

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 099**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2009 E 09802498 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2310528**

54 Título: **Una prueba de marcador genético para braquispina y fertilidad en ganado vacuno**

30 Prioridad:

**29.07.2008 EP 08013608**

**30.06.2009 WO PCT/EP2009/058190**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.02.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE LIÈGE (50.0%)**

**Interface Entreprises-Université Avenue Pré-Aily  
4**

**4031 Angleur, BE y**

**UNIVERSITY OF COPENHAGEN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GEORGES, MICHEL;**

**COPPIETERS, WOUTER;**

**CHARLIER, CAROLE;**

**AGERHOLM, JØRGEN STEEN y**

**FREDHOLM, MERETE**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 445 099 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

Una prueba de marcador genético para braquispina y fertilidad en ganado vacuno

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a métodos para la detección de bovinos que están afectados por o son portadores de braquispina (BS), un defecto heredado con herencia autosómica recesiva. La presente invención proporciona un método para determinar si un bovino está afectado por o es portador de BS analizando su ADN genómico o su ARN. El método incluye obtener una muestra de material que contenga ADN genómico o ARN del bovino, determinar el genotipo dicho ácido nucleico para uno o más marcadores SNP que definen el haplotipo diagnóstico de BS, y determinar si dicho animal tiene el haplotipo diagnóstico lo que indica que está afectado por o es portador de BS.

**Descripción de los antecedentes técnicos**

La selección intensa para rasgos de producción deseados en ganado con frecuencia produce una tasa aumentada de endogamia. Esto causa la aparición frecuente de defectos heredados que algunas veces afectan a tal alta proporción de la población que se convierte en un asunto principal. Los ejemplos de defectos genéticos que han causado problemas principales en ganado son la deficiencia de adhesión de leucocitos bovina (BLAD) (1) y la malformación vertebral congénita (CVM) (2).

La mayoría de estos trastornos de caracterizan por un modo recesivo de herencia: los animales pueden ser homocigotos para el alelo normal (+/+), homocigotos para el alelo defectuoso (D/D) o heterocigotos (+/D). Los animales D/D están afectados por la enfermedad, mientras que los animales +/+ y +/D generalmente están sanos. Sin embargo, se dice que los animales +/D son "portadores" y transmitirán el alelo D a la mitad de su descendencia. El apareamiento entre dos animales portadores producirá un cuarto de la descendencia D/D afectada.

Si se pudieran identificar los animales +/D a pesar del hecho de que no muestran síntomas de la enfermedad, sería posible eliminarlos de los programas de reproducción o al menos evitar apareamientos entre portadores. Esto permitiría la erradicación inmediata del defecto genético de la población y evitaría las pérdidas económicas asociadas con ella.

Recientemente se ha vuelto posible identificar rápidamente los genes subyacentes a defectos genéticos y las mutaciones en ellos que producen que un alelo sea D(efectuoso) (3). El procedimiento más comúnmente usado es la clonación posicional que comprende dos pasos. En un primer caso el gen D(efectuoso) se localiza en el genoma a través de la identificación de un segmento cromosómico que es "homocigoto por ascendencia" compartido por todos los individuos afectados en una población determinada. Para ese fin se determina el genotipo de los individuos afectados para decenas de miles de polimorfismos de nucleótido único (SNP) polimórficos dispersos a lo largo del genoma. La mutación que produce el alelo D apareció en un cromosoma específico que se caracteriza por un "haplotipo" único, es decir, combinación de alelos en los SNP alrededor de la mutación. Los individuos afectados han heredado la mutación causal de ambos padres y con ella el haplotipo diagnóstico, por tanto la homocigosis compartida en la región cromosómica correspondiente. En un segundo caso, el gen y la mutación causales se identifican por examen molecular detallado de la región cromosómica "homocigota por ascendencia" compartida.

Desde un punto de vista diagnóstico, la detección de individuos portadores +/D se puede hacer en base a la detección de haplotipo diagnóstico o mejor la mutación causal.

Los mamíferos son diploides, lo que significa que tienen dos haplotipos en cada región cromosómica, uno paterno y uno materno. La superposición de los dos haplotipos puede hacer borrosa la interpretación como se ilustra en la figura 1. Para determinar si un individuo tiene un haplotipo definido en una posición del mapa determinada se necesita desenmarañar los haplotipos paterno y materno, un procedimiento conocido como "ajuste de fases". Esto se puede hacer en base a los genotipos parentales disponibles, genotipos de la descendencia, desequilibrio de ligamiento a lo largo de una población o una combinación de estas diferentes fuentes de información. Nótese que incluso si el ajuste fases exacto es imposible, la presencia de un haplotipo específico con frecuencia se puede excluir solo de los análisis de los genotipos sin ajuste de fases.

En 2006 se describió un síndrome letal desconocido hasta entonces en un ternero Holstein danés (Agerholm JS, McEvoy F, Arnbjerg J: Brachyspina syndrome in a Holstein calf. *J Vet Diagn Invest* 2006, 18:418-422). El síndrome se caracterizaba por peso corporal severamente reducido, retraso del crecimiento, malformaciones vertebrales graves asociadas con un acortamiento significativo de la columna vertebral (braquispina) y extremidades largas y delgadas. Además, los animales afectados muestran braquignatismo inferior así como malformación de los órganos internos, en particular el corazón, los riñones y los testículos (4) como se muestra en la figura 2. La causa del síndrome no se pudo determinar. Puesto que el ternero era el resultado del apareamiento artificial entre animales genéticamente relacionados y fenotípicamente normales y como era el único ternero afectado que se produjo en un rebaño de 96 hembras adultas, se podría especular que el incidente se produjo por transmisión por ascendencia de un alelo recesivo defectuoso de un antepasado común. Se identificaron casos adicionales después mediante el

Programa Danés de Enfermedades Genéticas Bovinas (Agerholm JS, Basse A, Christensen K: Investigations on the occurrence of hereditary diseases in the Danish cattle population 1989-1991. Acta Vet Scand 1993, 34:245-253). Pero de nuevo, la causa de la enfermedad no se pudo determinar. Una revisión de Whitlock et al. (*Theriogenology*, 2008, 70 (3): 535-549) discute las etiologías para las anomalías fetales bovinas congénitas y describe seis casos de síndrome de braquispina en la bibliografía antes de la braquispina.

### Compendio de la invención

En vista de lo anterior, el problema técnico subyacente a la presente invención era proporcionar medios y métodos que permitan un diagnóstico selectivo y conveniente de braquispina o del estado de portador para esta enfermedad en ganado vacuno.

La solución a dicho problema técnico se alcanza mediante las formas de realización caracterizadas en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona por primera vez la localización cromosómica del gen que produce braquispina, y se describen haplotipos SNP que están "asociados" con el alelo D y que se pueden utilizar para detección altamente precisa de portadores +/D.

Por tanto, la presente invención proporciona en una primera forma de realización:

un método para determinar si un bovino está afectado por o es portador de braquispina (BS) analizando su ADN genómico, el método comprende los pasos de:

- a) extraer ADN de una muestra de material biológico que contiene dicho ADN genómico obtenido del bovino,
- b)i) genotipar dicho ADN para SNP localizados en el intervalo entre las posiciones de nucleótidos 20156961 y 22499122 en el cromosoma bovino 21, Btau\_4.0, y
- c) determinar si dicho animal tiene el haplotipo de riesgo de braquispina.

El término "bovino" según la presente invención abarca todo el ganado vacuno o razas de ganado vacuno de la especie *bos taurus*. En una forma de realización preferida de los métodos de la presente invención el bovino se selecciona del grupo que consiste en Holstein, Friesian, y razas cruzadas Holstein-Friesian, Friesian británica y/o danesa.

El término "portador de braquispina (BS)" se refiere a un bovino que tiene una mutación que produce el defecto braquispina en uno de sus cromosomas (sea heredado del padre o la madre), y un alelo de tipo salvaje en el otro cromosoma. La mutación que produce braquispina está localizada en el cromosoma bovino 21 en el intervalo entre las posiciones de nucleótidos 20156961 y 22499122 (Btau\_4.0).

El término "muestra" o "muestra biológica" según la presente invención se refiere a cualquier material que contiene células nucleadas de dicho bovino que se va a ensayar. En una forma de realización preferida la muestra biológica que se va a usar en los métodos de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en sangre, semen, raíces capilares, leche, líquidos corporales así como tejidos que incluyan células nucleadas.

Los métodos de extracción/aislamiento y purificación de ADN son bien conocidos en la técnica y se pueden aplicar en la presente invención. A los protocolos estándar para el aislamiento de ADN genómico se hace referencia, entre otros, en Sambrook, J., Russell, D.W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1.31-1.38, 2001 y Sharma. R.C., et al., A rapid procedure for isolation of RNA-free genomic DNA from mammalian cells, *BioTechniques*, 14, 176-178, 1993.

Según la presente invención el término "SNP" se refiere a un polimorfismo de un único nucleótido en una posición particular en el genoma bovino que varía entre una población de individuos. Los SNP se pueden identificar por su localización en la secuencia particular divulgada, es decir, en el intervalo de las posiciones de bases 20156961 y 22499122 en el cromosoma bovino 21 (Btau\_4.0) o su nombre como se muestra en la tabla 1. Los SNP identificados como que son indicativos para el diagnóstico de braquispina según la presente invención se muestran en la tabla 1. Por ejemplo, el SNP BTA-51815 de la tabla 1 indica que la base del nucleótido (o el alelo) en la posición de nucleótido 20210931 en el cromosoma 21 de la secuencia de referencia como se denomina en el presente documento puede ser bien una adenina (A) o una guanina (G). El alelo asociado con o indicativo para braquispina es en el caso del SNP BTA-51815 de la tabla 1 guanina (G).

El término "genotipar dicho ADN para SNP" según la presente invención se refiere a un método para determinar o identificar si una secuencia de nucleótidos particular está presente en una muestra de ADN. Hay varios métodos que conocen los expertos en la materia, por ejemplo (5) para determinar si tal secuencia de nucleótidos está presente en una muestra de ADN. Estos incluyen la amplificación de un segmento de ADN que abarca los SNP que componen el haplotipo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o cualquier otro método de amplificación, e indagar la posición de SNP por medio de hibridación específica de alelo, o el ensayo 3' exonucleasa (ensayo

Taqman), o ensayo de PCR basado en colorante fluorescente y agente de extinción, o el uso de enzimas de restricción específicas de alelo (técnicas basadas en RFLP), o secuenciación directa, o el ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA), o pirosecuenciación, o el ensayo del invasor, o minisequenciación, o técnicas basadas en DHPLC, o polimorfismo conformacional de hebra única (SSCP), o PCR específica de alelo, o electroforesis en gel en gradiente desnaturalizante (DGGE), electroforesis en gel en gradiente de temperatura (TGGE), corte químico por mal apareamiento (CMC), sistema basado en análisis de heterodúplex, técnicas basadas en espectroscopía de masas, ensayo de corte invasor, secuenciación de relación de polimorfismos (PRS), micromatrices, un ensayo de extensión de círculo rodante, técnicas basadas en HPLC, ensayos basados en extensión, ARMS (sistema de mutación refractaria a amplificación), ALEX (extensión lineal de mutación refractaria a amplificación), SBCE (extensión de hebra de base única), un ensayo de baliza molecular, invasor (tecnologías de tercera ola), un ensayo de reacción en cadena de la ligasa, técnicas basadas en ensayo de 5' nucleasa, electroforesis en matriz capilar de hibridación (CAE), ensayo de truncamiento de proteínas (PTT), inmunoensayos e hibridación en fase sólida (transferencia en mancha, transferencia en mancha inversa, chips). Esta lista de métodos no pretende ser exclusiva, sino solo para ilustrar la diversidad de métodos disponibles. Algunos de estos métodos se pueden realizar en formato de micromatriz (microchips) o sobre bolas.

Además se divulga el uso de cebadores o pares de cebadores en donde los cebadores o los pares de cebadores hibrida(n) en condiciones rigurosas con el ADN de la reivindicación 1 que comprende el intervalo entre las posiciones de nucleótidos 20156961 y 22499122 en el cromosoma bovino 21 o a la hebra complementaria del mismo.

Preferiblemente, los cebadores tienen una longitud de al menos 14 nucleótidos tal como 17 o 21 nucleótidos.

En el presente documento se divulgan cebadores que realmente se unen a la posición de los SNP como se hace referencia en la tabla 1. Tal oligonucleótido específico de alelo típicamente es un oligonucleótido de al menos 14 a 21 bases nucleotídicas de longitud diseñado para detectar una diferencia de una única base en la secuencia genética diana del bovino que se va a ensayar. Se pueden aplicar uno o más cebadores específicos para identificar más de un único SNP como se hace referencia en el presente documento. Como consecuencia, cuando se realiza la unión en condiciones rigurosas, tal cebador o tales cebadores es/son útil(es) para distinguir entre diferentes variantes polimórficas ya que la unión solo se produce si las secuencias del cebador y la diana tienen complementariedad completa. Es además preferido que los cebadores tengan una longitud máxima de 24 nucleótidos. Tales cebadores se pueden acoplar con un método de detección apropiado tal como una reacción de elongación o una reacción de amplificación que se puede usar para diferenciar entre las variantes polimórficas y después sacar conclusiones con respecto a, por ejemplo, la predisposición del ganado vacuno o ternera en investigación para braquiespina.

La hibridación preferiblemente se realiza en condiciones rigurosas o altamente rigurosas. Las "condiciones rigurosas o altamente rigurosas" de hibridación las conoce bien o las puede establecer el experto en la materia según protocolos convencionales. Las condiciones rigurosas apropiadas para cada secuencia se pueden establecer basándose en parámetros bien conocidos tales como temperatura, composición de las moléculas de ácido nucleico, condiciones de sal, etc.: véase, por ejemplo, Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual"; CSH Press, Cold Spring Harbor, 1989 o Higgins y Hames (eds.), "Nucleic acid hybridization, a practical approach", IRL Press, Oxford 1985, véase en particular el capítulo "Hybridization Strategy" por Britten & Davidson, 3 a 15. Las condiciones (altamente rigurosas) típicas comprenden la hibridación a 65°C en SSC 0,5x y SDS al 0,1% o la hibridación a 42°C en formamida al 50%, SSC 4x y SDS al 0,1%. La hibridación habitualmente va seguida por lavados para eliminar las señales inespecíficas. Las condiciones de lavado incluyen condiciones tales como 65°C, SSC 0,2x y SDS al 0,1% o SSC 2x y SDS al 0,1% o SSC 0,3x y SDS al 0,1% a 25°C-65°C.

El término "posiciones de bases 20156961 y 22499122 en el cromosoma bovino 21" se refiere a la secuencia de referencia de bos taurus Btau\_4.0 que se puede recuperar de, por ejemplo, de los navegadores genómicos UCSC, Ensembl y NCBI. Btau\_4.0 se generó mediante el sistema de ensamblaje genómico Atlas en Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center. La estrategia de secuenciación combinó lecturas aleatorias de BAC con lecturas aleatorias del genoma completo de genotecas de insertos pequeños así como secuencias terminales BAC. La secuencia de nucleótidos para las posiciones de las bases 20156961 a 22499122 del cromosoma bovino 21 (Btau\_4.0) como se denomina en el presente documento se muestra en SEQ ID NO: 1.

El término "haplotipo de riesgo de braquiespina" como se usa en el presente documento se refiere a combinaciones alélicas en uno o más SNP que mapean en las posiciones de bases 20156961 y 22499122 en el cromosoma bovino 21, que se asocian con BS. 104 de estos SNP, que se pueden genotipar con las dos matrices de SNP de Illumina™ más comúnmente usadas (referencias 3 y 6), se enumeran en la tabla 1 que también describe para cada SNP el alelo asociado a BS y su frecuencia en la población Holstein-Friesian. Esta lista de SNP no pretende ser exhaustiva. La secuenciación de muestras de ADN de individuos afectados y/o portadores y controles, en el intervalo correspondiente o incluso regiones flanqueantes, usando métodos que conocen bien los expertos en la materia, revelará SNP adicionales que muestran grados variables de asociación con BS y se podrían usar para realizar el diagnóstico para BS de la misma manera que se realiza en los ejemplos descritos en esta invención en base a los SNP enumerados en la tabla 1. La especificidad y sensibilidad de la prueba diagnóstica aumentará con el número de

SNP incluidos en el análisis. Sin embargo, hemos demostrado que la especificidad/sensibilidad máxima se alcanza fácilmente con un número relativamente pequeño de SNP. Por tanto, en una forma de realización preferida de la presente invención un único SNP como se hace referencia anteriormente es indicativo para el diagnóstico de BS. En otra forma de realización de la presente invención se pueden aplicar al menos 5 SNP como se identifican en el presente documento en la tabla 1 para el diagnóstico de BS. Los SNP que se van a analizar preferiblemente en el método diagnóstico de la presente invención son los que tienen la menor frecuencia en la población general Holstein-Friesian. Por tanto, se pueden clasificar los SNP en la tabla 1 al aumentar la frecuencia alélica e incluir SNP para una prueba diagnóstica empezando desde la parte superior de la lista. Se ha mostrado que incluso cuando se trabaja con datos "sin ajuste de fases" (véase posteriormente en el presente documento) los siete mejores SNP proporcionan sensibilidad/especificidad óptima.

Para determinar si un individuo tiene un haplotipo definido en una posición determinada del mapa de la secuencia puede ser necesario desenmarañar los haplotipos paterno y materno, un procedimiento conocido como "ajuste de fases". Puesto que los bovinos son diploides, la información del haplotipo (o fase) no está inmediatamente disponible. Como ejemplo, dos SNP que están en el mismo cromosoma, ambos con alelos C y G. Si se observan ambos SNP como heterocigotos, no está claro si un cromosoma contiene el alelo C en ambos loci y el otro cromosoma contiene el alelo G en ambos loci, o si un cromosoma contiene el alelo C en el primer locus y el alelo G en el segundo locus y el otro cromosoma contiene los alelos G y C, respectivamente.

Obtener los haplotipos es el primer paso para muchos tipos de análisis de variaciones de SNP. La construcción de haplotipos a partir de la información del genotipo diploide (es decir, el ajuste de fases de los genotipos) se puede hacer basándose en los genotipos parentales disponibles, genotipos de la descendencia, desequilibrio de ligamiento en la población o una combinación de estas diferentes fuentes de información. Los alelos de los SNP que están físicamente localizados muy cerca entre sí en un cromosoma con frecuencia están correlacionados ("desequilibrio de ligamiento") entre sí. Por tanto, en la mayoría de las regiones cortas, hay una variabilidad genética limitada, y existe solo un pequeño número de secuencias alélicas (haplotipos) en una población. La estructura del haplotipo de una región determinada depende de factores evolucionarios y de genética de poblaciones tales como tasas de mutación y recombinación, selección y antecedentes de la población. Se han desarrollado programas informáticos para estimar y asignar la fase a partir de los datos de genotipos diploides (por ejemplo, Stephens et al. 2001, Am. J. Hum. Genet. 68: 978-989; Halperin y Eskin 2004; Bioinformatics 20:1842-1849 y Druet et al., sin publicar).

Por tanto, en una forma de realización preferida de la presente invención, el método descrito anteriormente de la presente invención comprende el paso adicional b)ii), que produce un

método para determinar si un bovino está afectado por o es un portador de braquispina (BS) analizando su ADN genómico, el método comprende los pasos de:

- a) extraer el ADN de una muestra de material biológico que contiene dicho ADN genómico obtenido del bovino,
- b)i) genotipar dicho ADN para SNP localizados en el intervalo entre las posiciones de nucleótidos 20156961 y 22499122 en el cromosoma bovino 21, Btau\_4.0, y
- b)ii) ajuste de fases del genotipo de SNP de dicho bovino
- c) determinar si dicho animal tiene el haplotipo de riesgo de braquispina.

En una forma de realización adicional de la presente invención se proporciona un método para determinar si un bovino es un portador de braquispina (BS) analizando su ARN, el método comprende los pasos de:

- a) extraer el ARN de una muestra de material biológico que contiene dicho ARN obtenido del bovino,
- b)i) genotipar dicho ARN para SNP localizados en el intervalo entre las posiciones de nucleótidos 20156961 y 22499122 en el cromosoma bovino 21, Btau\_4.0, y
- b)ii) ajuste de fases del genotipo de SNP de dicho bovino
- c) determinar si dicho animal tiene el haplotipo de riesgo de braquispina.

"ARN" como se denomina en el presente documento abarca todos los tipos de ARN.

Técnicas bien conocidas en la materia para permitir el aislamiento del ARN total, ARN mitocondrial o ARN mensajero. El experto en la materia puede seleccionar un método de extracción adecuado sin más dependiendo de la naturaleza de la muestra que se va a ensayar.

Si se va a usar una muestra que contiene ARN como molde para una reacción de amplificación, será necesario transcribir dicho ARN a ADNc antes de que la amplificación se pueda llevar a cabo. De nuevo, las técnicas para hacer eso las conoce bien el experto en la materia. Como ejemplo el ARN se puede purificar con el mini kit RNeasy™ (Qiagen). El ARN se someterá después a transcripción inversa a ADNc usando, por ejemplo, el sistema SuperScript™ Choice (Invitrogen).

Además, el ARN, o el ADN genómico obtenido del sujeto bovino se puede secuenciar para identificar las mutaciones que pueden dar huellas características de mutaciones en la secuencia de ácido nucleico al que se hace referencia

en el presente documento, en el intervalo de las posiciones de bases 20156961 y 22499122 en el cromosoma bovino 21 (Btau\_4.0). Además se proporcionan métodos en donde tal huella se puede generar mediante RFLP de ADN o ARN obtenidos del sujeto bovino, opcionalmente el ADN o ARN se puede amplificar antes del análisis, los métodos de lo cual se conocen bien en la técnica. Las huellas de ARN se pueden realizar mediante, por ejemplo, digestión de una muestra de ARN obtenida del sujeto con una RNasa adecuada, o una ribozima y, por ejemplo, separación electroforética y detección de los fragmentos de ARN.

Además, la posibilidad de detectar animales que son portadores de BS se puede utilizar muy eficazmente para la selección asistida por marcador para aumentar la fertilidad. En efecto hemos demostrado en la presente invención que el estado de portador para BS se correlaciona fuertemente con la fertilidad, uno de los rasgos económicos más importantes en el ganado vacuno. En efecto, solo se han descrito ocho terneros afectados por braquispina en la población de ganado vacuno lechero Holstein-Friesian hasta la fecha. Sin embargo, el alelo D es mucho más común de lo que se esperaría de la incidencia aparentemente baja de la enfermedad. En esta invención demostramos que los sementales portadores +/D se caracterizan por un descenso altamente significativo en la "tasa de no retorno". Esto se debe al hecho de que cuando se aparean con vacas +/D (se estima que representan el 10% de la población HF), un cuarto de los embriones están afectados D/D y morirán temprano en el desarrollo lo que produce que la vaca aborte y "vuelva al cielo". Por tanto, la braquispina es un asunto mucho más importante en el ganado vacuno que lo reflejado por la incidencia de terneras nacidas afectadas. Por tanto, detectar los portadores de /D se puede usar para la selección asistida por marcador para aumentar la fertilidad.

Como resultado de esta invención, ahora es posible detectar animales portadores +/D para BS por medio de pruebas genéticas sencillas realizadas en un ácido nucleico extraído de las muestras biológicas que se originan de dichos animales y usar la información obtenida por los métodos de la presente invención para la selección asistida por marcador para la fertilidad aumentada.

El término "selección asistida por marcador para fertilidad aumentada" según la presente invención se refiere al uso de "información de marcadores" correspondientes de hecho a genotipos para SNP localizados entre las posiciones de nucleótidos 20156961 y 22499122 en el cromosoma bovino 21 (Btau\_4.0) para identificar animales que son portadores del haplotipo de riesgo de BS según los procedimientos descritos anteriormente, y de esta manera obtener información sobre su valor de apareamiento para fenotipos relacionados con la fertilidad de machos o hembras. Es notable que una forma novedosa de selección asistida por marcador se ha introducido recientemente denominada "selección genética" (véase, por ejemplo, la referencia 7). La información sobre la presencia o ausencia del haplotipo de riesgo de BS se utilizará si el procedimiento de selección genómica se fuera a aplicar para rasgos relacionados con la fertilidad tanto de machos como de hembras. La selección genética para tales rasgos, por tanto, utilizaría información que se divulga por primera vez en la presente invención.

### Breve descripción de las figuras

**Figura 1:** Ilustración de los principios genéticos subyacentes al uso de haplotipos diagnósticos para detectar portadores de BS. **A.** Identificación del haplotipo diagnóstico como una región de homocigosis compartida por todos los individuos afectados. **B.** "Ajuste de fases" basado en la información parental. Los genotipos sin ajuste de fase se determinan experimentalmente en un trío (padre, madre y descendencia) y se muestran como "x,y". El examen del genotipo del trío para un SNP determinado permite la clasificación de los alelos de la descendencia según el origen parental que equivale al "ajuste de fases". El desenlace (genotipos en fases) está encuadrado, lo que permite la identificación del haplotipo diagnóstico en la descendencia lo que demuestra que es un portador de BS. **C.** Uso de los genotipos sin ajuste de fases para detectar portadores. Los genotipos "R(echazados)", incompatibles con el estado portador se muestran en los individuos sin ajuste de fases lo que permite la exclusión del estado de portador para el individuo "A" pero no "B".

**Figura 2:** Ternera recién nacida Holstein-Friesian con braquispina.

**Figura 3:** Mapeo de autocigosis del locus de braquispina. **A.** Genotipos de casos y controles para SNP del cromosoma 21. Los genotipos homocigotos se muestran en gris (amarillo) o blanco, los genotipos heterocigotos en negro (rojo). Los bloques solapantes de homocigosis extendida se muestran en negro y gris marcados con una línea. Los límites y tamaño de la homocigosis compartida del haplotipo e idéntica por estado entre todos los casos se marca en negro (rojo). **B.** Contenido génico del segmento cromosómico compartido.

**SEQ ID NO 1:** Secuencia de nucleótidos para las posiciones de bases 20156961 y 22499122 del cromosoma bovino 21 (Btau\_4.0).

### Descripción detallada de la invención

#### Mapeo del gen y la mutación que producen BS a BTA21

Para colocar el gen que produce BS, se recogieron muestras de tejidos de seis individuos afectados en la población de ganado vacuno lechero Holstein-Friesian. Las muestras eran originarias de los Países Bajos, Dinamarca e Italia.

Se extrajo el ADN de las muestras de tejido y se genotipó usando un panel previamente descrito de 60.000 SNP bovinos (panel de 60K de HG) (3), junto a muestras control de individuos control sanos de la misma raza. Los genotipos resultantes se examinaron visualmente así como con los programas previamente descritos ASSHOM y ASSIST (3). Se identificó fácilmente una región cromosómica que abarca 2,46 Mb de homocigosis compartida por ascendencia por los seis individuos afectados. Se mostró que el haplotipo que se comparte era altamente significativo. La región crítica, unida por los sucesos de recombinación más próximos, abarcaba 56 genes anotados (figura 3).

#### Definición de un haplotipo SNP diagnóstico para BS usando el panel 60 K de HG (3)

La tabla 1 muestra el haplotipo (obtenido con el panel de SNP de 60K de HG (3)) de homocigosis compartida por todos los casos en la región crítica. Para examinar la sensibilidad y especificidad de este haplotipo en la identificación de portadores +/D, se genotiparon 1999 animales Holstein-Friesian holandeses con el mismo panel de SNP. Se hizo el ajuste de fase de los genotipos BTA21 usando software construido a propósito y se identificaron los animales que tienen el haplotipo de BS en uno de sus cromosomas. Se observaron 193 de tales animales correspondientes a una frecuencia de portadores de BS del 9,7%. Los análisis genealógicos mostraron que todos los portadores de BS se remontaban a un antepasado común ("Sweet-Haven Tradition TM"), mientras que 186 de ellos se remontaban al hijo de Sweet-Haven Tradition: "Bis-May Tradition Cleitus". Estos sementales muy populares deben haber propagado el defecto en la población general debido a su extenso uso por inseminación artificial.

#### Efecto del estado de portador de BS sobre la fertilidad

El 9,7% de incidencia de portadores del haplotipo de BS, incluyendo algunos sementales populares, sugiere que BS debe ser mucho más común que lo observado. La mayoría de los portadores del haplotipo no se sabía realmente que eran portadores de BS. Razonamos que esto se podría deber al hecho de que la mayoría de los casos de BS abortarían prematuramente. Para probar esta hipótesis examinamos la tasa de no retorno ("en celo") después de la inseminación con semen de portadores putativos de BS que tienen el haplotipo diagnóstico. En efecto se observó un efecto altamente significativo del haplotipo de BS en la "tasa de no retorno" (tabla 2). La significación del efecto era mayor para la tasa de no retorno a los 270 días tras la inseminación, lo que sugiere que muchos fetos afectados mueren relativamente tarde durante la gestación. El alelo D de BS es por tanto un determinante principal no solo del defecto BS sino también de la fertilidad, uno de los rasgos económicamente más importantes en ganado vacuno.

#### Especificidad y sensibilidad del haplotipo diagnóstico de BS sin ajuste de fases

En un número de casos puede no ser posible el ajuste de fases de forma precisa de los genotipos SNP de ciertos individuos. Para probar si el haplotipo específico de BS se podría usar como un diagnóstico en ausencia de ajuste de fases se intentó detectar portadores putativos en la misma población usando sus genotipos SNP sin ajuste de fases. La sensibilidad de la prueba (probabilidad de detectar portadores verdaderos) fue del 100%, mientras que la especificidad fue  $193/198 = 98\%$ . Solo 4 de 1.086 no portadores se marcaron erróneamente como portadores. El número mínimo de SNP necesarios para alcanzar esta sensibilidad y especificidad fue 7.

#### Definición de SNP diagnósticos adicionales en la región crítica de BS

Los 55 SNP del panel de 60K de HG que mapean en la región crítica de BS definidos como se describe anteriormente, son por supuesto solo una fracción de todos los SNP que mapean en ese intervalo. Para identificar SNP diagnósticos adicionales, y por tanto aumentar la sensibilidad y especificidad del haplotipo diagnóstico de BS se genotiparon seis casos y 20 controles para el panel de 60K de dominio público (6). Usando el mismo planteamiento que se ha descrito anteriormente, identificamos una región compartida de homocigosis que coincide con la localización previamente definida. La tabla 1 enumera todos los SNP en la región crítica de BS con el alelo correspondiente en el haplotipo específico de BS. Los SNP enumerados en la tabla 1 se pueden usar todos en aislamiento o preferiblemente conjuntamente para definir el estado de portador de BS de los animales.

Tabla 1

**Cr:** Cromosoma. **Posición:** posición en el cromosoma según la construcción bovina 4. **SNP:** nombre del correspondiente marcador SNP. **HG:** "1" si está presente en el panel de SNP de 60K de HG (3), "0" si no. **USDA:** "1" si está presente en el panel de SNP de 60K de USDA (6), "0" si no. **Alelo asociado:** alelo SNP asociado con braquispina; por tanto, la columna correspondiente muestra el haplotipo diagnóstico asociado a D. **Alelos SNP:** dos alelos observados en el marcador SNP. Los alelos son alelos de hebra "TOP" como se definen por illumina ([http://www.illumina.com/downloads/TopBot\\_TechNote.pdf](http://www.illumina.com/downloads/TopBot_TechNote.pdf)). **Frecuencia en HF:** frecuencia del alelo asociado a BS en la población de ganado vacuno lechero Holstein-Friesian general.

| Cr | Posición | SNP                | HG | USDA | Alelo asociado | Alelos en SNP | Frecuencia en HF |
|----|----------|--------------------|----|------|----------------|---------------|------------------|
| 21 | 20210931 | BTA-51815          | 1  | 0    | G              | A/G           | 1,00             |
| 21 | 20337858 | BTA-51861          | 1  | 1    | G              | C/G           | 0,44             |
| 21 | 20364700 | BTA-51857          | 1  | 1    | G              | A/G           | 0,76             |
| 21 | 20366897 | AAFC03011270_47578 | 1  | 0    | A              | G/A           | 0,84             |
| 21 | 20544330 | BTA-51853          | 1  | 1    | A              | A/G           | 0,18             |
| 21 | 20544570 | BTA-51854          | 1  | 0    | A              | A/C           | 0,90             |
| 21 | 20582402 | BTA-51851          | 1  | 0    | A              | A/G           | 0,55             |
| 21 | 20586553 | rs29010525         | 1  | 0    | G              | G/A           | 0,55             |
| 21 | 20667206 | BTA-51845          | 1  | 0    | A              | A/C           | 1,00             |
| 21 | 20731181 | BTA-51842          | 1  | 0    | G              | G/A           | 0,67             |
| 21 | 20742499 | BTA-51841          | 1  | 0    | G              | A/G           | 0,92             |
| 21 | 20789000 | rs29025252         | 1  | 0    | A              | A/G           | 0,36             |
| 21 | 20901477 | BTA-51832          | 1  | 0    | G              | G/A           | 0,65             |
| 21 | 20929009 | rs29025814         | 1  | 0    | G              | A/G           | 0,61             |
| 21 | 20943223 | BTA-51830          | 1  | 1    | C              | A/C           | 1,00             |
| 21 | 20978343 | AAFC03014285_21630 | 1  | 0    | C              | G/C           | 0,75             |
| 21 | 21130893 | BTA-51825          | 1  | 0    | A              | A/G           | 0,37             |
| 21 | 21130998 | BTA-51823          | 1  | 0    | A              | G/A           | 0,46             |
| 21 | 21334087 | BTA-103368         | 1  | 1    | G              | A/G           | 0,57             |
| 21 | 21387128 | rs41255242         | 1  | 0    | G              | C/G           | 0,91             |
| 21 | 21408374 | BTA-51680          | 1  | 1    | G              | A/G           | 0,72             |
| 21 | 21420174 | AAFC03073089_95547 | 1  | 0    | C              | C/A           | 0,61             |
| 21 | 21420210 | AAFC03073089_95511 | 1  | 0    | G              | G/A           | 0,51             |
| 21 | 21444738 | rs41256936         | 1  | 1    | C              | A/C           | 0,51             |
| 21 | 21460288 | rs41257179         | 1  | 0    | G              | A/G           | 0,99             |
| 21 | 21479744 | rs29014661         | 1  | 0    | G              | G/A           | 0,99             |
| 21 | 21515373 | MARC_5771_167      | 1  | 0    | A              | G/A           | 0,01             |
| 21 | 21524388 | MARC_10265_358     | 1  | 0    | G              | A/G           |                  |
| 21 | 21579587 | AAFC03067076_8944  | 1  | 0    | G              | G/A           | 0,53             |
| 21 | 21599379 | BTA-51683          | 1  | 1    | A              | A/G           | 0,12             |
| 21 | 21634774 | AAFC03067076_64131 | 1  | 0    | A              | A/G           | 0,98             |
| 21 | 21637755 | BTA-51688          | 1  | 0    | G              | G/A           | 1,00             |
| 21 | 21637763 | BTA-51687          | 1  | 1    | A              | A/G           | 1,00             |
| 21 | 21680619 | BTA-51690          | 1  | 0    | A              | A/G           | 0,88             |
| 21 | 21680962 | BTA-51691          | 1  | 1    | A              | A/G           | 0,88             |

|    |          |                     |   |   |   |     |      |
|----|----------|---------------------|---|---|---|-----|------|
| 21 | 21703136 | BTA-51698           | 1 | 0 | G | A/G | 0,88 |
| 21 | 21758037 | BTA-51705           | 1 | 0 | A | A/G | 0,75 |
| 21 | 21758399 | BTA-51703           | 1 | 0 | G | G/A | 0,98 |
| 21 | 21799845 | rs29013408          | 1 | 0 | A | C/A | 0,05 |
| 21 | 21802849 | rs29011191          | 1 | 0 | G | G/A | 1,00 |
| 21 | 21842075 | BTA-51706           | 1 | 1 | A | A/G | 0,27 |
| 21 | 21842374 | BTA-51707           | 1 | 0 | A | G/A | 0,27 |
| 21 | 21842607 | BTA-51708           | 1 | 0 | G | G/A | 0,27 |
| 21 | 21844764 | BTA-51709           | 1 | 0 | A | G/A | 0,27 |
| 21 | 21845177 | BTA-51710           | 1 | 0 | A | G/A | 0,27 |
| 21 | 21878170 | rs41257392          | 1 | 0 | A | G/A | 0,61 |
| 21 | 21879104 | rs41257391          | 1 | 0 | A | A/G | 0,61 |
| 21 | 21879422 | BTA-51712           | 1 | 0 | A | G/A | 0,27 |
| 21 | 21881965 | rs29014085          | 1 | 0 | C | C/G | 0,83 |
| 21 | 21882408 | rs29014086          | 1 | 0 | G | G/C | 0,43 |
| 21 | 21884591 | rs29017173          | 1 | 1 | G | A/G | 0,43 |
| 21 | 21885102 | rs29027896          | 1 | 0 | G | G/A | 0,09 |
| 21 | 21976975 | BTA-51717           | 1 | 0 | T | T/A | 0,54 |
| 21 | 22090017 | BTA-51720           | 1 | 0 | A | A/C | 0,39 |
| 21 | 22184009 | MARC_17853_555      | 1 | 0 | G | A/G | 0,56 |
| 21 | 22438081 | BTA-51730           | 1 | 0 | G | G/A | 0,22 |
| 21 | 20156961 | ARS-BFGL-NGS-5115   | 0 | 1 | G | A/G |      |
| 21 | 20238162 | ARS-BFGL-NGS-73374  | 0 | 1 | G | A/G |      |
| 21 | 20301286 | BTB-00809722        | 0 | 1 | G | A/G |      |
| 21 | 20412681 | ARS-BFGL-NGS-73507  | 0 | 1 | G | A/G |      |
| 21 | 20437620 | ARS-BFGL-NGS-114604 | 0 | 1 | A | A/G |      |
| 21 | 20465413 | ARS-BFGL-NGS-109350 | 0 | 1 | G | A/G |      |
| 21 | 20494761 | ARS-BFGL-NGS-40159  | 0 | 1 | A | A/G |      |
| 21 | 20572597 | ARS-BFGL-NGS-111076 | 0 | 1 | A | A/G |      |
| 21 | 20594307 | ARS-BFGL-NGS-41852  | 0 | 1 | A | A/C |      |
| 21 | 20645137 | ARS-BFGL-NGS-20711  | 0 | 1 | A | A/G |      |
| 21 | 20671339 | ARS-BFGL-NGS-103695 | 0 | 1 | G | A/G |      |
| 21 | 20700857 | ARS-BFGL-NGS-28897  | 0 | 1 | G | A/G |      |
| 21 | 20749818 | ARS-BFGL-NGS-9301   | 0 | 1 | A | A/G |      |
| 21 | 20777531 | ARS-BFGL-NGS-55347  | 0 | 1 | A | A/G |      |
| 21 | 20821117 | ARS-BFGL-NGS-       | 0 | 1 | G | A/G |      |

|        |          |                   |   |   |   |     |
|--------|----------|-------------------|---|---|---|-----|
| 116820 |          |                   |   |   |   |     |
|        |          | ARS-BFGL-NGS-     |   |   |   |     |
| 21     | 20867555 | 68815             | 0 | 1 | C | A/C |
|        |          | ARS-BFGL-NGS-     |   |   |   |     |
| 21     | 20915894 | 90795             | 0 | 1 | A | A/C |
| 21     | 20973962 | ARS-BFGL-NGS-1518 | 0 | 1 | A | A/G |
| 21     | 21002263 | BTB-00810142      | 0 | 1 | A | A/G |
| 21     | 21033634 | ARS-BFGL-NGS-4300 | 0 | 1 | G | A/G |
| 21     | 21060959 | ARS-BFGL-NGS-2185 | 0 | 1 | C | A/C |
|        |          | ARS-BFGL-NGS-     |   |   |   |     |
| 21     | 21126216 | 73451             | 0 | 1 | G | A/G |
|        |          | ARS-BFGL-NGS-     |   |   |   |     |
| 21     | 21161783 | 84831             | 0 | 1 | G | A/G |
|        |          | ARS-BFGL-NGS-     |   |   |   |     |
| 21     | 21189367 | 107467            | 0 | 1 | G | A/G |
|        |          | ARS-BFGL-BAC-     |   |   |   |     |
| 21     | 21268812 | 29118             | 0 | 1 | A | A/G |
| 21     | 21304703 | ARS-BFGL-NGS-2993 | 0 | 1 | G | A/G |
|        |          | ARS-BFGL-NGS-     |   |   |   |     |
| 21     | 21379285 | 98331             | 0 | 1 | G | A/G |
| 21     | 21477313 | ARS-BFGL-NGS-8229 | 0 | 1 | A | A/G |
|        |          | ARS-BFGL-NGS-     |   |   |   |     |
| 21     | 21537025 | 114140            | 0 | 1 | T | A/T |
| 21     | 21597598 | rs29012316        | 0 | 1 | A | A/C |
|        |          | ARS-BFGL-NGS-     |   |   |   |     |
| 21     | 21720017 | 117140            | 0 | 1 | A | A/G |
| 21     | 21758119 | BTA-51704         | 0 | 1 | A | A/G |
|        |          | ARS-BFGL-NGS-     |   |   |   |     |
| 21     | 21804110 | 75707             | 0 | 1 | A | A/G |
|        |          | ARS-BFGL-NGS-     |   |   |   |     |
| 21     | 21945257 | 114226            | 0 | 1 | G | A/G |
|        |          | ARS-BFGL-NGS-     |   |   |   |     |
| 21     | 21984295 | 117285            | 0 | 1 | G | A/G |
|        |          | ARS-BFGL-NGS-     |   |   |   |     |
| 21     | 22006620 | 30365             | 0 | 1 | A | A/G |
|        |          | ARS-BFGL-NGS-     |   |   |   |     |
| 21     | 22064332 | 104725            | 0 | 1 | G | A/G |
|        |          | ARS-BFGL-NGS-     |   |   |   |     |
| 21     | 22146097 | 102389            | 0 | 1 | G | A/G |
|        |          | ARS-BFGL-NGS-     |   |   |   |     |
| 21     | 22174625 | 112524            | 0 | 1 | G | A/G |
|        |          | ARS-BFGL-NGS-     |   |   |   |     |
| 21     | 22214329 | 11578             | 0 | 1 | A | A/G |
|        |          | ARS-BFGL-NGS-     |   |   |   |     |
| 21     | 22250027 | 69616             | 0 | 1 | G | A/G |
|        |          | ARS-BFGL-NGS-     |   |   |   |     |
| 21     | 22277790 | 21312             | 0 | 1 | G | A/G |
|        |          | ARS-BFGL-NGS-     |   |   |   |     |
| 21     | 22308860 | 61826             | 0 | 1 | A | A/C |

|    |          |                         |   |   |   |     |
|----|----------|-------------------------|---|---|---|-----|
| 21 | 22347222 | ARS-BFGL-NGS-<br>21956  | 0 | 1 | A | A/G |
| 21 | 22397339 | ARS-BFGL-NGS-<br>69585  | 0 | 1 | G | A/G |
| 21 | 22424651 | ARS-BFGL-NGS-<br>80218  | 0 | 1 | G | A/G |
| 21 | 22447335 | DIAS-244                | 0 | 1 | G | A/G |
| 21 | 22499122 | ARS-BFGL-NGS-<br>110151 | 0 | 1 | G | A/G |

**Tabla 2:** Efecto del estado portador de BS en la fertilidad femenina

| rasgo                         | novillas                                          |                                |                 | vacas                                             |                                |                 |
|-------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------|---------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------|
|                               | Diferencia observada (portador de BS-no portador) | Intervalo de confianza del 95% |                 | Diferencia observada (portador de BS-no portador) | Intervalo de confianza del 95% |                 |
|                               |                                                   | límite inferior                | límite superior |                                                   | límite inferior                | límite superior |
| NR 56 <sup>1</sup>            | 0,59%                                             | -0,27%                         | 1,45%           | 1,71%                                             | 1,33%                          | 2,09%           |
| NR 90                         | 1,58%                                             | 0,68%                          | 2,48%           | 2,80%                                             | 2,41%                          | 3,18%           |
| NR 270                        | 3,00%                                             | 2,07%                          | 3,92%           | 3,20%                                             | 2,82%                          | 3,59%           |
| Muerte fetal                  | -0,82%                                            | -1,50%                         | -0,15%          | -0,06                                             | -0,25%                         | 0,14%           |
| Tasa de eliminación selectiva | -2,40%                                            | -1,62%                         | -3,17%          | -1,17%                                            | -0,85%                         | -1,48%          |
| Total <sup>2</sup>            | 4,57%                                             | 3,65%                          | 5,49%           | 4,31%                                             | 3,77%                          | 4,85%           |

<sup>1</sup>NR "x" es la tasa de no retorno en el día "x" tras la inseminación. <sup>2</sup>El número total de fracasos es NR 270 menos la tasa de eliminación selectiva menos la muerte fetal.

## Referencias

- Shuster DE, Kehrl ME Jr, Ackermann MR, Gilbert RO. (1992) Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89:9225-9229.
- Thomsen B, Horn P, Panitz F, Bendixen E, Petersen AH, Holm LE, Nielsen VH, Agerholm JS, Arnbjerg J, Bendixen C. (2006) A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. *Genome Res*. 16:97-105. Epub 12 Dic. 2005.
- Charlier C, Coppieters W, Rollin F, Desmecht D, Agerholm JS, Cambisano N, Carta E, Dardano S, Dive M, Fasquelle C, Frennet JC, Hanset R, Hubin X, Jorgensen C, Karim L, Kent M, Harvey K, Pearce BR, Simon P, Tama N, Nie H, Vandeputte S, Lien S, Longeri M, Fredholm M, Harvey RJ, Georges M. (2008) Highly effective SNP-based association mapping and management of recessive defects in livestock. *Nat Genet*. 40:449-54. Epub 16 Mar 2008.
- Agerholm J.S. y Peperkamp K. (2007) Familial occurrence of Danish and Dutch cases of the bovine brachyspina syndrome. *BMC Vet Res*. 3:8.
- Syvanen, A.C. (2001) Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature Reviews Genetics* 2: 930-942.
- Van Tassell CP, Smith TP, Matukumalli LK, Taylor JF, Schnabel RD, Lawley CT, Haudenschild CD, Moore SS, Warren WC, Sonstegard TS. (2008) SNP discovery and allele frequency estimation by deep sequencing of reduced representation libraries. *Nat Methods* 5:247-52. Epub 24 Feb. 2008.
- Meuwissen TH, Hayes BJ, Goddard ME. (2001) Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*. Abr. 2001; 157(4): 1819-29.

# REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si un bovino está afectado por o es portador de braquispina (BS) analizando su ADN genómico, el método comprende los pasos de:  
5  
a) extraer el ADN de una muestra de material biológico que contiene dicho ADN genómico obtenido del bovino,  
b)i) genotipar dicho ADN para SNP localizados en el intervalo entre las posiciones de nucleótidos 20156961 y 22499122 en el cromosoma bovino 21, Btau\_4, y  
c) determinar si dicho animal tiene el haplotipo de riesgo de braquispina.
2. Un método para determinar si un bovino está afectado por o es portador de braquispina (BS) analizando su ARN, el método comprende los pasos de:  
a) extraer el ARN de una muestra de material biológico que contiene dicho ARN obtenido del bovino,  
b)i) genotipar dicho ARN para SNP localizados en el intervalo entre las posiciones de nucleótidos 20156961 y 22499122 en el cromosoma bovino 21, Btau\_4, y  
c) determinar si dicho animal tiene el haplotipo de riesgo de braquispina.  
10
3. El método de la reivindicación 1 o 2 que comprende además el paso de:  
b)ii) ajuste de fases del genotipo SNP de dicho bovino.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los SNP utilizados son como se definen en la  
15 tabla 1.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la identificación de al menos un SNP es indicativa de braquispina en dicho bovino.
- 20 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la identificación de al menos 5 SNP es indicativa de braquispina en dicho bovino.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre, semen, raíces capilares, leche, líquidos corporales y/o tejidos que incluyen células nucleadas.  
25
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el bovino se selecciona de la especie bos taurus.
- 30 9. El método según la reivindicación 8 en donde el bovino se selecciona del grupo que consiste en Holstein, Friesian y razas cruzadas Holstein-Friesian, Friesian británica y/o holandesa.
10. Uso del método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para realizar la selección asistida por marcador o selección genómica para fertilidad aumentada en dicho bovino.  
35

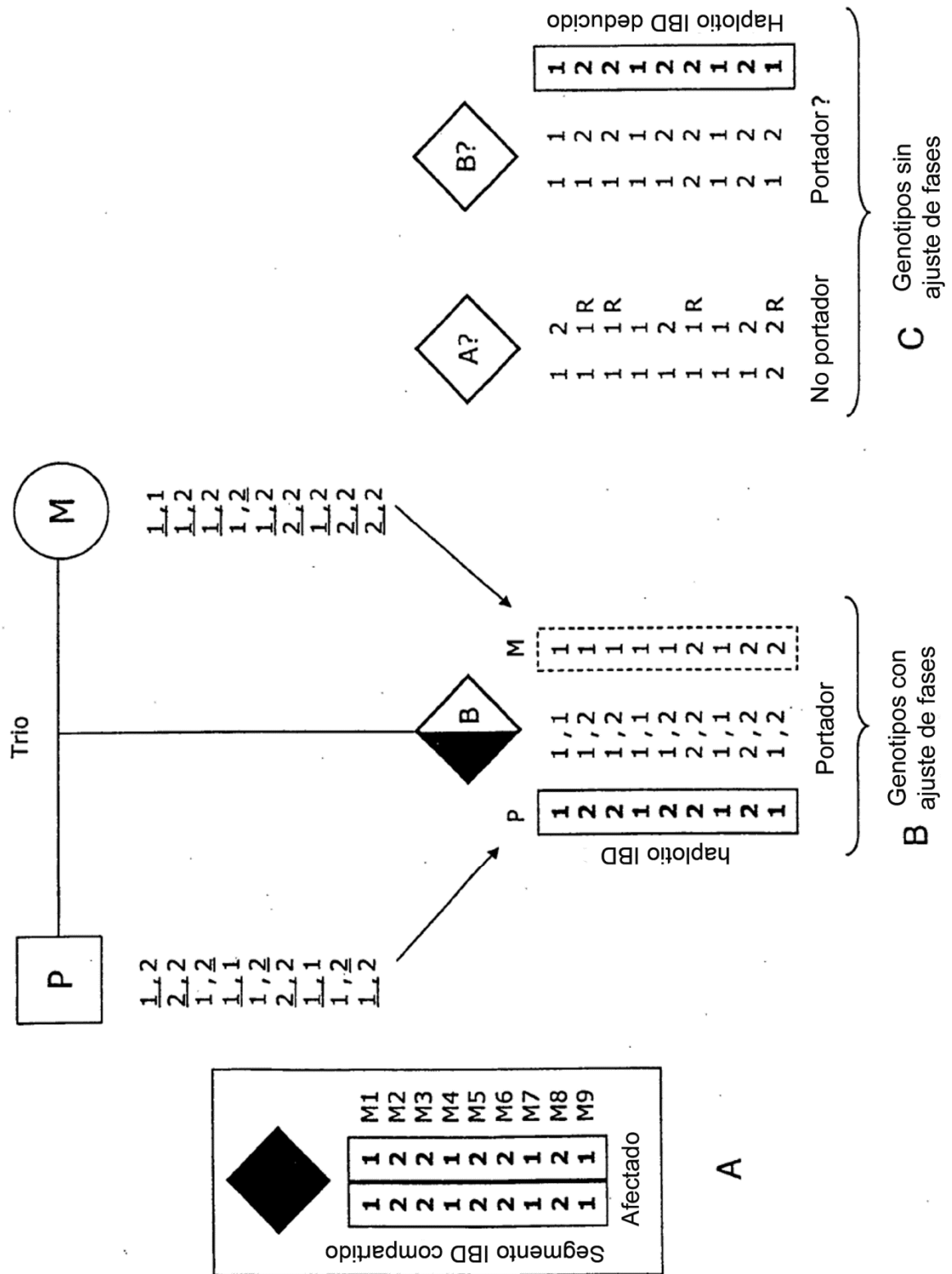


Figura 1



Figura 2

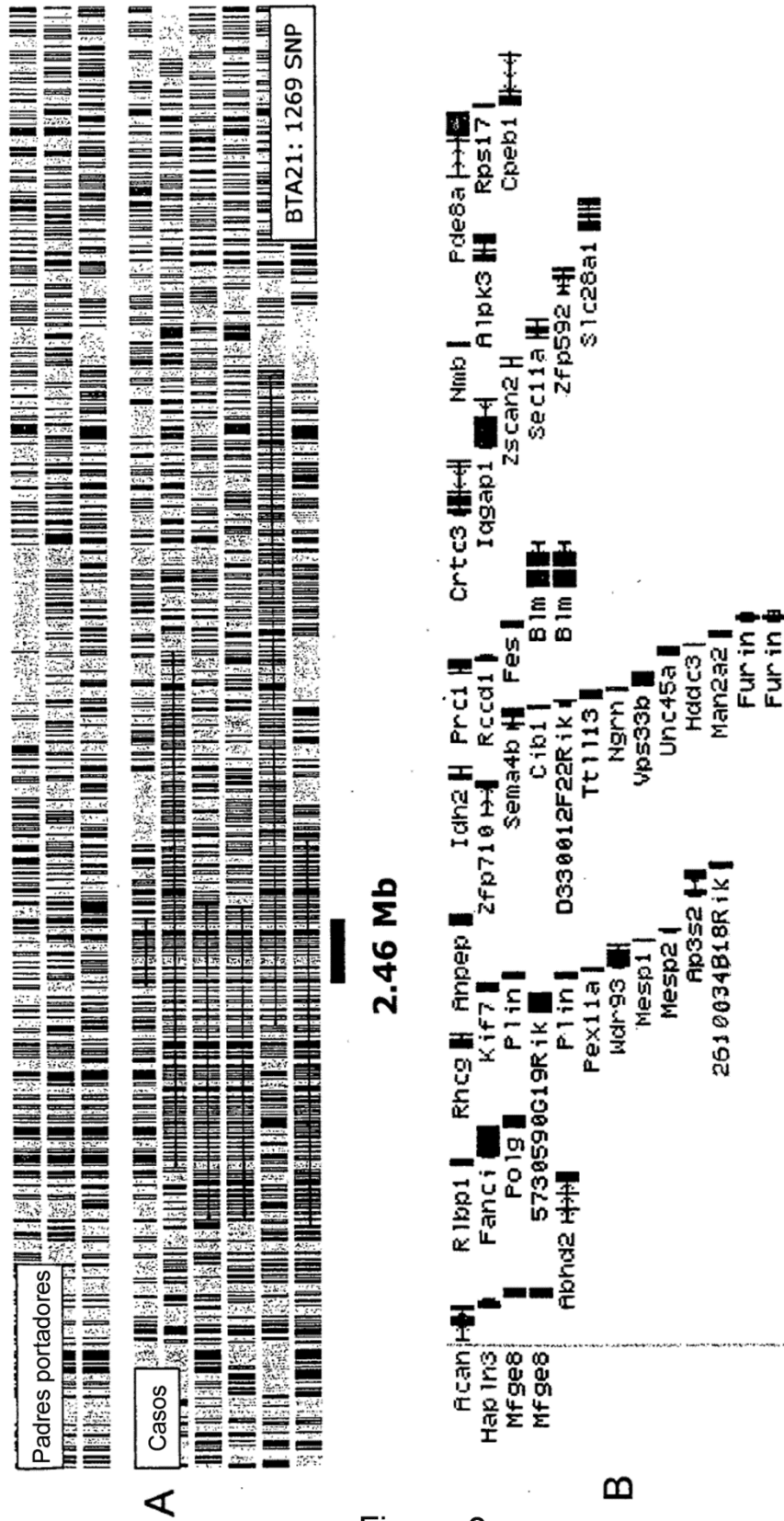


Figura 3