein-Friesian, Holstein Danesa y Roja Nórdica. En otra realización de la presente invención, el sujeto bovino se selecciona del grupo que consiste en ganado bovino de Ayrshire Finlandesa y Roja y Blanca Sueca. En otra realización de la presente invención, el sujeto bovino se selecciona del grupo que consiste en ganado bovino de Ayrshire Finlandesa y Roja y Blanca Sueca.

15 El término “marcador genético” se refiere a una secuencia de nucleótidos variable (polimorfismo) del ADN en el cromosoma bovino y distingue un alelo de otro. La secuencia de nucleótidos variable puede identificarse mediante métodos conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo mediante el uso de oligonucleótidos específicos en por ejemplo métodos de amplificación y/u observación de una diferencia de tamaño. Sin embargo, la secuencia de nucleótidos variable también puede detectarse mediante secuenciación o por ejemplo análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción. La secuencia de nucleótidos variable puede representarse por una deleción, una inserción, repeticiones y/o una mutación puntual.

20 Un tipo de marcador genético es un marcador microsatélite que está asociado con un locus de rasgos cuantitativos. Los marcadores microsatélites se refieren a secuencias cortas repetidas una tras otra. En las secuencias cortas hay por ejemplo un nucleótido, tal como dos nucleótidos, por ejemplo tres nucleótidos, tal como cuatro nucleótidos, por ejemplo cinco nucleótidos, tal como seis nucleótidos, por ejemplo siete nucleótidos, tal como ocho nucleótidos, por ejemplo nueve nucleótidos, tal como diez nucleótidos. Sin embargo, a veces se producen cambios y el número de repeticiones puede aumentar o disminuir. La definición específica y el locus de los marcadores microsatélites polimórficos pueden encontrarse en el mapa genético de USDA (Kappes *et al.* 1997; o siguiendo el enlace de U.S. Meat Animal Research Center <http://www.marc.usda.gov/>).

25 Se aprecia además que las secuencias de nucleótidos de los marcadores genéticos de la presente invención están asociadas genéticamente a rasgos para la resistencia a mastitis en un sujeto bovino. Por consiguiente, también se entiende que pueden generarse varios marcadores genéticos a partir de la secuencia de nucleótidos de la(s) región/regiones de ADN flanqueadas por y que incluyen los marcadores genéticos según el método de la presente invención.

30 El término “locus de rasgos cuantitativos (QTL)” es una región de ADN que está asociada con un rasgo particular (por ejemplo, altura de planta). Aunque no necesariamente los propios genes, los QTL son extensiones de ADN que están estrechamente asociados con los genes que subyacen al rasgo en cuestión.

35 El término “mastitis” se usa en la presente solicitud para describir tanto la mastitis subclínica caracterizada por ejemplo por puntuación de células somáticas alta (SCS) como la mastitis clínica.

40 Los términos “resistencia a mastitis” y “resistencia frente a mastitis” se usan de manera intercambiable y se refieren al hecho de que algunos sujetos bovinos no son propensos a padecer mastitis como lo son otros sujetos bovinos. Cuando se realizan análisis de varios sujetos bovinos como en la presente invención con el fin de determinar marcadores genéticos que están asociados con resistencia frente a mastitis, los rasgos que implican resistencia frente a mastitis pueden observarse por la presencia o ausencia de marcadores genéticos asociados a la aparición de mastitis clínica y/o mastitis subclínica en los sujetos bovinos analizados. Se entiende que la resistencia a mastitis comprende resistencia a rasgos, que afectan a la salud de la ubre en el sujeto bovino o su descendencia. Por tanto, la resistencia a mastitis de un toro se manifiesta físicamente por su descendencia femenina.

Puntuación para resistencia a mastitis

45 Se puntuaron hijas de toros en cuanto a resistencia a mastitis y SCC. La puntuación de células somáticas (SCS) se definió como la media del valor del recuento de células somáticas transformado en \log^{10} (en 10.000/ml) obtenida del esquema de registro de leche. Se tomó la media a lo largo del periodo de 10 a 180 tras el parto. Se calcularon los valores estimados de cría (EBV) para rasgos de los hijos usando un modelo animal de único rasgo Best Linear Unbiased Prediction (BLUP) (mejor predicción lineal no sesgada) ignorando la estructura de la familia. Estos EBV se usaron en el análisis de QTL. Los registros de hija usados en los rasgos individuales fueron:

Mastitis clínica en Dinamarca: Casos tratados de mastitis clínica en el periodo de -5 a 50 días tras el 1^{er} parto.

Mastitis clínica en Suecia y Finlandia: Casos tratados de mastitis clínica en el periodo de -7 a 150 días tras el 1^{er}

parto.

SCS en Dinamarca: Media de SCS en el periodo de 10-180 días tras el 1^{er} parto.

SCS en Suecia: Media de SCS en el periodo de 10-150 días tras el 1^{er} parto.

SCS en Finlandia: Media de SCS en el periodo de 10-305 días tras el 1^{er} parto.

- 5 En una realización de la presente invención, el método y el kit descritos en el presente documento se refieren a resistencia a mastitis. En otra realización de la presente invención, el método y el kit descritos en el presente documento se refieren a resistencia frente a mastitis clínica. En otra realización, el método y el kit de la presente invención están relacionados con resistencia frente a mastitis subclínica, tal como se detecta mediante recuentos de células somáticas. Aún en otra realización, el método y el kit de la presente invención se refieren principalmente a resistencia frente a mastitis clínica en combinación con resistencia frente a mastitis subclínica tal como se detecta mediante recuentos de células somáticas.

Muestra

- 15 El método según la presente invención incluye analizar una muestra de un sujeto bovino, pudiendo ser dicha muestra cualquier muestra adecuada que pueda proporcionar el material genético bovino para su uso en el método. El material genético bovino, por ejemplo, puede extraerse, aislarse y purificarse si es necesario de una muestra de sangre, una muestra de tejido (por ejemplo bazo, frotis bucal), corte de una superficie corporal (pelos o uñas), leche y/o semen. Las muestras pueden ser frescas o congeladas.

- 20 Los polimorfismos de secuencia de la invención comprenden al menos una diferencia de nucleótido, tal como al menos dos diferencias de nucleótido, por ejemplo al menos tres diferencias de nucleótido, tal como al menos cuatro diferencias de nucleótido, por ejemplo al menos cinco diferencias de nucleótido, tal como al menos seis diferencias de nucleótido, por ejemplo al menos siete diferencias de nucleótido, tal como al menos ocho diferencias de nucleótido, por ejemplo al menos nueve diferencias de nucleótido, tal como 10 diferencias de nucleótido. Las diferencias de nucleótido comprenden diferencias, delección y/o inserción de nucleótido o cualquier combinación de las mismas.

25 Diseño de nietas

- 30 El diseño de nietas incluye analizar datos de marcadores basados en ADN para abuelos que se han usado ampliamente en la cría y para hijos de abuelos, en los que los hijos han producido descendencia. Los datos fenotípicos que van a usarse junto con los datos de marcador de ADN se derivan de las hijas de los hijos. Tales datos fenotípicos podrían ser por ejemplo características de producción de leche, características relacionadas con el parto, calidad de la carne o enfermedad. Un grupo de hijas ha heredado un alelo de su padre, mientras que un segundo grupo de hijas ha heredado el otro alelo de su padre. Comparando los datos de la información de los dos grupos puede determinarse si un fragmento de un cromosoma particular está albergando uno o más genes que afectan al rasgo en cuestión. Puede concluirse si un QTL está presente dentro de este fragmento del cromosoma.

- 35 Un requisito previo de realizar un diseño de nietas es la disponibilidad de datos fenotípicos detallados. En la presente invención, se ha dispuesto de tales datos (<http://www.lr.dk/kvaeg/diverse/principles.pdf>).

QTL es una forma abreviada de locus de rasgos cuantitativos. Los genes que confieren rasgos cuantitativos a un individuo pueden encontrarse de manera indirecta observando fragmentos de cromosomas que actúan como si uno o más gen/genes está(n) ubicado(s) dentro de ese fragmento del cromosoma.

- 40 En contraposición, pueden usarse directamente marcadores de ADN para proporcionar información de los rasgos que pasan de padres a una o más de su descendencia cuando se han determinado varios marcadores de ADN en un cromosoma para uno o ambos progenitores y su descendencia. Los marcadores pueden usarse para calcular la historia genética del cromosoma asociado a los marcadores de ADN.

Marcadores y regiones cromosómicas

BTA es la abreviatura de autosoma de *Bos taurus*.

- 45 Un aspecto de la presente invención se refiere a un método para determinar la resistencia frente a mastitis en un sujeto bovino, que comprende detectar en una muestra de dicho sujeto bovino la presencia o ausencia de al menos un marcador genético que está ligado con al menos un rasgo indicativo de resistencia a mastitis, en el que dicho al menos un marcador genético está ubicado en el cromosoma bovino BTA9 en la región flanqueada por y que incluye los marcadores microsátélites polimórficos C6orf93 e inra084, en el que la presencia o ausencia de dicho al menos un marcador genético es indicativa de resistencia a mastitis de dicho sujeto bovino o descendencia del mismo.

- 50 Debido al concepto de desequilibrio de ligamiento tal como se describe en el presente documento, la presente invención también se refiere a determinar la resistencia frente a mastitis en un sujeto bovino, estando ligado el al menos un marcador genético con un rasgo bovino para resistencia frente a mastitis.

5 Con el fin de determinar la resistencia frente a mastitis en un sujeto bovino, se aprecia que puede emplearse más de un marcador genético en la presente invención. Por ejemplo, el al menos un marcador genético puede ser una combinación de al menos dos o más marcadores genéticos de manera que puede aumentarse la exactitud como al menos tres marcadores genéticos, por ejemplo cuatro marcadores genéticos, tal como al menos cinco marcadores genéticos, por ejemplo seis marcadores genéticos, tal como al menos siete marcadores genéticos, por ejemplo ocho marcadores genéticos, tal como al menos nueve marcadores genéticos, por ejemplo diez marcadores genéticos.

10 El al menos un marcador genético puede estar ubicado en al menos un cromosoma bovino, tal como dos cromosomas, por ejemplo tres cromosomas, tal como cuatro cromosomas, por ejemplo cinco cromosomas y/o tal como seis cromosomas. El al menos un marcador genético puede estar ubicado en el cromosoma bovino 9. Sin embargo, el al menos un marcador genético puede ser una combinación de marcadores ubicados en diferentes cromosomas.

El al menos un marcador genético se selecciona de cualquiera de los marcadores individuales de las tablas mostradas en el presente documento.

15 Según la invención, el al menos un marcador genético está ubicado en el cromosoma bovino BTA9 en la región flanqueada por y que incluye los marcadores c6orf93 e inra084. En una realización de la presente invención, el al menos un marcador genético está ubicado en la región desde aproximadamente 69,35 cM hasta aproximadamente 79,8 cM (según las posiciones empleadas en este análisis) en el cromosoma bovino BTA9. El al menos un marcador genético se selecciona del grupo de marcadores mostrado en la tabla 1.

Tabla 1

Marcador en BTA9	Posición empleada en el análisis (cM)	Posición relativa (cM) http://www.marc.usda.gov/
C6orf93*	69,35	-
DIK4986	69,4	84,258
mm12e6*	69,45	84,258
PEX3*	69,5	-
DEAD21	69,55	-
BMS2251	71,3	86,58
EPM2A*	72,1	
BM7234	72,3	88,136
BM42U8	73,9	90,69
BMS2819	73,95	90,98
INRA144	74,2	90,98
INRA084	74,5	90,98

* indica marcadores que no están enumerados en el mapa de marcadores MARC en BTA9.

20 En otra realización de la invención, el al menos un marcador genético está ubicado en el cromosoma bovino BTA9 en la región flanqueada por y que incluye los marcadores c6orf93 e inra084. En una realización de la presente invención, el al menos un marcador genético está ubicado en la región desde aproximadamente 69,35 cM hasta aproximadamente 74,5 cM (según las posiciones empleadas en este análisis) en el cromosoma bovino BTA9. Según el mapa de marcadores MARC, la posición del marcador genético inra084 es 90,98. El al menos un marcador genético se selecciona del grupo de marcadores mostrado en la tabla 2.

25

Tabla 2

Marcador en BTA9	Posición empleada en el análisis (cM)	Posición relativa (cM) http://www.marc.usda.gov/
C6orf93*	69,35	-
DIK 4986	69,4	84,258
mm12e6*	69,45	84,258
PEX3*	69,5	-
DEAD21	69,55	-
BMS2251	71,3	86,58
EPM2A*	72,1	
BM7234	72,3	88,136
BM4208	73,9	90,69
BMS2819	73,95	90,98
INRA144	74,2	90,98
INRA084	74,5	90,98

* indica marcadores que no están enumerados en el mapa de marcadores MARC en BTA9.

5 En una realización adicional, el al menos un marcador genético está ubicado en el cromosoma bovino BTA9 en la región flanqueada por y que incluye los marcadores bms2251 e inra084. En una realización de la presente invención, el al menos un marcador genético está ubicado en la región desde aproximadamente 71,3 cM hasta aproximadamente 74,5 cM en el cromosoma bovino BTA9 (según las posiciones empleadas en este análisis) y desde aproximadamente 86,58 cM hasta aproximadamente 90,98 cM según el mapa de marcadores MARC. El al menos un marcador genético se selecciona del grupo de marcadores mostrado en la tabla 3.

Tabla 3

Marcador en BTA9	Posición empleada en el análisis (cM)	Posición relativa (cM) http://www.marc.usda.gov/
BMS2251	71,3	86,58
EPM2A*	72,1	
BM7234	72,3	88,136
BM4208	73,9	90,69
BMS2819	73,95	90,98
INRA144	74,2	90,98
INRA084	74,5	90,98

* indica marcadores que no están enumerados en el mapa de marcadores MARC en BTA9.

10 En otra realización, el al menos un marcador genético está ubicado en el cromosoma bovino BTA9 en la región flanqueada por y que incluye los marcadores bms2251 e inra144. En una realización de la presente invención, el al menos un marcador genético está ubicado en la región desde aproximadamente 71,3 cM hasta aproximadamente 74,2 cM en el cromosoma bovino BTA9 (según las posiciones empleadas en este análisis) y desde aproximadamente 86,58 cM hasta aproximadamente 90,98 cM según el mapa de marcadores MARC. El al menos un marcador genético se selecciona del grupo de marcadores mostrado en la tabla 4.

15

Tabla 4

Marcador en BTA9	Posición empleada en el análisis (cM)	Posición relativa (cM) http://www.marc.usda.gov/
BMS2251	71,3	86,58
EPM2A*	72,1	
BM7234	72,3	88,136
BM4208	73,9	90,69
BMS2819	73,95	90,98
INRA144	74,2	90,98

* indica marcadores que no están enumerados en el mapa de marcadores MARC en BTA9.

Aún en otra realización, el al menos un marcador genético está ubicado en el cromosoma bovino BTA9 en la región flanqueada por y que incluye los marcadores bm7234 e inra084. En una realización de la presente invención, el al menos un marcador genético está ubicado en la región desde aproximadamente 72,3 cM hasta aproximadamente 74,5 cM en el cromosoma bovino BTA9 (según las posiciones empleadas en este análisis) y desde

aproximadamente 88,136 cM hasta aproximadamente 90,98 cM según el mapa de marcadores MARC. El al menos un marcador genético se selecciona del grupo de marcadores mostrado en la tabla 5.

Tabla 5

Marcador en BTA9	Posición empleada en el análisis (cM)	Posición relativa (cM) http://www.marc.usda.gov/
BM7234	72,3	88,136
BM4208	73,9	90,69
BMS2819	73,95	90,98
INRA144	74,2	90,98
INRA084	74,5	90,98
* indica marcadores que no están enumerados en el mapa de marcadores MARC en BTA9.		

5 En una realización adicional, el al menos un marcador genético está ubicado en el cromosoma bovino BTA9 en la región flanqueada por y que incluye los marcadores bm7234 e inra144. En una realización de la presente invención, el al menos un marcador genético está ubicado en la región desde aproximadamente 72,3 cM hasta aproximadamente 74,2 cM en el cromosoma bovino BTA9 (según las posiciones empleadas en este análisis) y desde aproximadamente 88,136 cM hasta aproximadamente 90,98 cM según el mapa de marcadores MARC. El al menos un marcador genético se selecciona del grupo de marcadores mostrado en la tabla 6.

10

Tabla 6

Marcador en BTA9	Posición empleada en el análisis (cM)	Posición relativa (cM) http://www.marc.usda.gov/
BM7234	72,3	88,136
BM4208	73,9	90,69
BMS2819	73,95	90,98
INRA144	74,2	90,98
* indica marcadores que no están enumerados en el mapa de marcadores MARC en BTA9.		

Aún en una realización adicional, el al menos un marcador genético está ubicado en el cromosoma bovino BTA9 en la región flanqueada por y que incluye los marcadores bm7234 y bms2819. En una realización de la presente invención, el al menos un marcador genético está ubicado en la región desde aproximadamente 72,3 cM hasta aproximadamente 73,95 cM en el cromosoma bovino BTA9 (según las posiciones empleadas en este análisis) y desde aproximadamente 88,136 cM hasta aproximadamente 90,98 cM según el mapa de marcadores MARC. El al menos un marcador genético se selecciona del grupo de marcadores mostrado en la tabla 7.

15

Tabla 7

Marcador en BTA9	Posición empleada en el análisis (cM)	Posición relativa (cM) http://www.marc.usda.gov/
BM7234	72,3	88,136
BM4208	73,9	90,69
BMS2819	73,95	90,98
* indica marcadores que no están enumerados en el mapa de marcadores MARC en BTA9.		

En otra realización, el al menos un marcador genético está ubicado en el cromosoma bovino BTA9 en la región flanqueada por y que incluye los marcadores bm7234 y bm4208. En una realización de la presente invención, el al menos un marcador genético está ubicado en la región desde aproximadamente 72,3 cM hasta aproximadamente 73,9 cM en el cromosoma bovino BTA9 (según las posiciones empleadas en este análisis) y desde aproximadamente 88,136 cM hasta aproximadamente 90,69 cM según el mapa de marcadores MARC. El al menos un marcador genético se selecciona del grupo de marcadores mostrado en la tabla 8.

20

Tabla 8

Marcador en BTA9	Posición empleada en el análisis (cM)	Posición relativa (cM) http://www.marc.usda.gov/
BM7234	72,3	88,136
BM4208	73,9	90,69
* indica marcadores que no están enumerados en el mapa de marcadores MARC en BTA9.		

5 En una realización adicional, el al menos un marcador genético está ubicado en el cromosoma bovino BTA9 en la región flanqueada por y que incluye los marcadores bms2819 e inra144. En una realización de la presente invención, el al menos un marcador genético está ubicado en la región desde aproximadamente 73,95 cM hasta aproximadamente 74,2 cM en el cromosoma bovino BTA9 (según las posiciones empleadas en este análisis) y desde aproximadamente 90,98 cM hasta aproximadamente 90,98 cM según el mapa de marcadores MARC. El al menos un marcador genético se selecciona del grupo de marcadores mostrado en la tabla 9.

Tabla 9

Marcador en BTA9	Posición empleada en el análisis (cM)	Posición relativa (cM) http://www.marc.usda.gov/
BMS2819	73,95	90,98
INRA144	74,2	90,98
* indica marcadores que no están enumerados en el mapa de marcadores MARC en BTA9.		

10 En otra realización de la presente invención, el al menos un marcador genético está ubicado en el cromosoma bovino BTA9 en la región flanqueada por y que incluye los marcadores bms2819 e inra084. En una realización de la presente invención, el al menos un marcador genético está ubicado en la región desde aproximadamente 73,95 cM hasta aproximadamente 74,5 cM en el cromosoma bovino BTA9 (según las posiciones empleadas en este análisis) y desde aproximadamente 90,98 cM hasta aproximadamente 90,98 cM según el mapa de marcadores MARC. El al menos un marcador genético se selecciona del grupo de marcadores mostrado en la tabla 10.

Tabla 10

Marcador en BTA9	Posición empleada en el análisis (cM)	Posición relativa (cM) http://www.marc.usda.gov/
BMS2819	73,95	90,98
INRA144	74,2	90,98
INRA084	74,5	90,98
* indica marcadores que no están enumerados en el mapa de marcadores MARC en BTA9.		

15 En otra realización de la presente invención, el al menos un marcador genético está ubicado en el cromosoma bovino BTA9 en la región flanqueada por y que incluye los marcadores bm4208 e inra144. En una realización de la presente invención, el al menos un marcador genético está ubicado en la región desde aproximadamente 73,9 cM hasta aproximadamente 74,2 cM en el cromosoma bovino BTA9 (según las posiciones empleadas en este análisis) y desde aproximadamente 90,69 cM hasta aproximadamente 90,98 cM según el mapa de marcadores MARC. El al menos un marcador genético se selecciona del grupo de marcadores mostrado en la tabla 11.

Tabla 11

Marcador en BTA9	Posición empleada en el análisis (cM)	Posición relativa (cM) http://www.marc.usda.gov/
BM4208	73,9	90,69
BMS2819	73,95	90,98
INRA144	74,2	90,98
INRA084	74,5	90,98
* indica marcadores que no están enumerados en el mapa de marcadores MARC en BTA9.		

25 Aún en otra realización de la presente invención, el al menos un marcador genético está ubicado en el cromosoma bovino BTA9 en la región flanqueada por y que incluye los marcadores inra144 e inra084. En una realización de la presente invención, el al menos un marcador genético está ubicado en la región desde aproximadamente 74,2 cM hasta aproximadamente 74,5 cM en el cromosoma bovino BTA9 (según las posiciones empleadas en este análisis) y desde aproximadamente 90,98 cM hasta aproximadamente 90,98 cM según el mapa de marcadores MARC. El al menos un marcador genético se selecciona del grupo de marcadores mostrado en la tabla 12.

Tabla 12

Marcador en BTA9	Posición empleada en el análisis (cM)	Posición relativa (cM) http://www.marc.usda.gov/
INRA144	74,2	90,98
INRA084	74,5	90,98
* indica marcadores que no están enumerados en el mapa de marcadores MARC en BTA9.		

- 5 En una realización adicional, el al menos un marcador genético está ubicado en el cromosoma bovino BTA9 en la región flanqueada por y que incluye los marcadores bms2251 y bm7234. En una realización de la presente invención, el al menos un marcador genético está ubicado en la región desde aproximadamente 71,3 cM hasta aproximadamente 72,3 cM en el cromosoma bovino BTA9 (según las posiciones empleadas en este análisis) y desde aproximadamente 86,58 cM hasta aproximadamente 88,136 cM según el mapa de marcadores MARC. El al menos un marcador genético se selecciona del grupo de marcadores mostrado en la tabla 13.

Tabla 13

Marcador en BTA9	Posición empleada en el análisis (cM)	Posición relativa (cM) http://www.marc.usda.gov/
BMS2251	71,3	86,58
EPM2A*	72,1	
BM7234	72,3	88,136

* indica marcadores que no están enumerados en el mapa de marcadores MARC en BTA9.

- 10 Aún en una realización adicional, el al menos un marcador genético está ubicado en el cromosoma bovino BTA9 en la región flanqueada por y que incluye los marcadores EPM2A y bm7234. En una realización de la presente invención, el al menos un marcador genético está ubicado en la región desde aproximadamente 72,1 cM hasta aproximadamente 72,3 cM en el cromosoma bovino BTA9 (según las posiciones empleadas en este análisis) y para bm7234 aproximadamente a 88,136 cM según el mapa de marcadores MARC. El al menos un marcador genético se selecciona del grupo de marcadores mostrado en la tabla 14.

Tabla 14

Marcador en BTA9	Posición empleada en el análisis (cM)	Posición relativa (cM) http://www.marc.usda.gov/
EPM2A*	72,1	
BM7234	72,3	88,136

* indica marcadores que no están enumerados en el mapa de marcadores MARC en BTA9.

- 15 En una realización de la invención, el al menos un marcador genético está ubicado en el cromosoma bovino BTA9. En una realización, el al menos un marcador genético está ubicado en el cromosoma bovino BTA9 en la región flanqueada por y que incluye los marcadores inra144 y rgs17. En una realización de la presente invención, el al menos un marcador genético está ubicado en la región desde aproximadamente 74,2 cM hasta aproximadamente 79,8 cM (según las posiciones empleadas en este análisis) en el cromosoma bovino BTA9, siendo la posición de inra144 según el mapa de marcadores MARC, 90,98 cM. El al menos un marcador genético se selecciona del grupo de marcadores mostrado en la tabla 15.

Tabla 15

Marcador en BTA9	Posición empleada en el análisis (cM)	Posición relativa (cM) http://www.marc.usda.gov/
INRA144	74,2	90,98
INRA084	74,5	90,98
rgs17*	79,8	-

* indica marcadores que no están enumerados en el mapa de marcadores MARC en BTA9.

- 25 En otra realización de la invención, el al menos un marcador genético está ubicado en el cromosoma bovino BTA9. En una realización, el al menos un marcador genético está ubicado en el cromosoma bovino BTA9 en la región flanqueada por y que incluye los marcadores inra084 y rgs17. En una realización de la presente invención, el al menos un marcador genético está ubicado en la región desde aproximadamente 74,5 cM hasta aproximadamente 79,8 cM (según las posiciones empleadas en este análisis) en el cromosoma bovino BTA9 y siendo la posición de inra084 según el mapa de marcadores MARC, 90,68 cM. El al menos un marcador genético se selecciona del grupo de marcadores mostrado en la tabla 16.

30

Tabla 16

Marcador en BTA9	Posición empleada en el análisis (cM)	Posición relativa (cM) http://www.marc.usda.gov/
INRA084	74,5	90,98
rgs17*	79,8	-

* indica marcadores que no están enumerados en el mapa de marcadores MARC en BTA9.

Cebadores

Los cebadores que pueden usarse según la presente invención se muestran en la tabla 17. Los pares de cebadores especificados en la tabla 17 pueden usarse de manera individual o en combinación con uno o más pares de cebadores de la tabla 17.

- 5 El diseño de tales cebadores o sondas resultará evidente para el experto habitual en biología molecular. Tales cebadores son de cualquier longitud conveniente tal como hasta 50 bases, hasta 40 bases, de manera más conveniente hasta 30 bases de longitud, tal como por ejemplo 8-25 ó 8-15 bases de longitud. En general, tales cebadores comprenderán secuencias de bases completamente complementarias al tipo natural correspondiente o locus variante en la región. Sin embargo, si se requiere, pueden introducirse uno o más apareamientos erróneos, siempre que el poder discriminatorio de la sonda de oligonucleótidos no resulte excesivamente afectado. Los cebadores/sondas de la invención pueden portar una o más etiquetas para facilitar la detección.

En una realización, los cebadores y/o sondas pueden hibridarse con y/o amplificar una subsecuencia que hibrida con un polimorfismo de un solo nucleótido que contiene la secuencia delineada por los marcadores tal como se muestra en el presente documento.

- 15 Las secuencias de nucleótidos del cebador de la invención incluyen además: (a) cualquier secuencia de nucleótidos que se hibrida con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de marcador genético o su secuencia complementaria o productos de ARN en condiciones rigurosas, por ejemplo, hibridación con ADN unida a filtro en 6x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C seguido por uno más lavados en 0,2x SSC/dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,1% a aproximadamente 50-65°C, o (b) en condiciones altamente rigurosas, por ejemplo, hibridación con ácido nucleico unido a filtro en 6x SSC a aproximadamente 45°C seguido por uno o más lavados en 0,1x SSC/SDS al 0,2% a aproximadamente 68°C, o en otras condiciones de hibridación que son evidentes para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel F.M. *et al.*, eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., y John Wiley & sons, Inc., Nueva York, en las págs. 6.3.1-6.3.6 y 2.10.3). Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico que se hibrida con la secuencia de nucleótidos de (a) y (b), anteriores, es una que comprende el complemento de una molécula de ácido nucleico del ADN genómico que comprende la secuencia del marcador genético o una secuencia complementaria o producto de ARN de la misma.

- 25 Entre las moléculas de ácido nucleico de la invención están desoxioligonucleótidos ("oligos") que se hibridan en condiciones altamente rigurosas o rigurosas con las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente. En general, para sondas de entre 14 y 70 nucleótidos de longitud, la temperatura de fusión (Tf) se calcula usando la fórmula:

$$Tf (^{\circ}C) = 81,5 + 16,6 (\log[\text{cationes monovalentes (molar)}]) + 0,41 (\% \text{ de G + C}) - (500/N)$$

- 35 siendo N la longitud de la sonda. Si la hibridación se lleva a cabo en una disolución que contiene formamida, la temperatura de fusión se calcula usando la ecuación $Tf(^{\circ}C) = 81,5 + 16,6 (\log[\text{cationes monovalentes (molar)}]) + 0,41 (\% \text{ de G + C}) - (0,61\% \text{ de formamida}) - (500/N)$, siendo N la longitud de la sonda. En general, la hibridación se lleva a cabo aproximadamente a 20-25 grados por debajo de Tf (para híbridos ADN-ADN) o a 10-15 grados por debajo de Tf (para híbridos ARN-ADN).

- 40 Condiciones altamente rigurosas a modo de ejemplo pueden referirse, por ejemplo, a lavar en 6x SSC/pirofosfato de sodio al 0,05% a 37°C (para oligos de aproximadamente 14 bases), 48°C (para oligos de aproximadamente 17 bases), 55°C (para oligos de aproximadamente 20 bases) y 60°C (para oligos de aproximadamente 23 bases).

Por consiguiente, la invención proporciona además sondas o cebadores de nucleótidos que detectan los polimorfismos de la invención. La evaluación puede realizarse por medio de al menos una sonda o cebador de ácido nucleico, tal como una sonda o cebador de ADN, ARN o un análogo de ácido nucleico tal como ácido nucleico peptídico (PNA) o ácido nucleico bloqueado (LNA).

- 45 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una sonda de oligonucleótido específica de alelo que puede detectar un polimorfismo en una o más de las posiciones en las regiones delineadas.

La sonda de oligonucleótido específica de alelo tiene preferiblemente 5-50 nucleótidos, de manera más preferible aproximadamente 5-35 nucleótidos, de manera más preferible aproximadamente 5-30 nucleótidos, más preferiblemente al menos 9 nucleótidos.

- 50 Determinación de ligamiento

Con el fin de detectar si el marcador genético está presente en el material genético, pueden aplicarse métodos convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo mediante el uso de amplificación de ácidos nucleicos. Con el fin de determinar si el marcador genético está ligado genéticamente a rasgos de resistencia a mastitis, puede aplicarse una prueba de permutación (Doerge y Churchill, 1996) o puede aplicarse el método de Piepho (Piepho, 2001). El principio de la prueba de permutación está bien descrito por Doerge y Churchill (1996),

- 55

- mientras que el método de Piepho está bien descrito por Piepho (2001). Se realizó un ligamiento significativo en el análisis dentro de una familia usando el método de regresión, unas 10000 permutaciones, usando la prueba de permutación (Doerge y Churchill, 1996). Se consideró que un umbral en el nivel de amplitud del 5% del cromosoma era una evidencia significativa para el ligamiento entre el marcador genético y los rasgos de resistencia a mastitis y recuento de células somáticas. Además, se confirmó el QTL en diferentes familias de padres. Para el análisis a través de las familias y el análisis de múltiples rasgos con el método de componentes de varianza, se usó el método de Piepho para determinar el nivel de significación (Piepho, 2001). Se consideró que un umbral en el nivel amplio del 5% de cromosomas era una evidencia significativa para el ligamiento entre el marcador genético y los rasgos de resistencia a mastitis y recuento de células somáticas.
- 5
- 10 **Kit**
- Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un kit de diagnóstico para detectar la presencia o ausencia en un sujeto bovino de al menos un marcador genético asociado con resistencia frente a mastitis, que comprende al menos una secuencia de oligonucleótidos y combinaciones de las mismas, seleccionándose las secuencias de nucleótidos de cualquiera de SEQ ID NO.: 75 a SEQ ID NO.: 98.
- 15
- 20 La obtención del genotipo de un sujeto bovino con el fin de establecer los determinantes genéticos de resistencia frente a mastitis para ese sujeto según la presente invención puede basarse en el análisis del ADN y/o el ARN. Un ejemplo es el ADN genómico que puede proporcionarse usando el métodos de extracción de ADN convencionales tal como se describe en el presente documento. El ADN genómico puede aislarse y amplificarse usando técnicas convencionales tales como la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores de oligonucleótido correspondientes (complementarios) a las regiones de marcador polimórfico. Pueden incluirse etapas adicionales de purificación del ADN antes de la reacción de amplificación. Por tanto, un kit de diagnóstico para establecer características de resistencia a mastitis y recuento de células somáticas comprende, en un envase separado, al menos una secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo de secuencias mostrado en la tabla 17 y cualquier combinación de las mismas.
- 25 **Ejemplos- BTA9**
- Animales
- El material animal consiste en un diseño de nietas con 39 familias paternas de padres, siendo el número total de hijos sometidos a prueba de descendencia de 1513 procedentes de cuatro razas de ganado bovino lechero concretamente Holstein Danesa (DH) y Roja Danesa (DR), Ayrshire Finlandesa (FA) y Roja y Blanca Sueca (SRB). Estas 39 familias consisten en 5 familias de abuelos DH, 9 DR, 11 FA y 14 SRB. El número de hijos por abuelo osciló entre 16 y 161, con un tamaño de familia promedio de 38,8.
- 30
- Purificación de ADN genómico
- Se purificó ADN genómico de semen según el siguiente protocolo. Tras descongelar la pipeta de semen, se cortaron ambos extremos de la pipeta con un par de tijeras y se transfirió el contenido de semen a un tubo eppendorf de 1,5 ml. Se usó 1 ml de NaCl al 0,9% para lavar la pipeta dentro del tubo. Entonces se centrifugó el tubo durante 5 minutos a 2000 rpm, seguido por eliminación del sobrenadante. Se repitió esta etapa de lavado dos veces. Entonces, se añadieron al tubo 300 µl de tampón S (Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM pH 8; SDS al 0,5%), 20 µl de DTT 1 M y 20 µl de pronasa (20 mg/ml) (Boehringer). Tras mezclar, se incuban los tubos durante la noche con rotación lenta tras lo cual se añaden 180 µl de NaCl saturado seguido por agitación vigorosa durante 15 segundos. Entonces se centrifuga el tubo durante 15 minutos a 11000 rpm. Se transfieren 0,4 ml del sobrenadante a un tubo de 2 ml y se añade 1 ml de etanol al 96%, se logra el mezclado mediante rotación lenta del tubo. Entonces se centrifuga el tubo durante 10 minutos a 11000 rpm. Se elimina el sobrenadante vertiendo el líquido, se lava el sedimento con etanol al 70% (0,2 ml) y se centrifuga de nuevo durante 10 minutos a 11000 rpm. Se vierte el etanol, se seca el sedimento y se resuspende en 0,5 ml de tampón TE) durante 30 minutos a 55°C.
- 35
- 40
- 45 **Procedimientos de amplificación**
- Se realizaron reacciones de PCR en un volumen de 8 µl usando polimerasa TEMPasa (GeneChoice) y tampón de reacción I tal como lo proporciona el proveedor (GeneChoice). Habitualmente, se incluyen 5 marcadores diferentes en cada PCR múltiple, 1 µl de ADN, 0,1 µl de enzima TEMPasa, dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 1,2 mM, 0,3 µM de cada cebador.
- 50
- 55 Se sometieron las mezclas de PCR a desnaturalización inicial a 94°C durante 15 min. (para TEMPasa). Posteriormente, se sometieron a ciclos durante 10 ciclos con rampa decreciente de temperaturas ("touchdown"), es decir la temperatura se disminuyó 1°C en cada ciclo (desnaturalización a 94°C 30", apareamiento a 67°C 45", elongación a 72°C 30"), tras lo cual se sometieron a ciclos las muestras durante 20 ciclos con condiciones de PCR normales (desnaturalización a 94°C 30", apareamiento a 58°C 45", elongación a 72°C 30"). Los ciclos de PCR se terminaron con 1 ciclo a 72°C 30" y se programó la máquina de PCR para enfriar las muestras a 4°C indefinidamente.

La secuencia de nucleótidos de los cebadores usada para detectar los marcadores se muestra en la tabla 17. La secuencia de nucleótidos se enumera desde el extremo 5'.

Tabla 17

Nombre del marcador	Cebador directo F	SEQ ID NO.:
	Cebador inverso R	
BTA9: C6orf93	F CTCGGTGATGTTTTGCTGA R CGCCCCAGCTCTTTCTAGTT	SEQ ID NO.: 75 SEQ ID NO.: 76
DIK 4986	F GGGATGAACATTGAGGGTTG R CATGATCAAGATGGGGGAAG	SEQ ID NO.: 77 SEQ ID NO.: 78
Mm12e6	F CAAGACAGGTGTTTCAATCT R ATCGACTCTGGGGGATGATGT	SEQ ID NO.: 79 SEQ ID NO.: 80
PEX3	F TTTTGCAGTCCAGTTAAACA R GGAAAAGCCAGAGCAAATG	SEQ ID NO.: 81 SEQ ID NO.: 82
DEADC1	F TTCCTAGGCCTGTGCTCATT R TGGACCAGGCATAAGGATTT	SEQ ID NO.: 83 SEQ ID NO.: 84
BMS2251	F AACGGCTTTCACTTTCTTGC R CTGGGTGAACAAATGGGC	SEQ ID NO.: 85 SEQ ID NO.: 86
EPM2A	F GCGGCCGCGTTGAGAG R TTCCACTTTATGATGAGCAGGTTC	SEQ ID NO.: 87 SEQ ID NO.: 88
BM7234	F TTCACTGATTGTCATTCCCTAGA R TAAGCAAATAAATGGTGCTAGTCA	SEQ ID NO.: 89 SEQ ID NO.: 90
BM4208	F TCAGTACACTGGCCACCATG R CACTGCATGCTTTTCCAAC	SEQ ID NO.: 91 SEQ ID NO.: 92
BMS2819	F GCTCACAGTTCTGAGGACTC R AACTTGAAGAAGGAATGCTGAG	SEQ ID NO.: 93 SEQ ID NO.: 94
INRA144	F TCGGTGTGGGAGGTGACTACAT R TGCTGGTGGGCTCCGTCACC	SEQ ID NO.: 95 SEQ ID NO.: 96
INRA084	F CTAAGCTTTCCTCCATCTC R CCTGGTGATGTTTGGATGTC	SEQ ID NO.: 97 SEQ ID NO.: 98

Marcadores y mapa

- 5 Para BTA9 en el presente estudio, se eligieron 45 marcadores microsatélites del sitio web del Meat Animal Research Center (www.marc.usda.gov/genome/genome.html). Puesto que BTA9 es ortólogo a HSA6q, se eligieron 28 genes y EST publicados a lo largo de HSA6q (*Ctcf*, *Vip*, *Vil2*, *Rgs17*, *Ros1*, *Slc16a10*, *Oprm*, *igf2r*, *Esr1*, *Deadc1*, *Pex3*, *C6orf93*, *Ifrgr1*, *Shprh*, *Epm2a*, *AK094944*, *AK094379*, *Utm*, *Tnf*, *plg*, *arid1b*, *lama4*; *hivep2*, *C6orf055*, *CITED2*, *RP1-172K10*, *ALG1*, *GRM*) para selección de SNP y microsatélites. También se obtuvo el genotipo de ocho de los nuevos marcadores microsatélites identificados en el presente estudio y de 29 SNP a través del árbol genealógico con el fin de crear un mapa denso de BTA9 mediante análisis de ligamiento.

Información de panel de híbridos de radiación (RH)

- 15 Se diseñaron pares de cebadores específicos a partir de secuencias bovinas para mapear los genes y microsatélites incluyendo microsatélites de MARC. A lo largo del cromosoma 9, se usó un total de más de 120 marcadores en el panel de RH de ganado bovino. 65 genes y 34 microsatélites mostraron una amplificación satisfactoria, bandas con el tamaño apropiado en el ADN bovino y ausencia de amplificación en ADN de hámster. Se tipificaron en el panel de RH bovino panel Rostin/Cambridge de 3000 rad (Williams *et al.* 2002).

- 20 Se realizaron amplificaciones mediante PCR en un volumen total de 20 µl que contenía 25 ng del ADN de la línea celular de RH, 0,5 µM de cada cebador, dNTP 200 µM, MgCl₂ 3 mM, 0,5 U de Taq polimerasa (BIOLine). Las condiciones de reacción fueron una rampa decreciente de temperaturas comenzando con 94°C durante 3 min. seguido por 40 ciclos de 93°C durante 30 s, rampa decreciente de temperaturas de 65-45°C durante 30 s, disminuyendo 0,5°C por ciclo y 72°C durante 1 min., con una etapa de extensión final de 72°C durante 5 min. Se sometieron a electroforesis las reacciones de PCR: se cargaron 10 µl del producto de PCR en minigeles teñidos con bromuro de etidio (agarosa al 2,5%) y dos observadores independientes puntuaron la presencia o ausencia de amplicones. Cuando hubo varias discrepancias entre los patrones de los duplicados o entre las puntuaciones de los diferentes observadores, se repitieron los geles y las reacciones de PCR. Se desecharon los marcadores cuando los resultados de varios híbridos permanecieron ambiguos.

- 30 Se asignaron marcadores al cromosoma bovino llevando a cabo un análisis de ligamiento de 2 puntos usando el software RHMAPP (Soderlund *et al.*, 1998) frente a marcadores con asignaciones conocidas que se habían tipificado previamente en el panel WGRH bovino (Williams *et al.*, 2002). Entonces se construyó el mapa de RH usando el software Carthegene (Schiex., 2002) tal como describió Williams *et al.* (2002). En el cromosoma bovino 9,

hay información de un mapa de híbridos de radiación con 150 marcadores.

Se estimaron el orden de los marcadores y las distancias de mapa usando el software CRIMAP 2.4 (Green *et al.* 1990). Para construir el mapa de ligamientos se comenzó a colocar los marcadores microsatélites siguiendo el orden del mapa MARC. A continuación, se ejecutó una opción BUILD de CRIMAP para colocar los marcadores restantes, los marcadores de SNP y microsatélites nuevos se han insertado en la posición con la mayor verosimilitud. Se ha tenido en cuenta información de MARC (www.marc.usda.gov/genome/genome.html), Ensembl (http://www.ensembl.org/Bos_taurus/index.html) e híbridos de radiación (RH) para reconsiderar ese emplazamiento de los marcadores. El mapa de ligamientos final usado del mapeo de QTL de BTA9 según la presente invención incluye 59 marcadores tal como se enumera en la tabla 18.

- 5
- 10 La siguiente tabla muestra marcadores usados para el QTL relevante. Puede encontrarse cualquier información adicional sobre los marcadores en “<http://www.marc.usda.gov/>”, http://www.ensembl.org/Bos_taurus/index.html y “<http://www.ncbi.nih.gov/>”.

Tabla 18

Marcador en BTA9	Posición empleada en el análisis (cM)	Posición relativa (cM) http://www.marc.usda.gov/
BMS2151	0	4,892
ETH225	7,4	12,754
BM2504	25,3	30,92
DIK2892	25,35	30,92
DIK 3002	32,7	36,542
DIK 3003	32,75	36,542
RM216	32,8	37,087
BMS817	36,6	42,489
BMS555	37,4	43,818
lama4*	37,6	-
DIK 5142	37,75	43,818
slc16a10*	37,78	-
DIK 4268	37,81	45,152
DIK 4950	37,84	45,152
CSSM025	37,87	45,739
DIK 2810	37,9	45,739
DIK 5364	38,2	45,739
DIK 2741	39,75	49,659
TGLA261	39,8	49,659
ILSTS013*	39,85	-
UWCA9	39,9	49,996
BMS1148	39,95	50,923
DIK 4912	42,45	51,855
DIK 5130	42,5	52,296
DIK 2303	42,55	52,352
DIK 4720	43,3	53,966
BM4204	45,1	55,414
DIK 4926	47,6	57,088
BMS1909	49,8	59,516
BMS1290	53,8	64,935
TGLA73	63,3	77,554
BMS2753	65,4	79,249
TNF*	65,45	-
BMS1724	67,15	80,265
DIK 2145	67,2	80,265
BM7209	67,6	81,569
SLU2	68,8	-
C6orf93*	69,35	-
DIK 4986	69,4	84,258
mm12e6*	69,45	84,258
PEX3*	69,5	-
DEADC1	69,55	-
BMS2251	71,3	86,58
EPM2A*	72,1	

BM7234	72,3	88,136
BM4208	73,9	90,69
BMS2819	73,95	90,98
INRA144	74,2	90,98
INRA084	74,5	90,98
rgs17*	79,8	-
ESR1*	79,85	-
BMS2295	82,2	98,646
BM3215	83,2	101,647
bvil203*	86,5	-
Aridlb*	86,6	-
Plg*	89,4	-
igfsnp123*	89,45	-
BMS1943	92,5	103,708
BMS1967	97,7	109,287

* estos marcadores no están enumerados en el mapa de marcadores MARC en BTA9.

Datos fenotípicos

5 Se puntuaron hijas de toros en cuanto a resistencia a mastitis y SCS. Se calcularon los valores estimados de cría (EBV) para rasgos de los hijos usando un modelo animal de único rasgo Best Linear Unbiased Prediction (BLUP) (mejor predicción lineal no sesgada) ignorando la estructura de la familia. Estos EBV se usaron en el análisis de QTL. Los registros de hija usados en los rasgos individuales fueron:

Mastitis clínica en Dinamarca: Casos tratados de mastitis clínica en el periodo de -5 a 50 días tras el 1^{er} parto.

Mastitis clínica en Suecia y Finlandia: Casos tratados de mastitis clínica en el periodo de -7 a 150 días tras el 1^{er} parto.

SCS en Dinamarca: Media de SCS en el periodo de 10-180 días tras el 1^{er} parto.

10 SCS en Suecia: Media de SCS en el periodo de 10-150 días tras el 1^{er} parto.

SCS en Finlandia: Media de SCS en el periodo de 10-305 días tras el 1^{er} parto.

Análisis estadístico

Se usaron varios métodos estadísticos tal como se describe a continuación en la determinación de marcadores genéticos asociados o ligados a mastitis y por tanto a resistencia a mastitis.

15 Análisis de QTL

20 Se usa el análisis de ligamiento (LA) para identificar QTL mediante tipificación de marcadores genéticos en familias para regiones de cromosoma que están asociadas con valores de rasgo o enfermedad dentro de árboles genealógicos más frecuentes de los esperados por casualidad. Es más probable que tales regiones ligadas contengan una variante genética causal. Se analizaron los datos con una serie de modelos. Inicialmente, se analizó un modelo de único rasgo usando un enfoque de regresión de múltiples puntos para todos los rasgos dentro de una familia. Se analizaron los cromosomas con efectos significativos dentro de las familias con el método de componentes de varianza para validar el QTL encontrado a través de las familias y para la caracterización de QTL.

Análisis de regresión

25 Se estimaron las frecuencias de alelos de la población en los marcadores usando un algoritmo EM. Posteriormente se supuso que se conocían todas las frecuencias de alelo sin error. Se determinó la fase en los padres basándose en los tipos de marcador de la descendencia. Posteriormente, se supuso que se conocía esta fase sin error. Se calcularon las probabilidades de segregación en cada posición del mapa usando información de todos los marcadores en el cromosoma simultáneamente usando la función de mapeo de Haldane (Haldane, 1919). Se sometieron a regresión los fenotipos sobre las probabilidades de segregación. Se calcularon los umbrales de significación usando pruebas de permutación (Churchill y Doerge, 1994).

Método de componentes de varianza

35 Se llevó a cabo el análisis de ligamiento a través de las familias usando el método basado en componentes de varianza (VC) (Sørensen *et al.*, 2003). En el LA con VC, se supone que las probabilidades de identidad por descendencia (IBD) entre alelos de QTL de cualquiera de dos haplotipos fundadores (Hs y Hm) es cero, es decir, los haplotipos fundadores no estaban relacionados (Meuwissen *et al.* 2002). Los haplotipos del padre y los haplotipos heredados del padre de los hijos se usan para calcular la probabilidad de heredar el alelo de QTL paterno o materno

del padre (Freyer *et al.* 2004) y se calcula la matriz de IBD usando un algoritmo recursivo (Wang *et al.*, 1995). Se calcularon las matrices de IBD en el punto medio de cada intervalo de marcadores a lo largo del cromosoma y se usaron en el procedimiento posterior de estimación de componentes de varianza. La fracción de la varianza genética aditiva total explicada mediante el QTL se estimó como $2\sigma_h^2 / (2\sigma_h^2 + \sigma_u^2)$ donde $2\sigma_h^2$ y σ_u^2 corresponden respectivamente a los componentes de varianza asociados con el efecto de los haplotipos y el efecto poligénico aditivo.

Análisis de componentes de varianza. Único análisis de QTL de único rasgo.

Se analizó cada rasgo por separado usando un análisis de ligamiento. El modelo completo puede expresarse como:

$$y = X\beta + Zu + Wq + e, \quad (1)$$

donde y es un vector de n EBV, X es una matriz de diseño conocido, β es un vector de efectos fijos desconocidos, que en este caso sólo es la media, Z es una matriz relacionada con los individuos, u es un vector de efectos poligénicos aditivos, W es una matriz conocida que relaciona cada registro individual con su efecto de QTL aditivo conocido, q es un vector de efectos de QTL aditivos desconocidos de los individuos y e es un vector de efectos residuales. Se supone que las variables aleatorias u , q y e son múltiples variables normalmente distribuidas e independientes entre sí (Lund *et al.*, 2003).

Análisis de múltiples QTL de múltiples rasgos

Se realizó un análisis de múltiples rasgos. El modelo (1) puede ampliarse a un modelo de múltiples QTL de múltiples rasgos tal como se describe en el modelo (2) según Lund *et al.*, 2003.

Se modelan los rasgos usando el siguiente modelo mixto lineal con n_q QTL:

$$y = \mu + Za + \sum_{i=1}^{n_q} Wh_i + e, \quad (2)$$

donde y es un vector de observaciones para n hijos registrados en t rasgos, μ es un vector de medias globales de rasgos, Z y W son matrices conocidas que asocian las observaciones de cada hijo con sus efectos de QTL y poligénicos, a es un vector de efectos poligénicos de padres y sus hijos, h_i es un vector de efectos de haplotipos de QTL de padres y sus hijos para el QTL i ésimo y e es un vector de efectos residuales. Se supone que las variables aleatorias a , h_i y e son múltiples variables distribuidas normalmente (MVN) y no correlacionadas entre sí. Específicamente, a es MVN ($0, G \otimes A$), h_i es MVN ($0, K_i \otimes IBD_i$) y e es MVN ($0, E \otimes I$). Las matrices G , K y E incluyen varianzas y covarianzas entre los rasgos debido a efectos poligénicos, efectos de QTL y efectos residuales. El símbolo \otimes representa el producto de Kronecker. A es la matriz de relación aditiva que describe la estructura de covarianza entre los efectos poligénicos, IBD_i es la matriz de identidad por descendencia (IBD) que describe la estructura de covarianza entre los efectos para el QTL i ésimo e I es la matriz de identidad.

Análisis combinado de ligamiento y desequilibrio de ligamiento

En el análisis combinado de ligamiento y desequilibrio de ligamiento, se calcularon las probabilidades de IBD entre alelos de QTL de cualquiera de dos haplotipos fundadores usando el método descrito por Meuwissen y Goddard (2001). Este método aproxima la probabilidad de que los dos haplotipos sean IBD en un supuesto QTL dependiente del estado de identidad por estado (IBS) de marcadores flanqueantes, partiendo de la base de la teoría de coalescencia (Hudson, 1985). Brevemente, la probabilidad de IBD en el QTL se basa en la similitud de los haplotipos marcadores que rodean a los alelos que rodean la posición: es decir, muchos alelos de marcador (no) idénticos cerca de la posición implican alta (baja) probabilidad de IBD en la posición del mapa. El nivel real de probabilidades de IBD resulta afectado por el tamaño de población eficaz, N_e . La probabilidad de coalescencia entre la generación de base actual y una arbitraria, generaciones de T_g se calcula dados los alelos de marcador que tienen en común ambos haplotipos (Hudson, 1985). No es fácil estimar T_g y N_e a partir de los datos observados. Estudios de simulación muestran que la estimación de la posición de QTL es relativamente insensible para elegir N_e y T_g (Meuwissen y Goddard, 2000). Por tanto, se usaron los valores de $T_g = 100$ y $N_e = 100$. Se consideraron intervalos de 10 marcadores para calcular las probabilidades de IBD. También se usó un intervalo de 4 marcadores para calcular las probabilidades de IBD en el área del pico de LDLA para examinar si 4 marcadores eran suficientes para reproducir el pico ya identificado por haplotipos de 10 marcadores. Se agruparon los haplotipos fundadores en agrupaciones funcionalmente distintas. Se usó $(1-IBD_{ij})$ como una medida de la distancia y se aplicó el ligamiento promedio del algoritmo de agrupación jerárquica para generar un dendrograma enraizado que representa la relación genética entre todos los haplotipos fundadores. El árbol se analiza de manera descendente desde la raíz y se cortan las ramas hasta que se alcanzan nudos, de manera que todos los haplotipos que coalescen tienen una medida de distancia $(1-IBD_{ij}) < T_c$. Una agrupación se define como un grupo de haplotipos que coalescen en un nudo común. Se supone que los haplotipos dentro de una agrupación portan un alelo de QTL idéntico (probabilidad de IBD = 1,0) mientras que los haplotipos de diferentes agrupaciones portan distintos alelos de QTL y por tanto se considera que son independientes (probabilidad de IBD = 0). Por tanto, la parte superior de la matriz de IBD que corresponde a la

información de desequilibrio de ligamiento es una matriz de identidad que corresponde a los distintos haplotipos fundadores. La parte inferior de la matriz de IBD que corresponde a la información de ligamiento en los haplotipos paternos de los hijos se construye usando un algoritmo recursivo (Wang *et al.*, 1995). Se calcularon las matrices de IBD en los puntos medios de cada intervalo de marcadores y se usaron en el procedimiento de estimación de componentes de varianza posterior.

Estimación de parámetros

Los componentes de varianza se estimaron usando el algoritmo de máxima verosimilitud restringida de información promedio (Jensen *et al.*, 1997). Se maximizó la verosimilitud restringida con respecto a los componentes de varianza asociados con los efectos aleatorios del modelo. La maximización de una secuencia de verosimilitudes restringidas a lo largo de red de posiciones específicas da un perfil de la verosimilitud restringida de la posición de QTL (Sørensen *et al.*, 2003). Se estimaron los parámetros en el punto medio de cada intervalo de marcadores a lo largo del cromosoma.

Nivel de significación

Se calcularon los umbrales de significación para los análisis de componentes de varianza usando un método rápido para calcular niveles de umbral aproximados que controlan el error de tipo I por genoma (Piepho, 2001). Las pruebas de hipótesis para determinar la presencia de QTL se basaron en la distribución asintótica del dato estadístico de prueba de razón de verosimilitud (LRT), $LRT = -2\ln(L_{reducida} - L_{completa})$, donde $L_{reducida}$ y $L_{completa}$ fueron las verosimilitudes maximizadas según el modelo reducido y el modelo completo, respectivamente. El modelo reducido siempre excluyó el efecto de QTL para el cromosoma que está analizándose. Este método es una alternativa a los procedimientos de permutación y puede aplicarse en situaciones complejas. Requiere la LRT de cada una de las supuestas posiciones de QTL a lo largo del cromosoma, el número de cromosomas, los grados de libertad (df) para la LRT (df = número de parámetros de $H_{completo}$ - número de parámetros de $H_{reducido}$), y la tasa de error de tipo I por cromosoma. Se consideró que un nivel de significación del 5% por cromosoma era significativo.

Resultados de BTA9

En la tabla 19 se presentan los resultados del análisis de regresión para BTA9. Las figuras 1 a 8 presentan los gráficos de QTL para el análisis de regresión. Se usó el método de componentes de varianza para detectar QTL mediante el análisis de QTL a través de las familias. Las figuras 9 a 16 presentan el perfil de LD, LDLA y LD para el QTL en un método basado en componentes de varianza. Las figuras 17 a 20 presentan los efectos de los haplotipos.

Roja Danesa

Dentro de una familia, el análisis de regresión reveló que QTL para CM y SCS se segregan en dos familias en la raza DR. Los QTL para dos rasgos no se ubicaban en el mismo intervalo. En el análisis de ligamiento a través de las familias usando el método de VC, los efectos de QTL no fueron significativos. Con los análisis de LDLA y LD, se observaron picos de QTL altos a 74,08 cM entre los marcadores BMS2819 e inra144. La LRT pico en el análisis de LD (13,6) fue superior que la LRT pico (8,51) observada en el análisis combinado de LDLA. Este QTL explicó el 44% y el 22% de la varianza genética aditiva y la varianza genotípica para CM, respectivamente. Por defecto, se usaron 10 haplotipos marcadores (cinco marcadores en cada lado de la posición supuesta) para estimar la probabilidad de IBD de una ubicación. También se usaron 4 haplotipos marcadores, es decir 2 marcadores en cada lado de la posición supuesta y se observaron picos de LDLA/LD similares dentro de esos cuatro haplotipos marcadores (BM4208-BMS2819-INRA144-INRA084). También se observó un pico combinado de LDLA para SCS dentro de esos 4 intervalos de marcadores en esta raza.

Se agruparon juntos los haplotipos de la madre con probabilidad de IBD de 0,90 o mayor. Había 305 haplotipos fundadores en DR antes de la agrupación que se redujeron a 54 agrupaciones tras la agrupación. Cinco agrupaciones tenían una frecuencia superior al 5% y la agrupación más grande tenía una frecuencia del 10% y también se agruparon cinco haplotipos del padre con la agrupación más grande. Se estimaron los efectos de los haplotipos para esos 54 haplotipos y también los haplotipos recibidos de los padres. Se identificaron los haplotipos asociados con alta y baja resistencia a mastitis.

Ayrshire Finlandesa

Los QTL que afectan a CM y SCS se encontraron segregando cuando se realizó un análisis de regresión dentro de una familia en las familias de Ayrshire finlandesa. Se ubicó el QTL para CM en el intervalo de 58 a 79 cM. Se ubicó el QTL que afecta a SCS entre 32 y 44 cM con los datos estadísticos de LRT pico a 37 cM. Se observó el pico combinado de LDLA para QTL de CM a lo largo del perfil de LA dentro de los marcadores BM4208-BMS2819-INRA144. También se observó el pico de LD en la misma región para CM. Se observó un pico de LDLA para SC a lo largo del perfil de LA a 38 cM entre los marcadores DIK2810 y DIK5364. El cuatro por ciento de la varianza total en CM se explicó por el QTL a 74 cM y este QTL no mostró ningún efecto sobre SCS en FA. El QTL a 38 cM explicó el 18% de la varianza total en SCS y tuvo muy poco efecto sobre CM. En el pico de LDLA mayor en CM, es decir en el intervalo medio entre los marcadores BM4208 y BMS2819, 442 haplotipos fundadores se agruparon en 38 agrupaciones cuando se aplicó la probabilidad de agrupación de 0,90. Hubo nueve agrupaciones con frecuencia

superior al 5%. La agrupación más grande tenía una frecuencia del 14%. Se identificaron los haplotipos asociados con alta y baja resistencia a mastitis.

Roja y Blanca Sueca

5 De manera similar al ganado bovino de DR y FA, también se observó QTL que afectaba a CM y SCS segregando en BTA9 en ganado bovino de Roja y Blanca Sueca cuando se realizaron análisis de regresión dentro de una familia. Tanto el QTL para CM como para SCS se ubicaron en el mismo intervalo. El QTL de CM fue significativo ($P < 0,01$) en el análisis de LA a través de las familias. El QTL de SCS no fue significativo en el análisis de LA a través de las familias. La LRT pico para SCS estaba a 73 cM. Los datos estadísticos de prueba pico para QTL de CM en el análisis a través de las familias estaba a 67,4 cM, estando el intervalo de QTL entre 59 y 81 cM. Aunque los datos estadísticos de LRT fueron altamente significativos en el análisis de LA a través de las familias, no se observó ningún pico de LDLA a lo largo del perfil de LA para este QTL en ganado bovino de SRB. En la ubicación de los datos estadísticos de LRT pico en el análisis de LA, la varianza de QTL fue un 25% de la varianza total del rasgo CM. Los picos de LDLA para QTL de CM de las razas DR y FA se encuentran dentro del perfil de LA observado en SRB. Aunque no se observó ningún pico de LDLA en los datos de SRB para CM, hubo mucha agrupación en SRB en los intervalos de marcador donde se ubicaban los picos en DR y FA. Por ejemplo, en el intervalo medio entre BM4208 y BMS2819, donde se ubica el pico de LDLA mayor en FA y en el intervalo circundante del pico de DR (BMS2819-INRA144), había 37 y 48 agrupaciones, respectivamente, de los 400 haplotipos fundadores totales en SRB.

Holstein Danesa

20 El QTL que afecta a CM y SCS también estaba segregando en ganado bovino de Holstein Danesa revelado en el análisis de regresión dentro de una familia. El QTL de CM fue significativo ($P < 0,01$) en el análisis de LA a través de las familias con el método de VC. Aunque se observaron picos de LDLA pequeños a lo largo del perfil de LA, sin embargo no se observó ningún pico de LD convincente para el QTL en DH. Los datos estadísticos de LRT mayores para QTL de CM en LA estaban a 42,9 cM, siendo los datos estadísticos de LRT de 10,6 y el intervalo de QTL fue bastante grande extendiéndose desde 29 hasta 51 cM. Un pico de LD pequeño para QTL de CM coincide con los picos de LD observados en la población de DR y FA a 74 cM. El QTL de SCC tiene datos estadísticos de prueba pico a 48,7 cM con un intervalo de desde 44 hasta 58 cM. La parte de la varianza total explicada por el QTL tomando los picos mayores en LA respectivos fue del 27 y el 17% para CM y SCS, respectivamente. El pico de LD mayor para CM estaba a 73,35 cM, la región en la que se observó el pico de LD alto para DR. No se observó ningún pico de LD para SCS en DH.

Análisis a través de las razas

35 Los análisis de LA, LDLA y LD dentro de una raza revelaron que los QTL que afectan a CM estaban segregando a aproximadamente 74 cM en más de una población. Por tanto, se llevaron a cabo análisis de QTL a través de las razas combinando datos a través de diferentes razas en el estudio. Los resultados del análisis a través de las razas de QTL se presentan en las tablas 20, 21 y 22. El pico de LDLA para QTL de CM en ganado bovino de DR y FA estaba ubicado en los intervalos de marcador circundantes cuando se realizaron los análisis por raza. Sin embargo, se observó un pico de LDLA alto de CM en el intervalo de marcadores (BMS2819-INRA144) cuando se analizaron datos combinados de DR y FA y también coincide con el pico de LD. El análisis combinado de datos de FA y SRB no dio ningún pico de LDLA mayor a lo largo del perfil de LA, sin embargo, se observó el pico de LD en el mismo intervalo de marcadores a 74 cM. Los análisis de datos combinados de DR, FA y SRB también dieron el pico de LDLA mayor a lo largo de LA en la misma región, es decir BM4208-BMS2819-INRA144. El pico de LD también estaba en la misma ubicación que el pico de LDLA mayor autenticado a lo largo de LA.

45 El análisis conjunto de DR y FA mostró un pico de LDLA alto a 38 cM entre los marcadores DIK2810 y DIK5364 para QTL de SCS. También se observó el pico de LDLA en la misma ubicación para QTL de SCS en el análisis combinado de FA y SRB. Sin embargo, este pico de LDLA desapareció cuando se analizaron juntos DR, FA y SRB.

Análisis de múltiples rasgos

50 SCS es un rasgo indicador de resistencia a mastitis. Se esperaba que muchos de los genes responsables de CM también tuvieran efecto sobre SCS. Por tanto, se llevó a cabo un análisis de múltiples rasgos de CM y SCS para someter a prueba si los QTL que segregan en BTA9 tienen efecto pleiotrópico sobre ambos rasgos o si están ligados a QTL. Aunque el análisis de LDLA de único rasgo de los datos de DR mostró el pico de LDLA de CM y SCS en el mismo intervalo de marcadores, es decir entre BMS2819 e inra144, el análisis combinado de 2 rasgos dio un pico de LDLA a 69,1 cM entre los marcadores SLU2 y C6orf93. En el análisis dentro de una raza, FA, SR no mostraron pico de LDLA para el modelo con QTL que afecta tanto a CM como a SCS. Sin embargo, cuando se combinaron las tres razas DR, FA y SRB y se analizaron con un modelo de 2 rasgos, se observó un pico de LDLA con datos estadísticos de LRT de 19,7 en el intervalo de marcadores INRA144 e INRA084.

Análisis de haplotipo

Los resultados del mapeo fino de QTL mencionados anteriormente, señalan hacia un QTL que segrega para CM

dentro de la región de 4 marcadores, BM4208-BMS2819-INRA144-INRA084. Por tanto, se estudiaron la agrupación de haplotipos fundadores y efectos de haplotipos sobre el punto medio entre los marcadores BMS2819 e INRA144. Esto se realizó dentro de las razas y también a través de tres razas DR, FA y SRB, ya que estas tres razas están relacionadas en su origen. Se identificaron los haplotipos asociados con alta y baja resistencia a mastitis.

5

Tabla 19.

Análisis de ligamiento dentro de una familia usando análisis de intervalo de regresión.						
Raza y n.º de padre	Resistencia a mastitis (CM)			Recuento de células somáticas		
	Posición (Morgan)	valores de F	valores de p	Posición (Morgan)	valores de F	valores de p
Holstein Danesa						
1079	0,829	10,73	0,99	0,596	13,19	1,00
1080	0,432	3,79	0,73	0,072	0,91	0,12
1082	0,643	6,76	0,92	0,654	1,18	0,21
1087	0,474	4,22	0,76	0,919	7,58	0,95
1808	0,347	16,61	1,00	0,596	1,97	0,33
A través de las familias	0,432	4,90	1,00	0,523	3,43	0,97
Roja Danesa						
1800	0,501	13,00	0,99	0,501	5,65	0,86
1801	0,728	1,06	0,57	0,728	0,36	0,28
1802	0,699	0,07	0,07	0,961	0,23	0,21
1803	1,009	1,75	0,37	0,156	11,35	0,99
1804	0,718	0,32	0,18	0,712	3,96	0,88
1806	0,739	0,07	0,05	0,654	1,30	0,60
1807	0,363	0,28	0,24	0,442	0,45	0,34
4009	0,696	2,46	0,86	0,358	0,73	0,59
A través de las familias	0,502	1,95	0,81	0,497	1,77	0,71
Ayrshire Finlandesa						
34872	0,913	0,83	0,51	0,416	1,17	0,62
35142	0,363	0,44	0,26	0,358	0,55	0,32
36386	1,003	3,14	0,71	1,003	1,95	0,50
36455	0,617	0,96	0,49	0,903	1,76	0,69
36460	0,792	8,81	0,97	0,945	8,49	0,97
36687	0,718	8,27	0,95	0,564	3,11	0,63
36733	0,728	1,67	0,74	0,728	0,66	0,49
37465	0,538	3,24	0,71	0,368	15,85	1,00
37505	0,358	1,31	0,58	0,358	1,66	0,66
38393	0,358	0,64	0,55	0,384	1,99	0,80
38651	0,808	1,33	0,56	0,998	2,17	0,72
A través de las familias	0,687	2,03	0,90	0,978	1,94	0,89
Roja Sueca						
36460	0,792	5,22	0,85	0,945	9,92	0,97
74746	0,426	5,89	0,91	0,638	2,38	0,58
75241	0,702	0,10	0,06	0,744	9,47	0,99
76351	0,913	4,13	0,78	0,336	5,74	0,88
76360	0,654	1,07	0,48	0,686	1,57	0,61
83798	0,834	0,09	0,09	0,670	1,17	0,59
85409	0,686	2,00	0,73	0,739	1,10	0,55
85439	0,363	3,62	0,74	0,919	1,38	0,33
85679	0,903	10,82	0,97	0,336	0,32	0,01
85716	0,739	11,77	0,98	0,649	2,21	0,49
86063	0,723	4,18	0,79	0,718	1,67	0,42
86097	0,432	1,68	0,53	0,760	1,51	0,50
86626	0,416	5,19	0,84	1,009	5,72	0,87
A través de las familias	0,674	3,18	1,00	0,724	2,22	0,94

ES 2 425 105 T3

Tabla 20

Resumen de un análisis de ligamiento a través de las familias (LA) usando el método de componentes de varianza				
Raza	Rasgo	Posición (Morgan)	Datos estadísticos de LRT pico	Intervalo de marcadores
Roja Danesa (DR)	CM	0,464	4,43	BM4208 - DIK4926
	SCS	0,253	4,58	BMS2504 - DIK2892
Ayrshire Finlandesa (FA)	CM	0,682	4,19	BM7209 - SLU2
	SCS	0,370	5,12	BMS817 - BMS555
Roja sueca (SR)	CM	0,674	9,89	DIK2145 - BM7209
	SCS	0,731	6,05	BM7234 - BM4208
Holstein Danesa (DH)	CM	0,429	10,63	DIK2303 - DIK4720
	SCS	0,487	6,72	DIK4926 - BMS1909
DR + FA	CM	0,682	3,20	BM7209 - SLU2
	SCS	0,370	6,57	BMS817 - BMS555
FA + SR	CM	0,682	15,30	BM7209 - SLU2
	SCS	0,951	9,91	BMS1943 - BMS1967
DR + FA + SR	CM	0,682	13,53	BM7209 - SLU2
	SCS	0,951	8,51	BMS1943 - BMS1967

Tabla 21.

Resumen de desequilibrio de ligamiento y análisis de ligamiento (LDLA) usando el método de componentes de varianza				
Raza	Rasgo	Posición (Morgan)	Datos estadísticos de LRT del pico	Intervalo de marcadores
Roja Danesa (DR)	CM	0,741	8,51	BM2819 - INRA144
	SCS	0,398	16,95	DIK2741 - TGLA261
Ayrshire Finlandesa (FA)	CM	0,739	5,38	BM4208 - BMS2819
	SCS	0,381	7,26	DIK2810 - DIK5364
Roja sueca (SR)	CM	0,672	5,56	BMS1724 - DIK2145
	SCS	0,741	5,71	BMS2819 - INRA144
Holstein Danesa (DH)	CM	0,429	12,69	DIK2303 - DIK4720
	SCS	0,464	7,85	BM4204 - DIK4926
DR + FA	CM	0,741	9,93	BMS2819 - INRA144
	SCS	0,381	9,61	DIK2810 - DIK5364
FA + SR	CM	0,739	10,98	BM4208 - BMS2819
	SCS	0,691	6,26	SLU2 - C6orf93
DR + FA + SR	CM	0,739	14,90	BM4208 - BMS2819
	SCS	0,741	6,69	BMS2819 - INRA144

Tabla 22

Resumen de análisis de desequilibrio de ligamiento a través de las familias (LD) usando el método de componentes de varianza				
Raza	Rasgo	Posición (Morgan)	Datos estadísticos de LRT del pico	Intervalo de marcadores
Roja Danesa (DR)	CM	0,741	13,60	BM2819 - INRA144
	SCS	0,398	12,95	DIK2741 - TGLA261
Ayrshire Finlandesa (FA)	CM	0,739	3,64	BM4208 - BMS2819
	SCS	-	<1,0	-
Roja sueca (SR)	CM	0,327	4,26	DIK3002 - DIK3003
	SCS	0,464	2,18	BM4204 - DIK4926
Holstein Danesa (DH)	CM	0,744	5,45	INRA144 - INRA084
	SCS	0,731	1,49	BM7234 - BM4208
DR + FA	CM	0,741	5,49	BMS2819 - INRA144
	SCS	0,398	1,99	TGLA261 - ILSTS013
FA + SR	CM	0,739	5,39	BM4208 - BMS2819
	SCS	0,370	1,73	BMS817 - BMS555
DR + FA + SR	CM	0,739	8,94	BM4208 - BMS2819
	SCS	0,253	4,08	BMS2504 - DIK2892

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la resistencia frente a mastitis en cualquier sujeto bovino de las razas de Roja Danesa, Ayrshire, Roja y Blanca Sueca y Holstein, que comprende detectar en una muestra de dicho sujeto bovino la presencia o ausencia de al menos un marcador genético que está ligado con al menos un rasgo indicativo de resistencia a mastitis, en el que dicho al menos un marcador genético está ubicado en el cromosoma bovino BTA9 en la región flanqueada por y que incluye los marcadores microsatélites polimórficos C6orf93 e inra084, en el que la presencia o ausencia de dicho al menos un marcador genético es indicativo de resistencia a mastitis de dicho sujeto bovino o descendencia del mismo.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el al menos un marcador genético está ubicado en la región flanqueada por y que incluye los marcadores genéticos bms2251 e inra084 de BTA9.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el al menos un marcador genético está ubicado en la región flanqueada por y que incluye los marcadores genéticos bm7234 e inra144 de BTA9.
4. Método según la reivindicación 1, en el que el al menos un marcador genético está ubicado en la región flanqueada por y que incluye los marcadores genéticos bms2819 e inra144 de BTA9.
5. Método según la reivindicación 1, en el que el al menos un marcador genético está ubicado en la región flanqueada por y que incluye los marcadores genéticos bm4208 e inra144.
6. Método según la reivindicación 1, en el que el al menos un marcador genético es el marcador microsatélite C6orf93.
7. Método según la reivindicación 1, en el que el al menos un marcador genético es el marcador microsatélite DIK4986.
8. Método según la reivindicación 1, en el que el al menos un marcador genético es el marcador microsatélite mm12e6.
9. Método según la reivindicación 1, en el que el al menos un marcador genético es el marcador microsatélite PEX3.
10. Método según la reivindicación 1, en el que el al menos un marcador genético es el marcador microsatélite DEAD21.
11. Método según la reivindicación 1, en el que el al menos un marcador genético es el marcador microsatélite BMS 2251.
12. Método según la reivindicación 1, en el que el al menos un marcador genético es el marcador microsatélite EPM2A.
13. Método según la reivindicación 1, en el que el al menos un marcador genético es el marcador microsatélite BM7234.
14. Método según la reivindicación 1, en el que el al menos un marcador genético es el marcador microsatélite BM4208.
15. Método según la reivindicación 1, en el que el al menos un marcador genético es el marcador microsatélite BMS2819.
16. Método según la reivindicación 1, en el que el al menos un marcador genético es el marcador microsatélite INRA144.
17. Método según la reivindicación 1, en el que el al menos un marcador genético es el marcador microsatélite INRA084.
18. Método según la reivindicación 1, en el que el al menos un marcador genético es una combinación de marcadores genéticos.
19. Método según la reivindicación 6, en el que el par de cebadores para amplificar el marcador microsatélite C6orf93 es SEQ ID NO.: 75 y SEQ ID NO.:76.
20. Método según la reivindicación 9, en el que el par de cebadores para amplificar el marcador microsatélite PEX3 es SEQ ID NO.: 81 y SEQ ID NO.:82.
21. Método según la reivindicación 12, en el que el par de cebadores para amplificar el marcador microsatélite EPM2A es SEQ ID NO.: 87 y SEQ ID NO.:88.

22. Método según la reivindicación 1, en el que el al menos un marcador genético es una combinación de marcadores genéticos.
23. Método para seleccionar sujetos bovinos para fines de cría, comprendiendo dicho método el método según la reivindicación 1 que determina la resistencia frente a mastitis.
- 5 24. Uso de un kit de diagnóstico que comprende al menos una secuencia de oligonucleótidos, seleccionándose las secuencias de nucleótidos de cualquiera de SEQ ID NO.: 75 a SEQ ID NO.: 98 para detectar la presencia o ausencia en un sujeto bovino de al menos un marcador genético asociado con resistencia frente a mastitis según el método según la reivindicación 1.

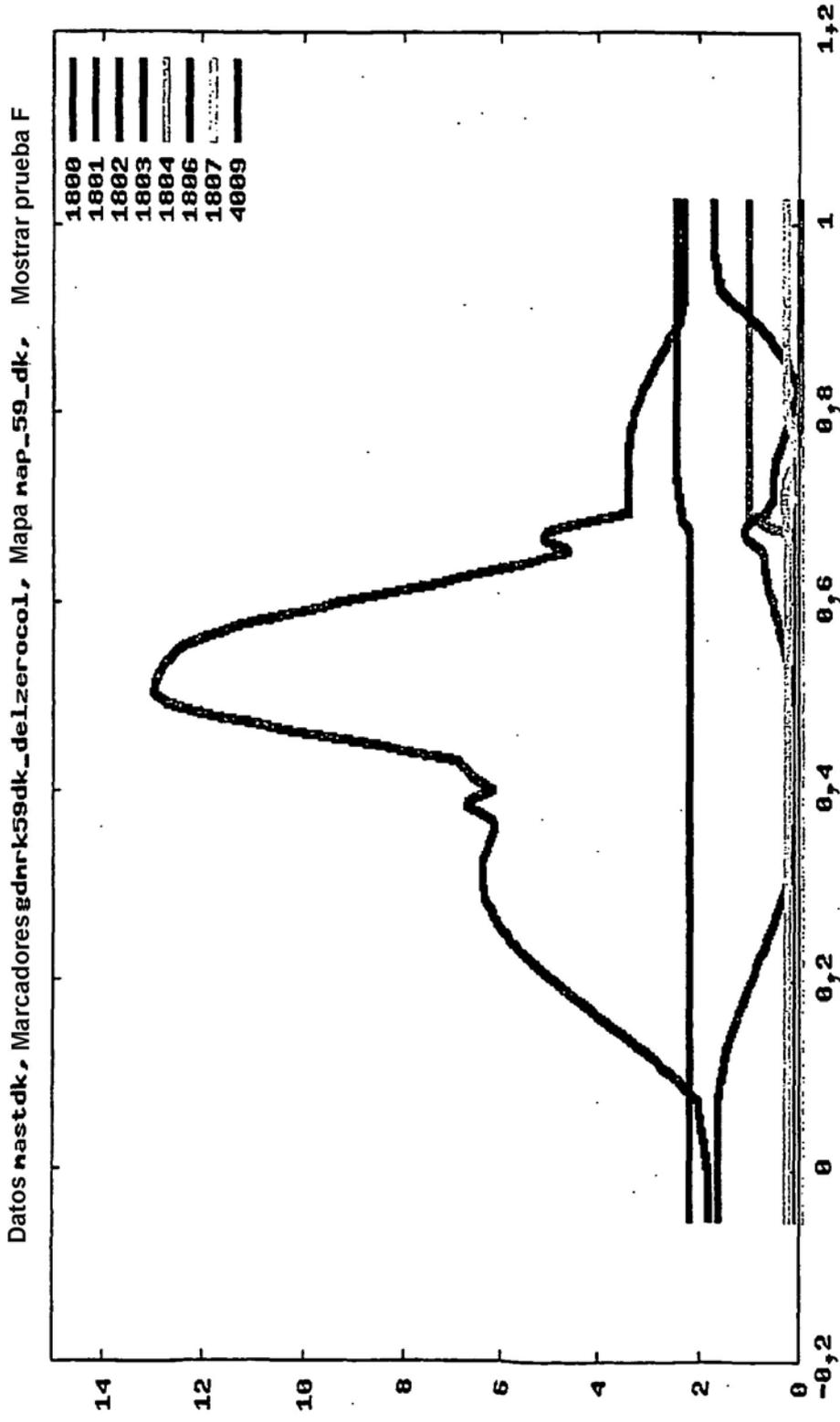


Fig. 1

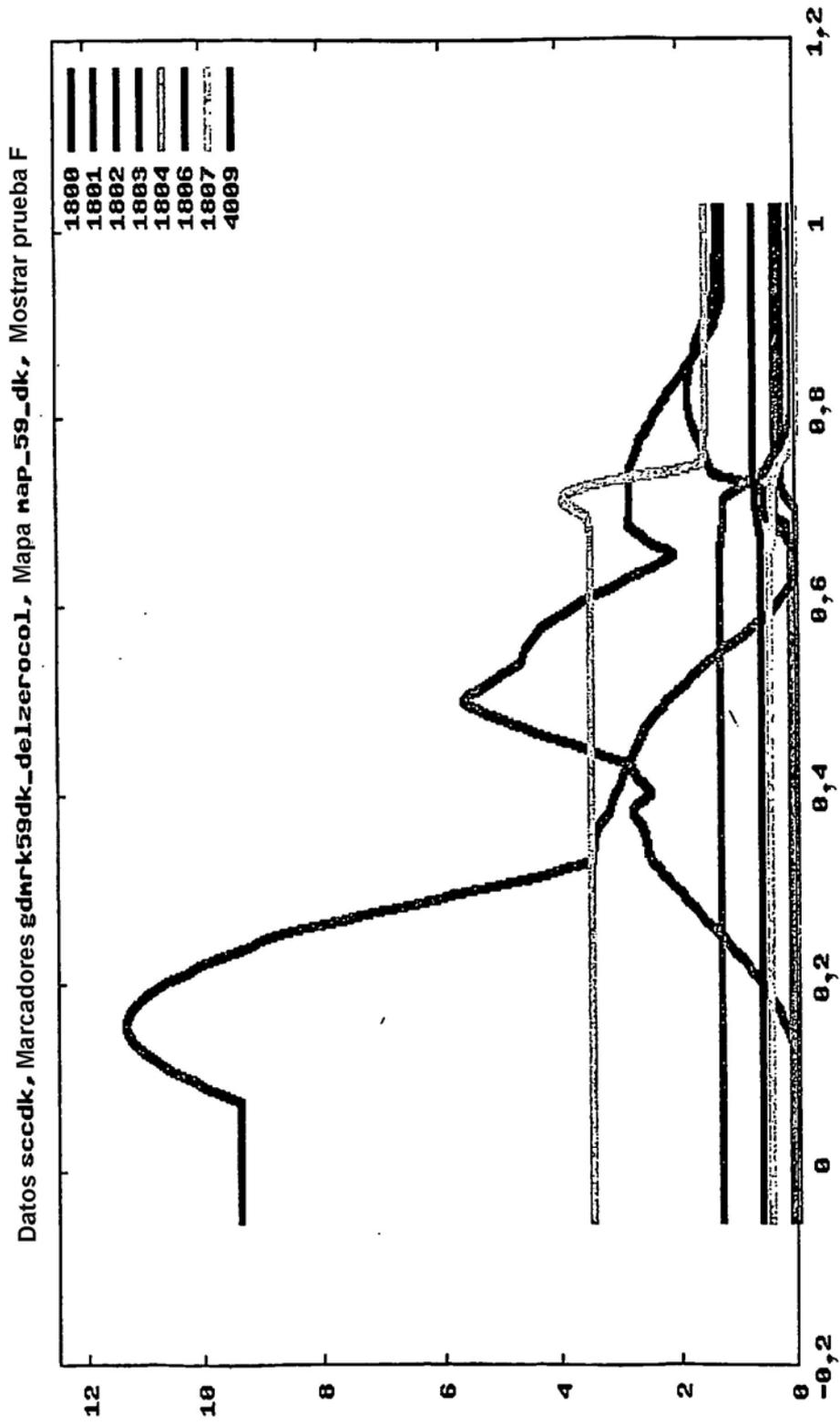


Fig. 2

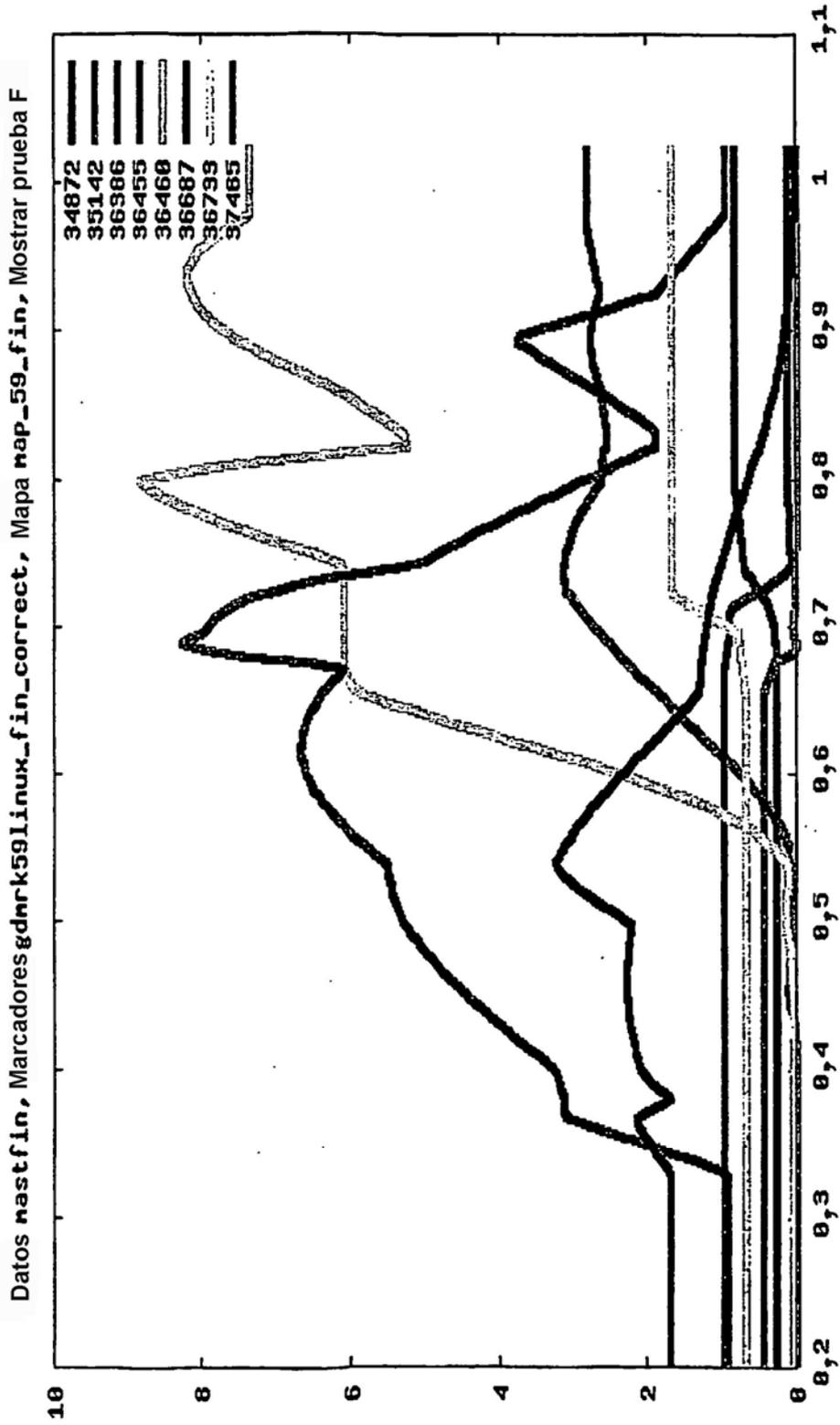


Fig. 3



Fig. 4

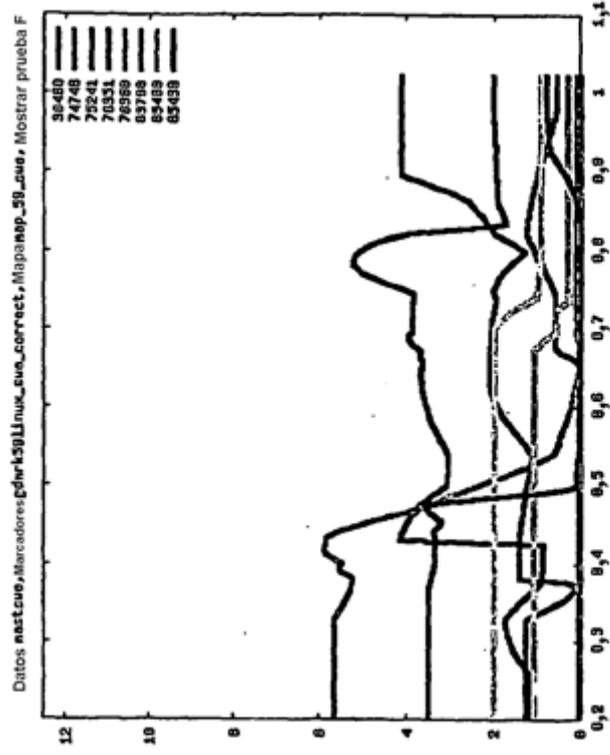


Fig. 5b

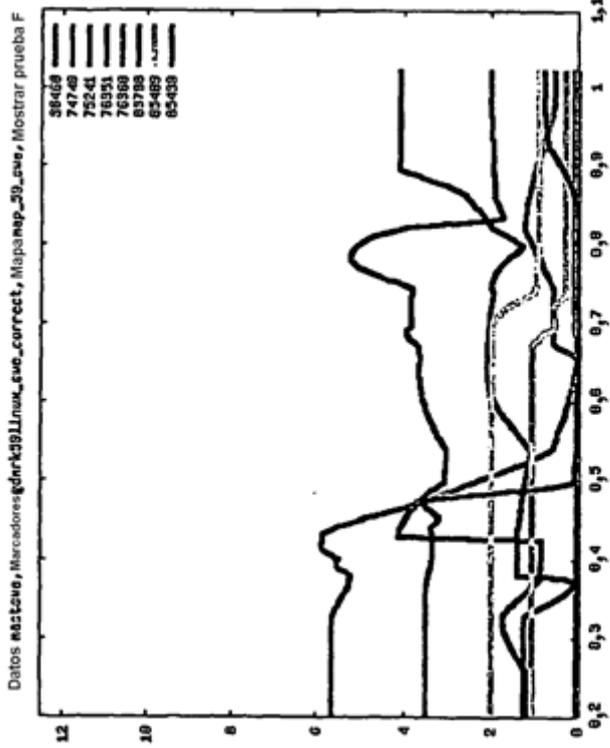


Fig. 5a

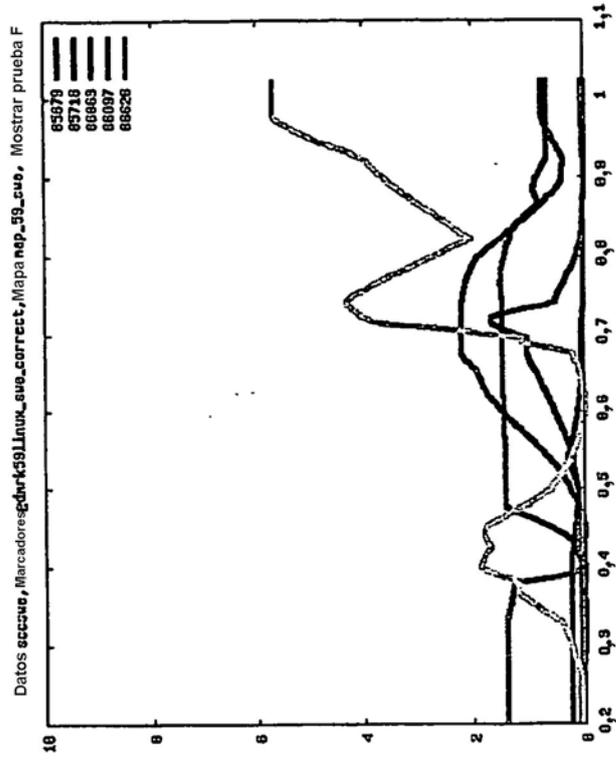


Fig. 6b

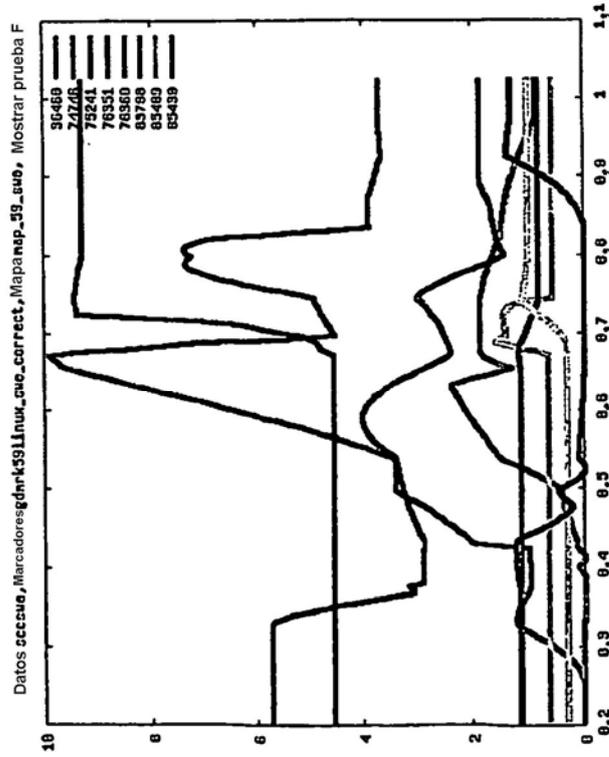


Fig. 6a

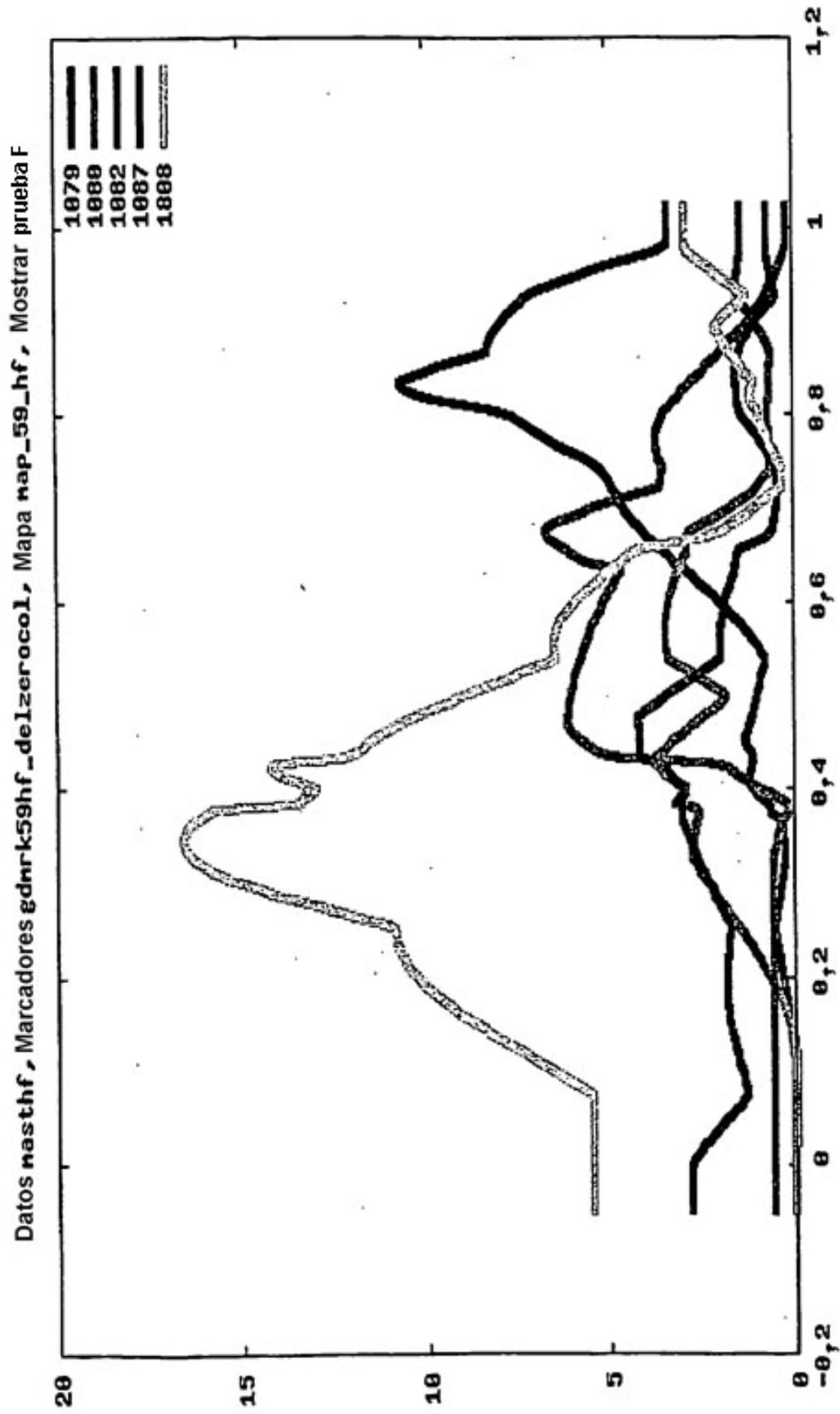


Fig.7

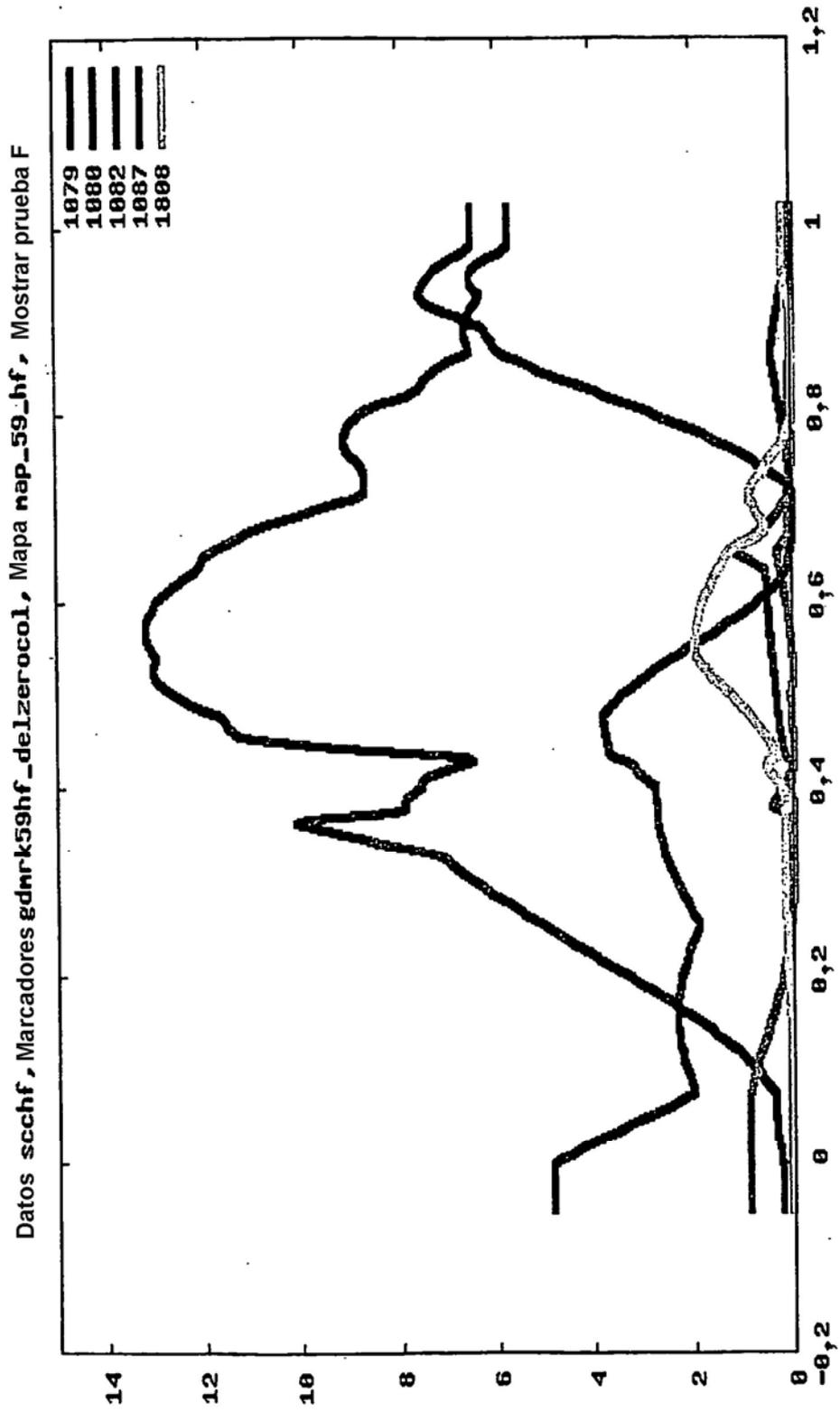


Fig. 8

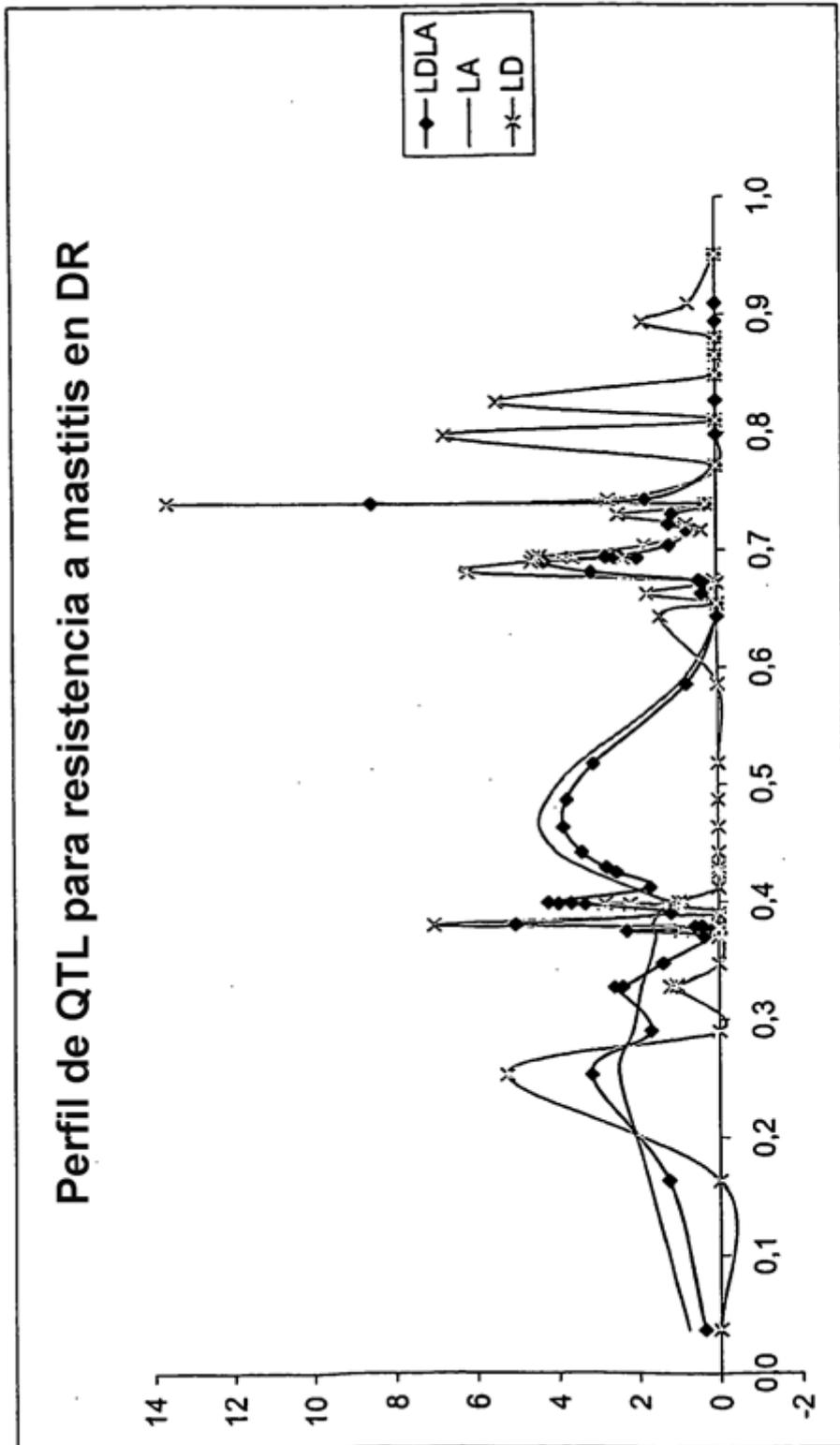


Fig. 9

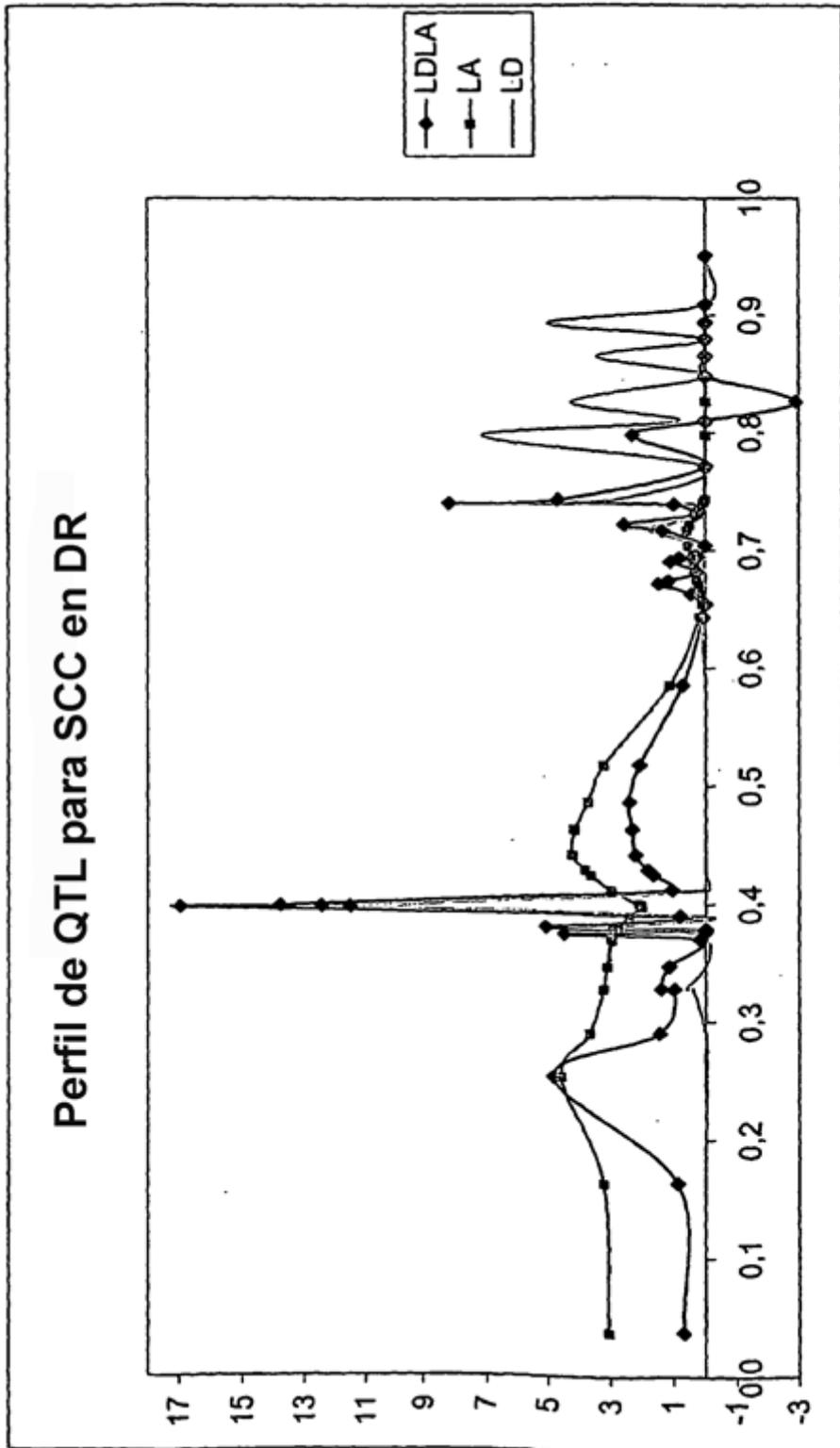


Fig. 10

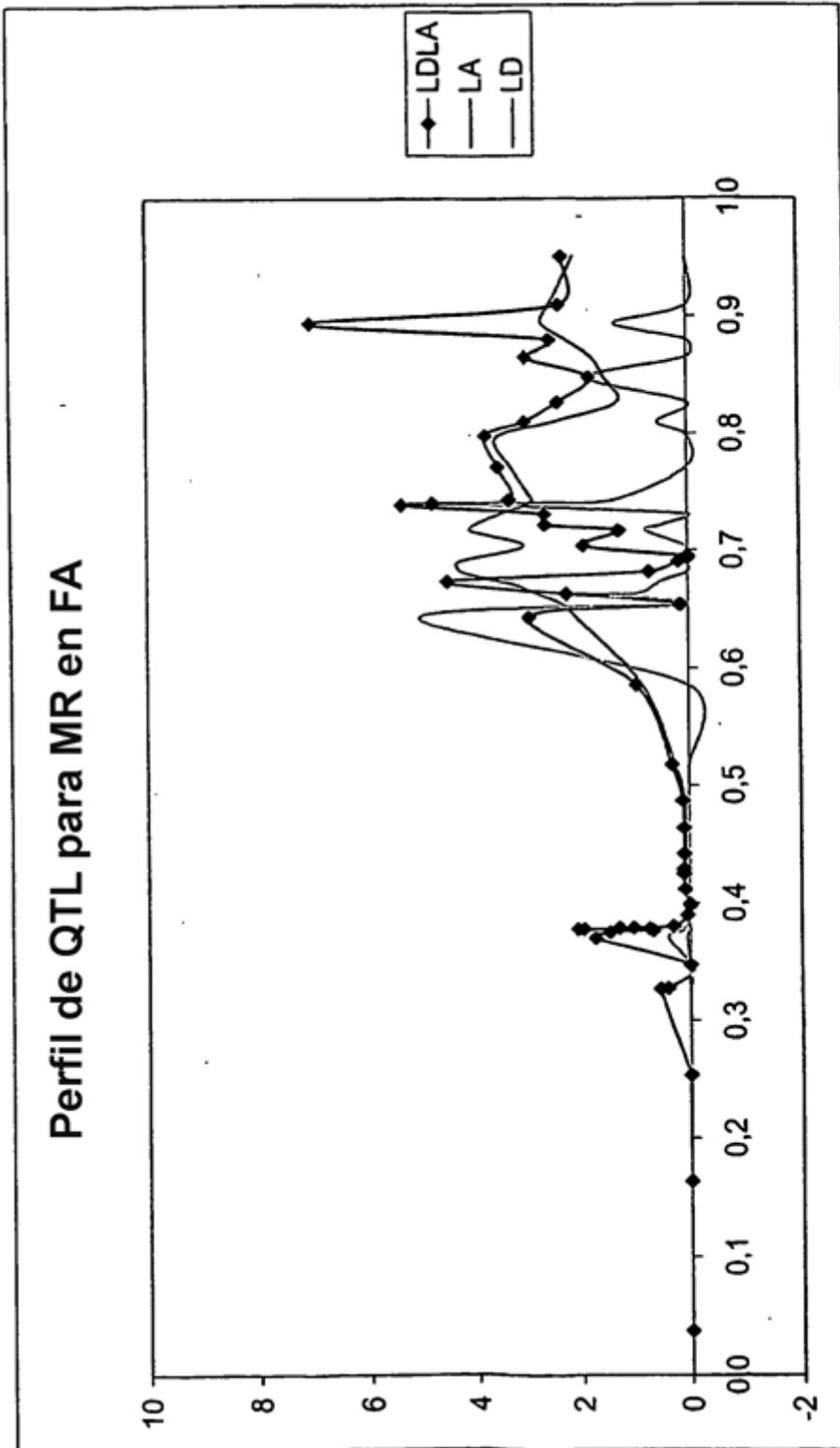


Fig. 11

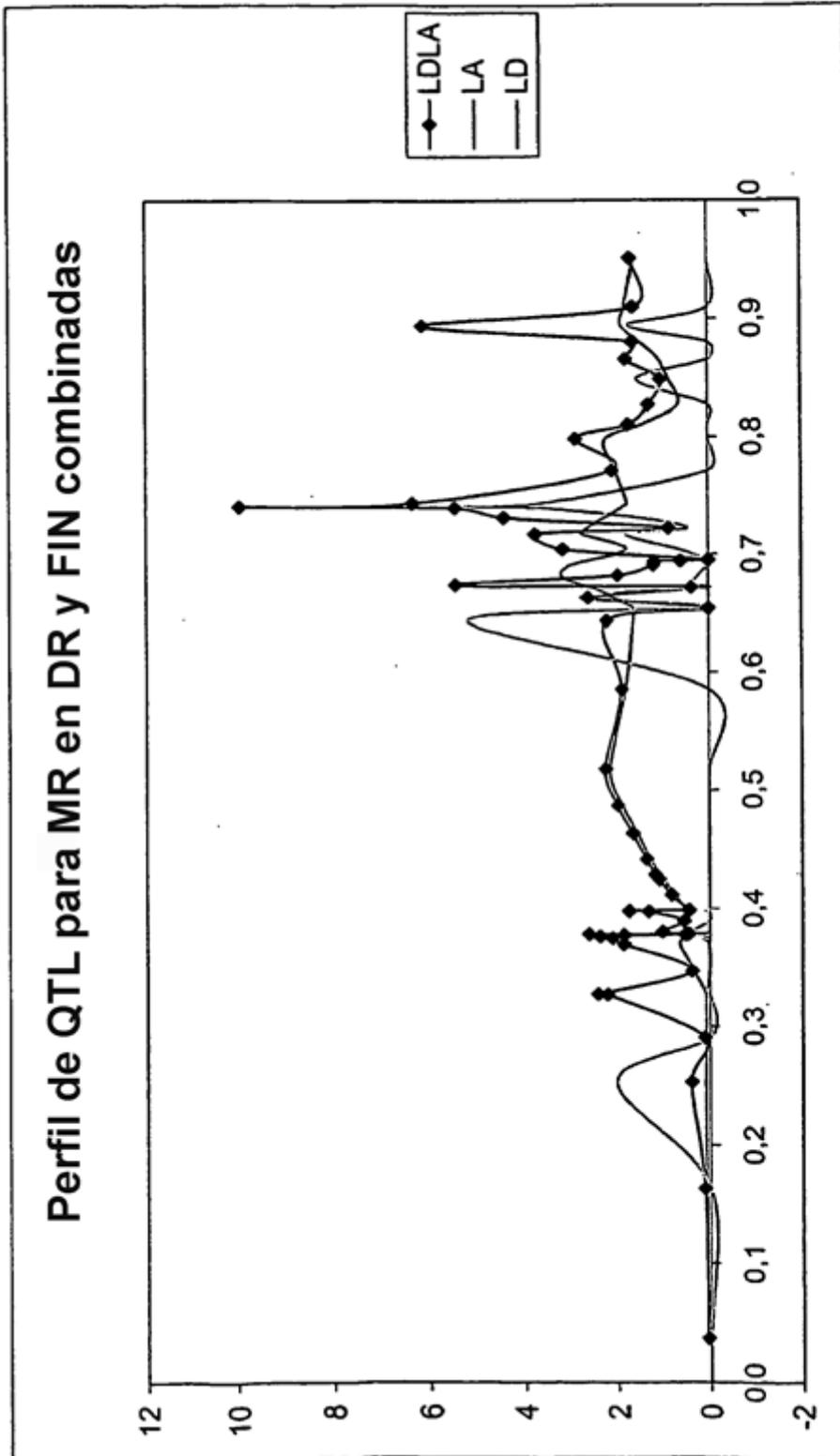


Fig. 12

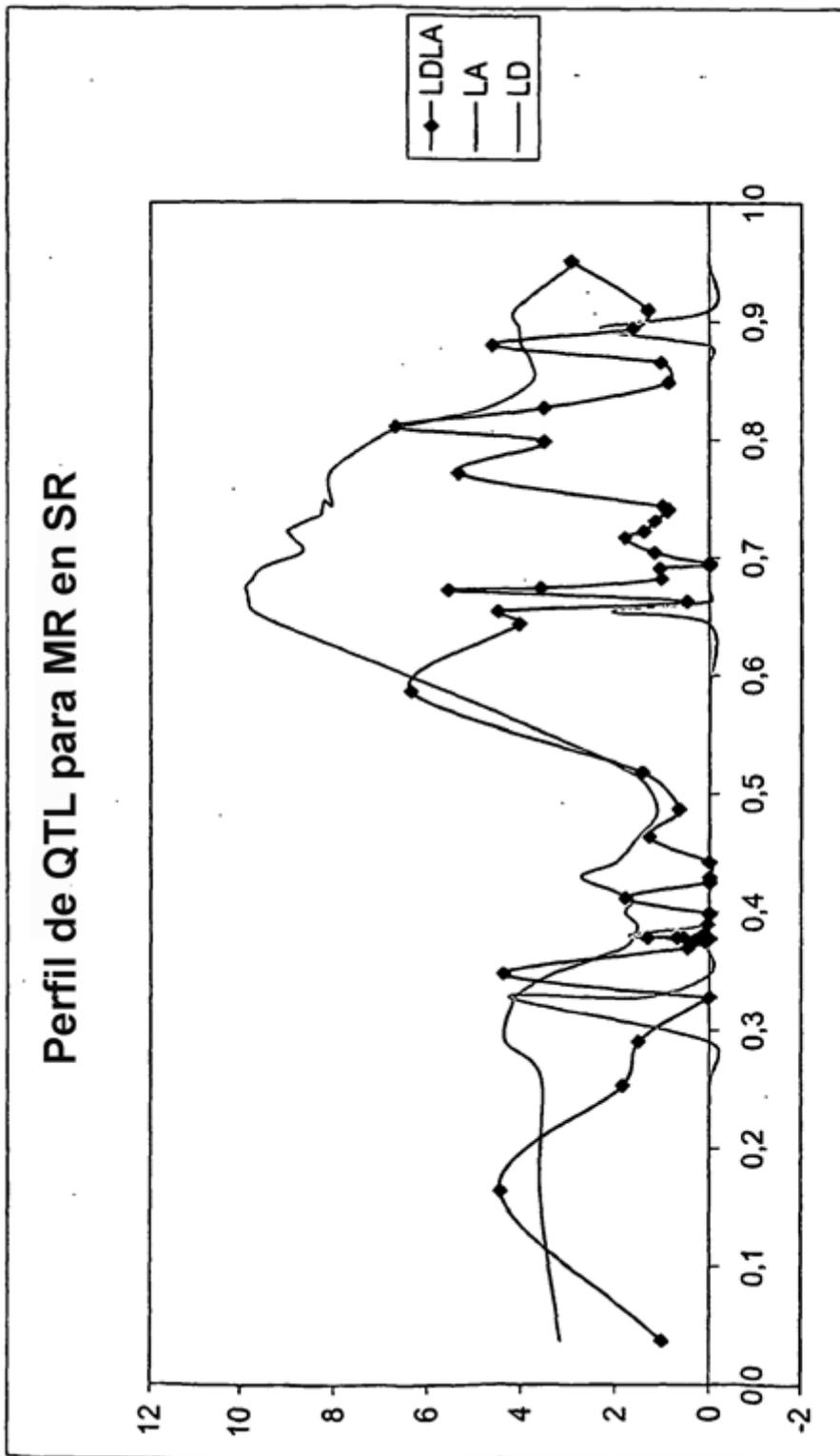


Fig. 13

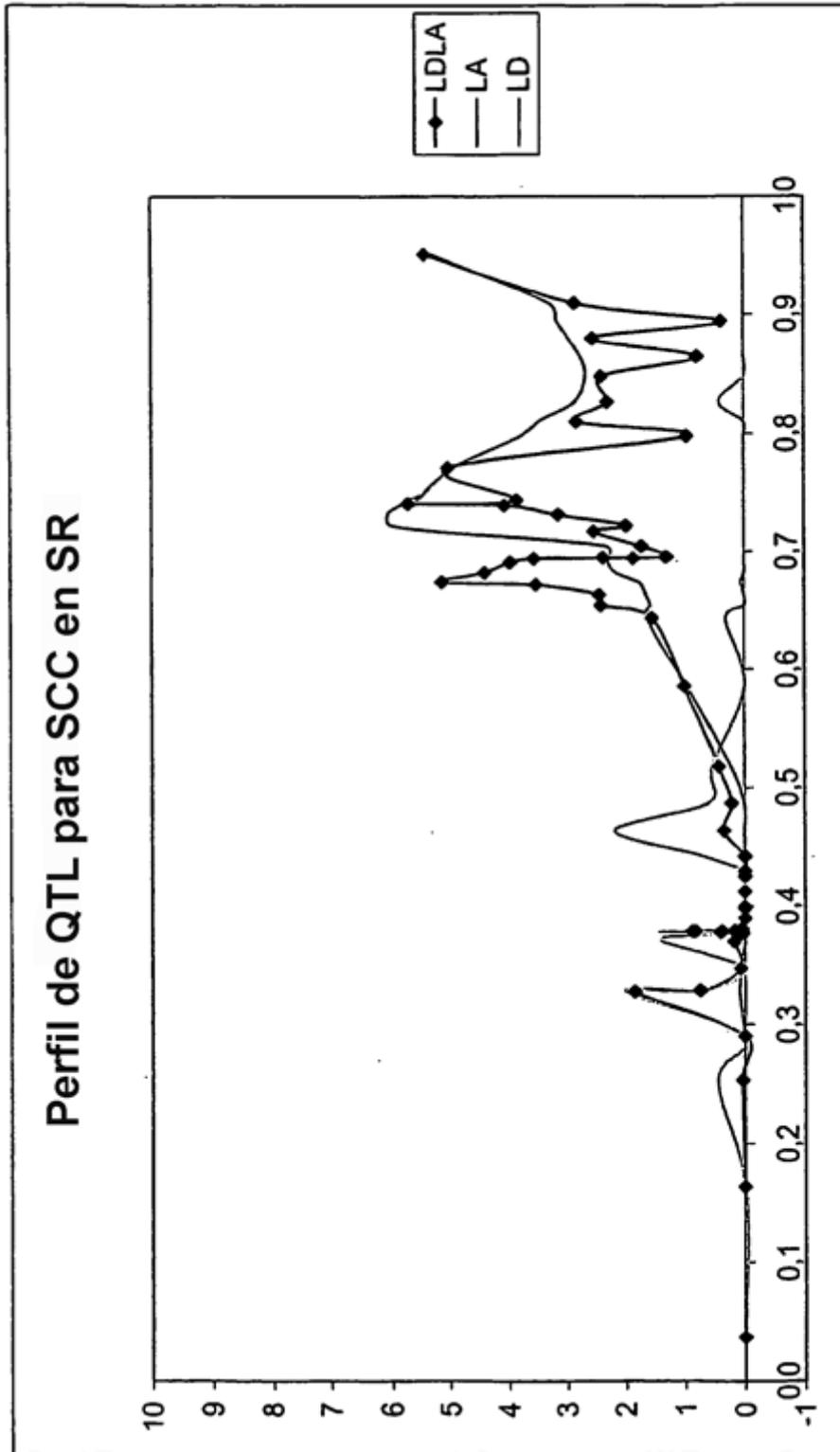


Fig. 14

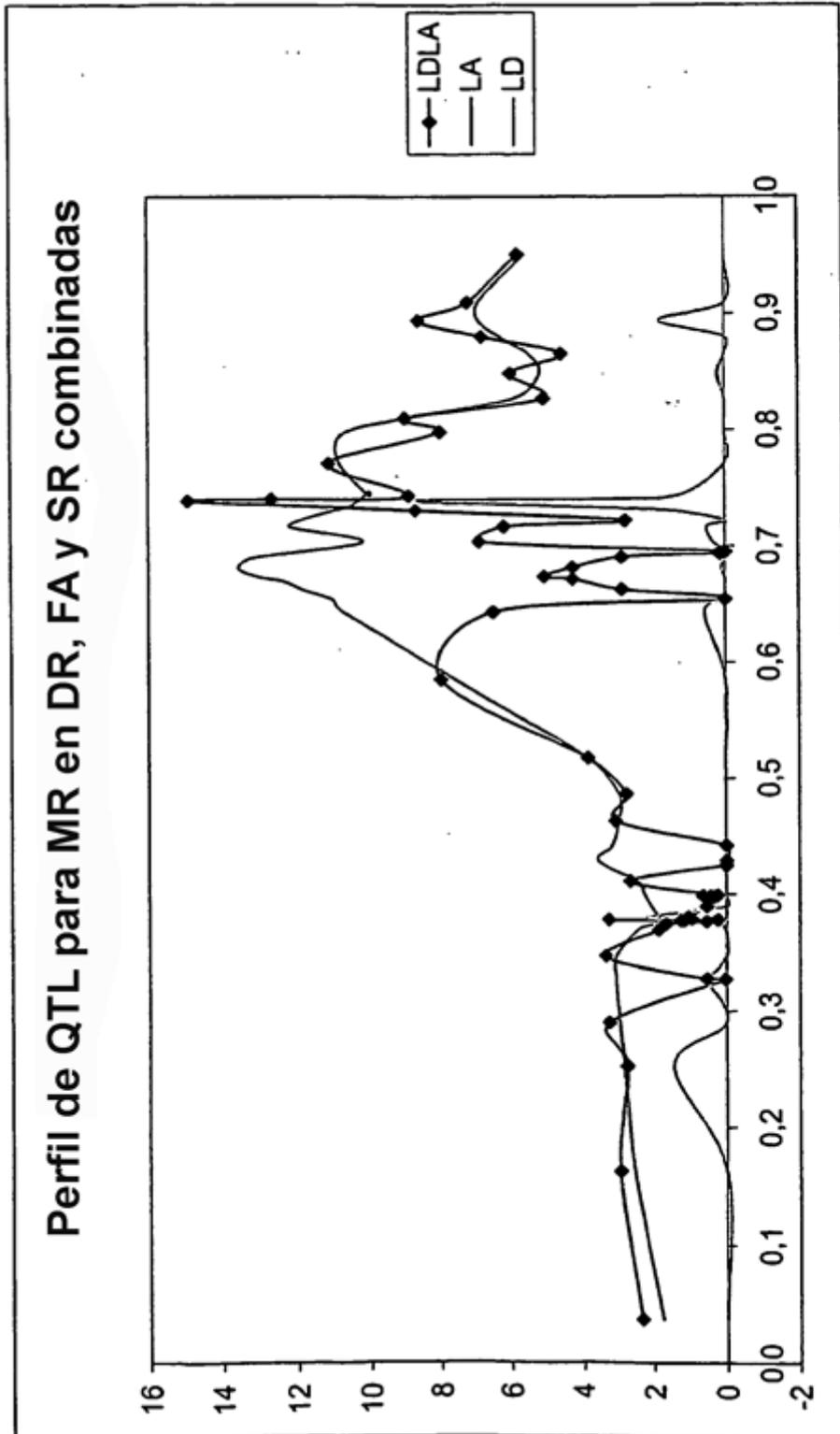


Fig. 15

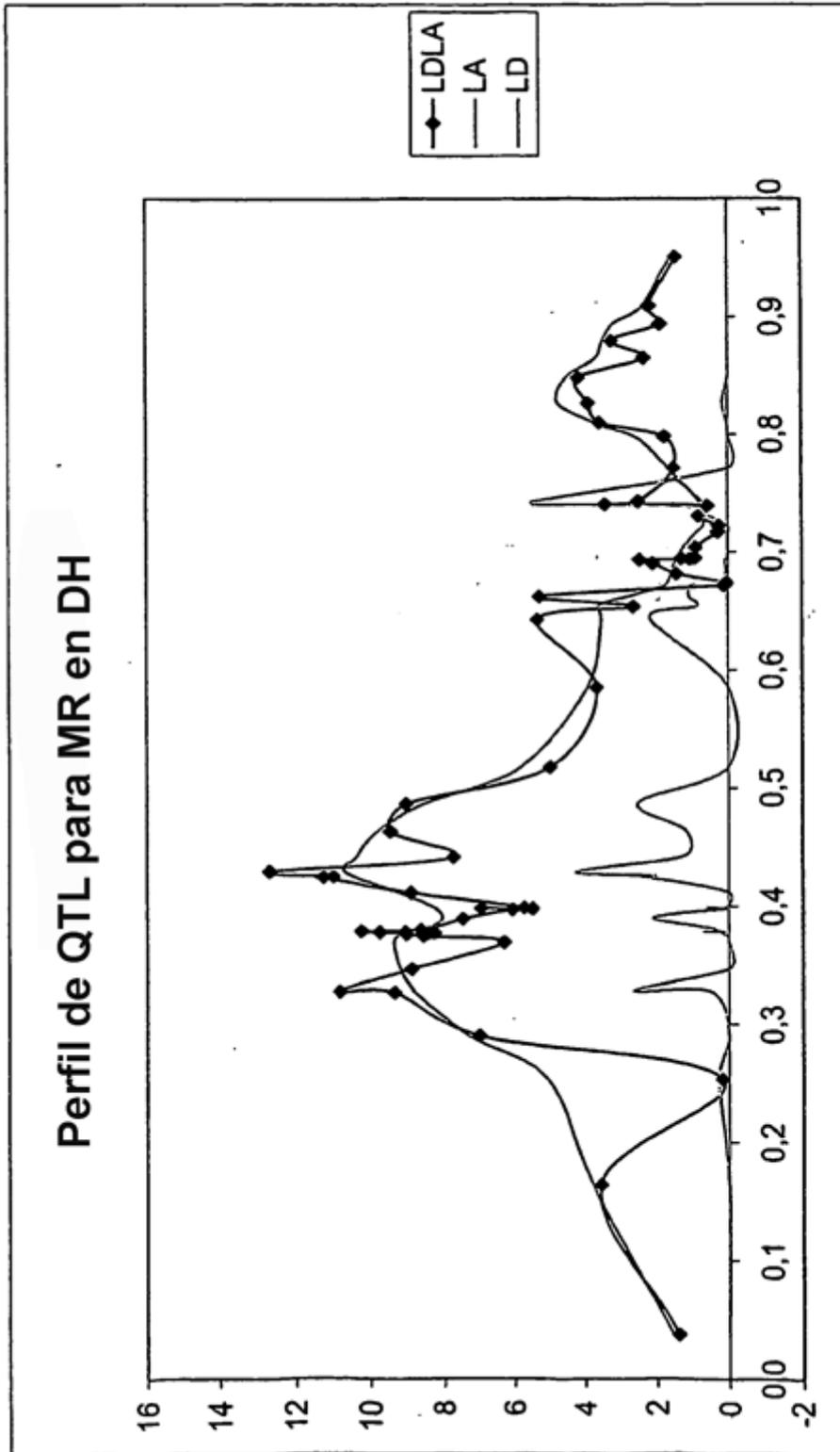


Fig. 16

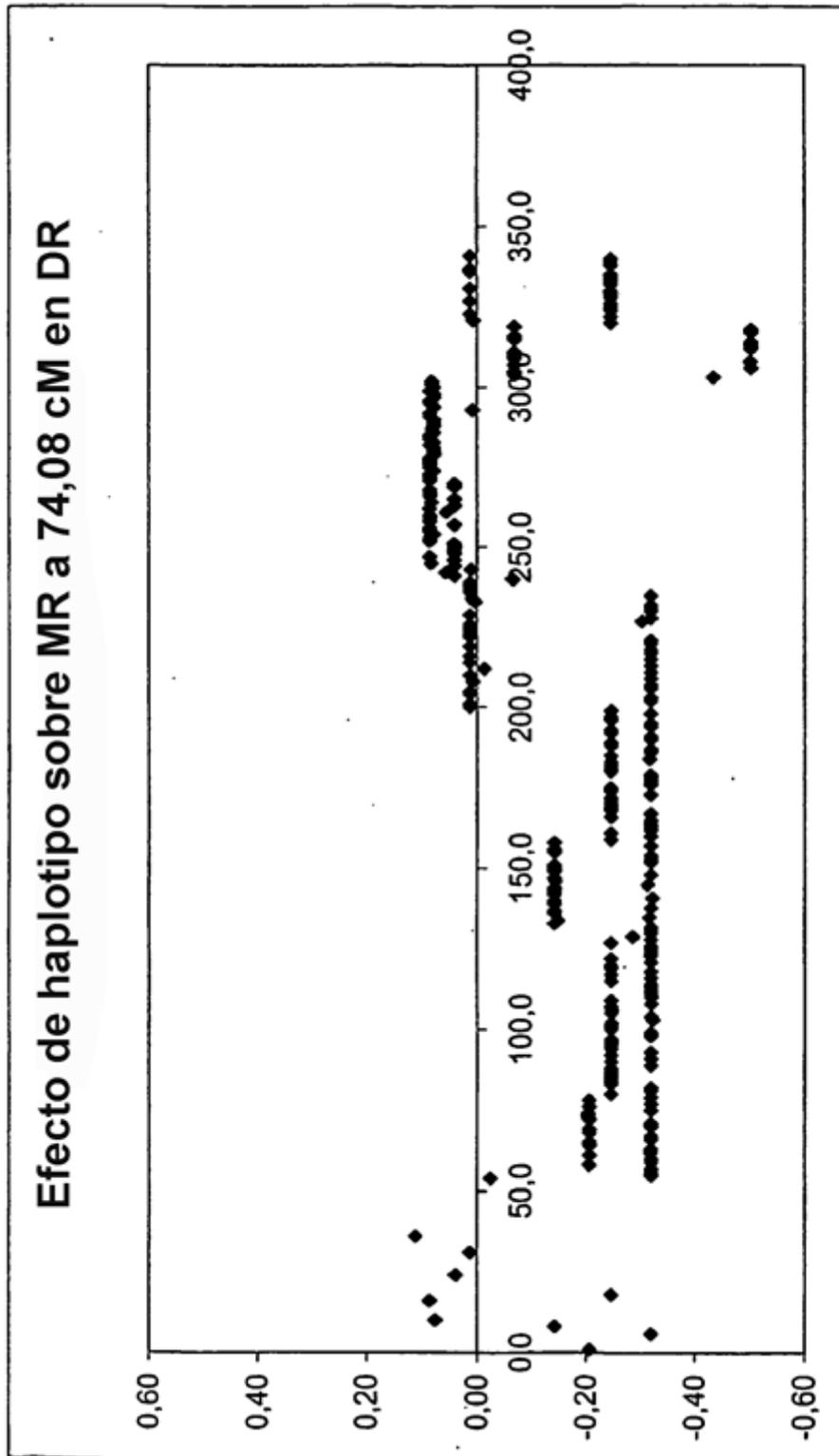


Fig. 17

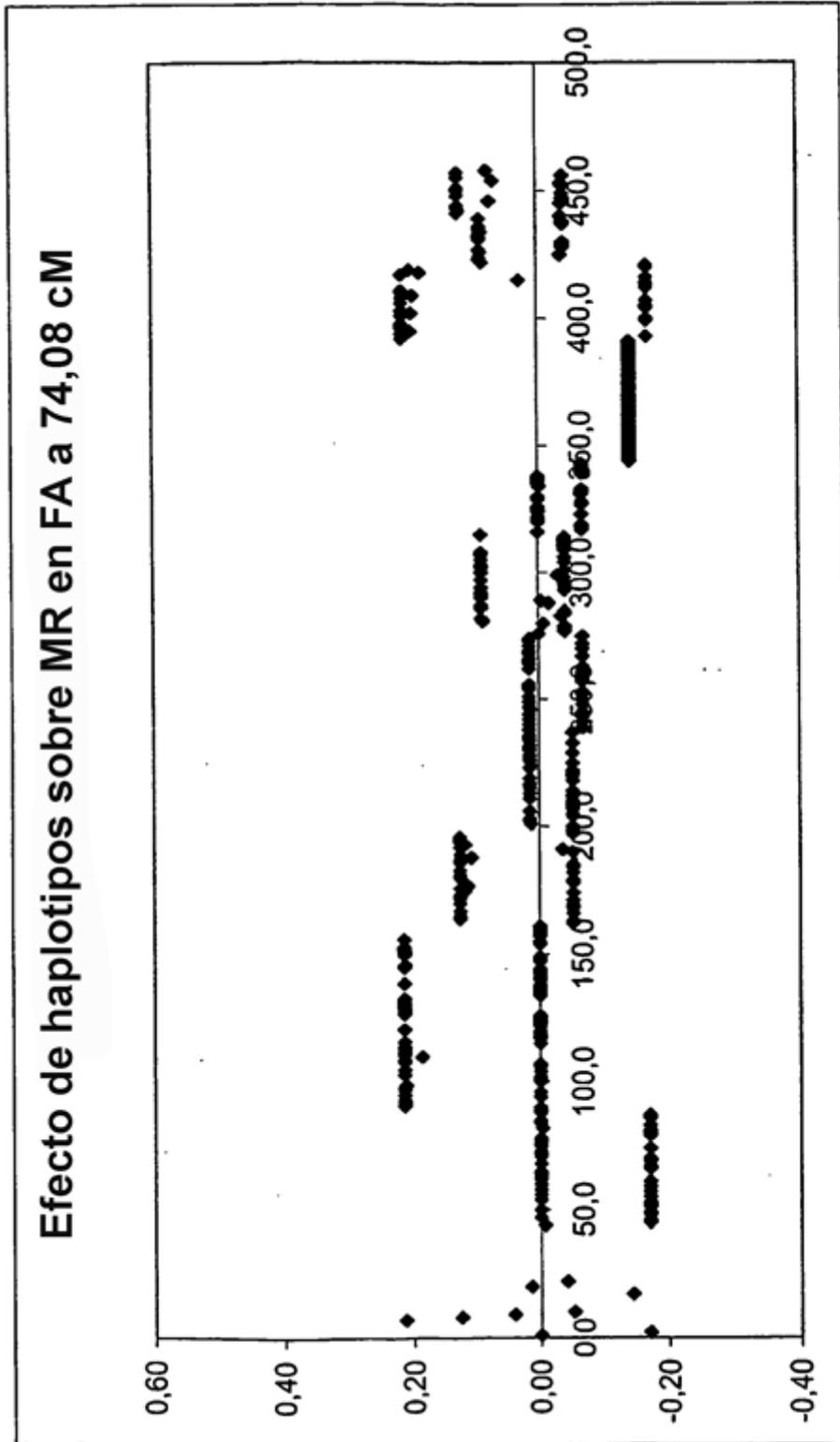


Fig. 18

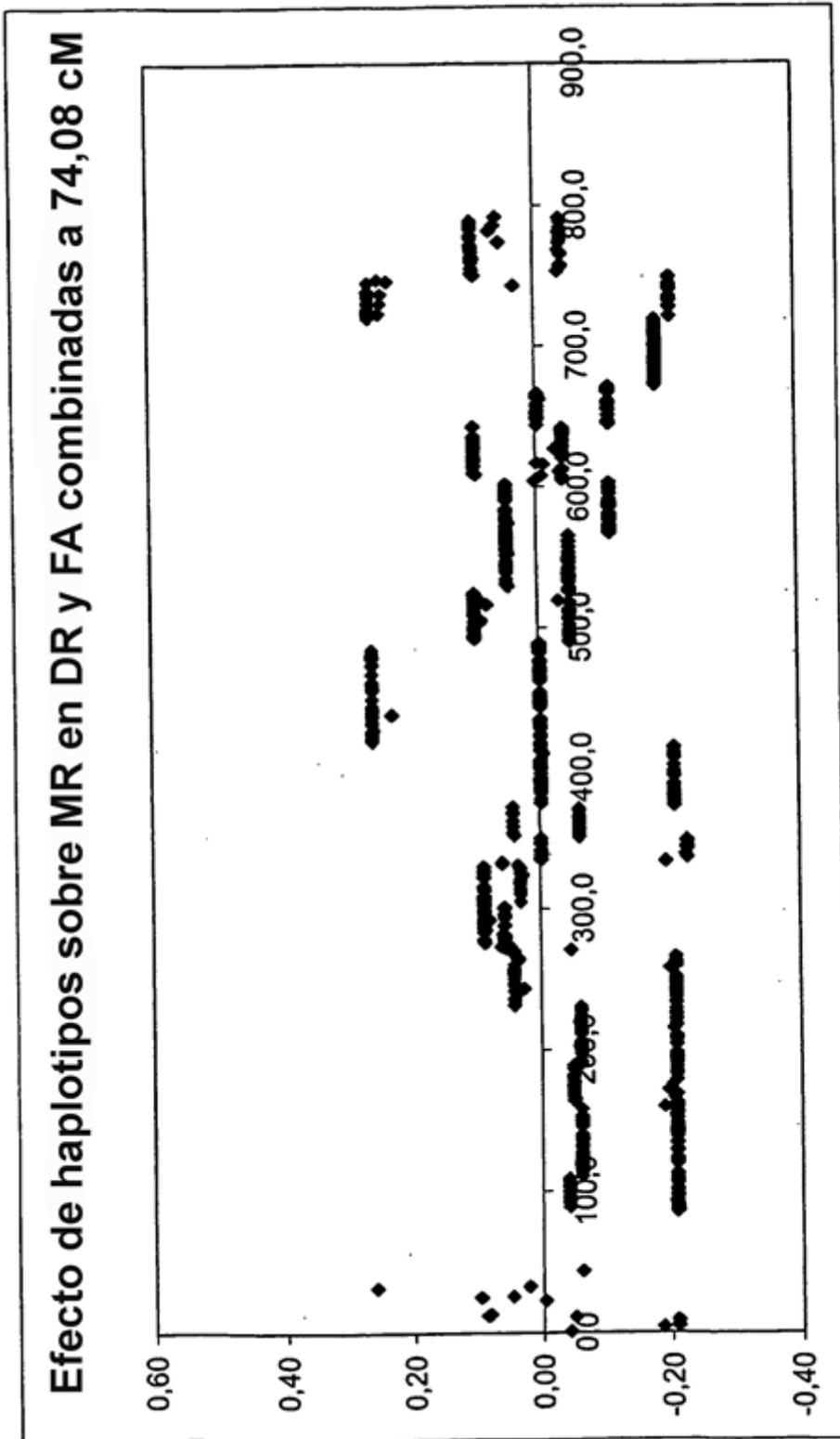


Fig. 19

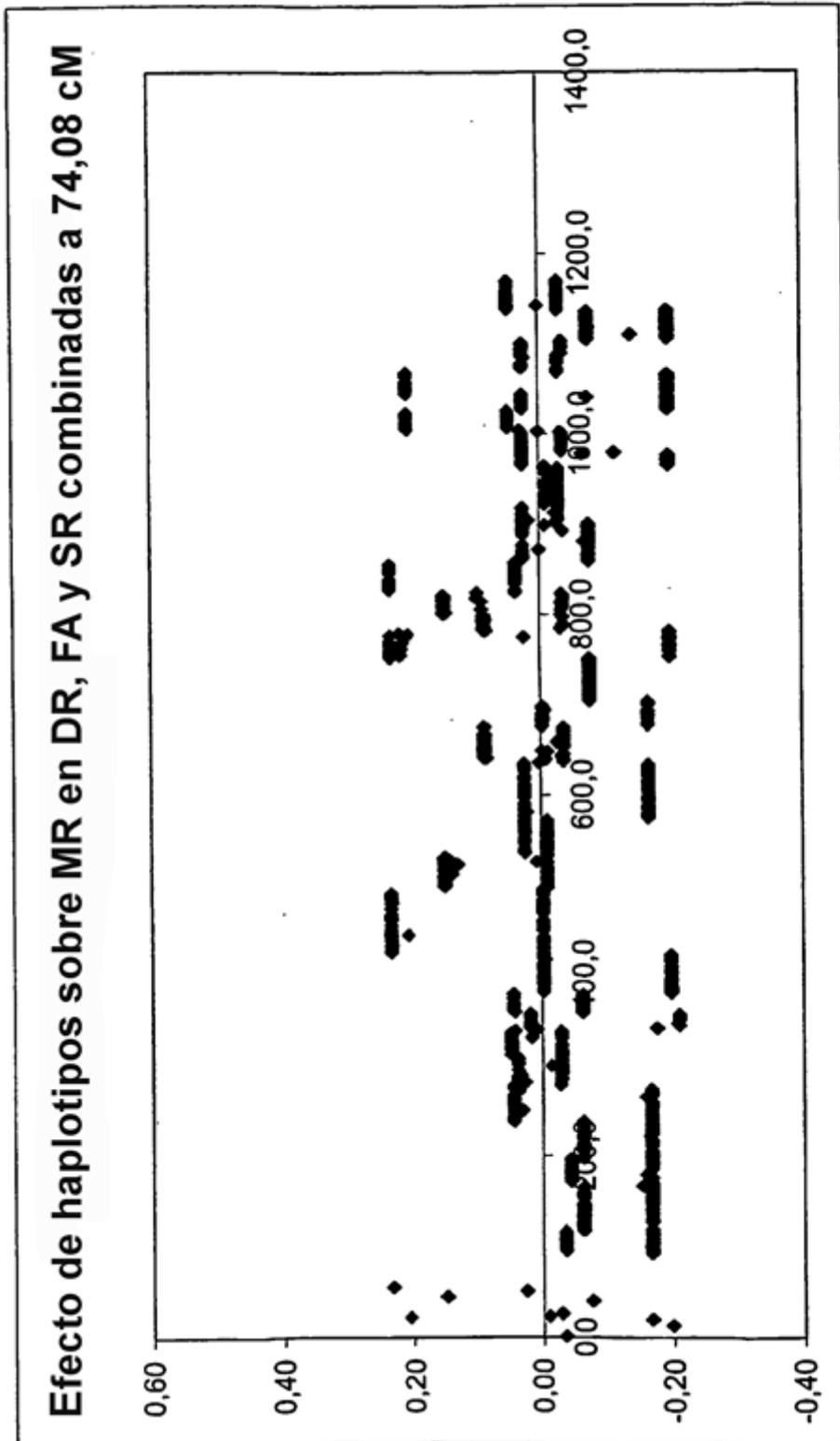


Fig. 20