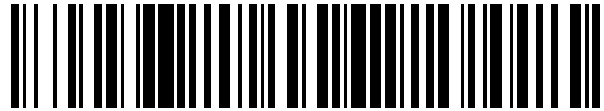


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 478**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2013 PCT/GB2013/051800**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14006428**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2013 E 13739245 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2870262**

54 Título: **Predicción de la resistencia a enfermedad**

30 Prioridad:

06.07.2012 GB 201212069

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

23.11.2017

73 Titular/es:

AQUAGEN AS (100.0%)

Postboks 1240

7462 Trondheim, NO

72 Inventor/es:

MOEN, THOMAS

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 643 478 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

Predicción de la resistencia a enfermedad

5 La presente invención se refiere a métodos para predecir resistencia a necrosis pancreática infecciosa en el salmón del Atlántico, más específicamente la invención se refiere a predecir dicha resistencia mediante el análisis de polimorfismos de ADN.

10 La necrosis pancreática infecciosa (IPN) es una de las principales amenazas para la industria del salmón en todo el mundo. La enfermedad es causada por un birnavirus acuático, que provoca necrosis de las células pancreáticas y células hepáticas, lo que resulta en letargo y mortalidad súbita. El virus está ampliamente difundido en la naturaleza, pero no parece afectar a los salmones de vida libre en alguna gran medida. En los entornos de acuicultura, la enfermedad provoca la mortalidad tanto en la etapa de alevines, cuando los peces siguen viviendo en agua dulce, y en la etapa de post-smolt, poco después de transferencia al agua de mar. Las amplias pérdidas en la industria debido a IPN se han estimado en un 8% durante la fase de agua dulce y un 5% durante la fase de mar. Se conocen unos lugares de rasgos cuantitativos (QTL) vinculados a la resistencia a IPN (véase capítulo 8 de "Breeding for disease resistance in farm animals", ED. Moan and Bishop, CABI Publ., Wallingford, páginas 166-179, 2010). Se han descritos los marcadores microsatélites sugeridos para ser vinculados a la resistencia a IPN (véase "Segregación de infectious pancreatic necrosis resistance QTL in the early life cycle of Atlantic Salmon (*Salmo salar*)", Gheyas et al. Animal Genetics, vol 41, No. 5, páginas 531-536, 2010).

25 La industria del salmón, en general, se divide en diversos estratos que corresponden a las diferentes etapas de vida de los peces: los productores de huevos venden huevos fertilizados a los productores de alevines, quienes proporcionan pescado (smolt) listos para sal agua los productores de engorde. Para cada uno de los estratos es ventajoso seleccionar huevos o peces que estén por encima del promedio resistente a enfermedades. Las empresas de cría de salmón ejecutan programas de selección de pescado continuos dirigidos a mejorar los abastecimientos de acuicultura con respecto a la resistencia a enfermedades, y se han desarrollado protocolos para la prueba de resistencia de peces a varias enfermedades específicas. Se han utilizado estas pruebas de inoculación con el fin de seleccionar los peces como reproductores que posean resistencia por encima del promedio a las enfermedades en cuestión. Las pruebas convencionales implican prueba de inoculación controlada de los hermanos de los candidatos de cría. Sin embargo, esta metodología es, obstaculizada por el hecho de que no se pueden utilizar los peces infectados como reproductores. Por lo tanto, se tiene que recurrir a selección de animales al azar (no probado) de las familias de los peces probados que se realiza mejor en pruebas de inoculación (denominadas de selección de familia).

35 Por lo tanto, subsiste la necesidad de metodologías alternativas para ensayar la resistencia de los animales a necrosis pancreática infecciosa; en particular metodologías que permitan el ensayo directo de la resistencia del individuo a necrosis pancreática infecciosa, conservando al mismo tiempo la posibilidad de utilizar el animal probado como reproductor.

40 El inventor de la presente invención, después de una amplia experimentación, ha identificado que se puede predecir la resistencia a necrosis pancreática infecciosa del salmón mediante el análisis de uno o más polimorfismos de ADN (satisfaciendo de este modo la necesidad mencionada anteriormente)

45 De acuerdo con lo anterior, en un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para predecir resistencia a necrosis pancreática infecciosa en el salmón del Atlántico, el método comprende determinar los alelos presentes en un polimorfismo de ADN en el salmón y predecir si o no el salmón es resistente a necrosis pancreática infecciosa con base en la determinación de los alelos, en el que el polimorfismo de ADN se selecciona de el grupo proporcionado en la Tabla 1.

50 El inventor ha encontrado que los polimorfismos de ADN de la presente invención pueden estar presentes en cualquiera de dos formas, es decir, los polimorfismos tienen dos alelos. Un alelo puede ser caracterizado como predictivo de la resistencia a la necrosis pancreática infecciosa (es decir, el alelo de resistencia); el otro es predictivo de no resistencia a necrosis pancreática infecciosa (es decir, alelo de no resistencia). Los salmones son organismos diploides, y así poseen dos copias de los polimorfismos de la presente invención (una copia se encuentra en cada grupo de cromosomas). La etapa de determinar los alelos en el método del primer aspecto de la presente invención por lo tanto incluye la etapa de analizar el polimorfismo de ADN proporcionado en cada grupo de cromosomas con el fin de determinar si cada copia del polimorfismo de ADN presente es un alelo de resistencia o es un alelo de no resistencia. Cuando se determina que un salmón sometido al método de la presente invención tiene dos copias del alelo de resistencia para el polimorfismo de ADN (es decir, el salmón es homocigoto para el alelo de resistencia), se predice que el salmón tiene resistencia a necrosis pancreática infecciosa. Por el contrario, cuando se determina que un salmón sometido al método de la presente invención tiene dos copias del alelo de no resistencia para el polimorfismo de ADN (es decir, es homocigoto para el alelo de no resistencia), se predice que el salmón no tiene resistencia a necrosis pancreática infecciosa. Mediante el método de la presente invención se puede concluir que cuando se predice que un salmón tiene resistencia a necrosis pancreática infecciosa tiene una mayor probabilidad que la normal de tener resistencia a necrosis pancreática infecciosa. Por el contrario, se puede concluir que cuando

- se predice que un salmón no tiene resistencia necrosis pancreática infecciosa tiene un riesgo más bajo que el normal de desarrollar resistencia necrosis pancreática infecciosa. Cuando se determina que un salmón sometido al método de la presente invención tiene una copia del alelo de resistencia para el polimorfismo de ADN y una copia del alelo de no resistencia para el polimorfismo de ADN (es decir, es heterocigoto), de acuerdo con la presente invención no se puede predecir que el salmón tiene resistencia a necrosis pancreática infecciosa. Sin embargo, se predice que ese salmón tiene una mayor probabilidad de ser resistente a necrosis pancreática infecciosa que un salmón con dos copias del alelo de no resistencia. De aquí en adelante, se mencionará que dicho salmón tiene semi-resistencia a necrosis pancreática infecciosa.
- El polimorfismo de ADN en cuestión puede ser cualquiera de diversos polimorfismos de ADN encontrados por el inventor que tenga esta capacidad predictiva. Todos estos polimorfismos de ADN se ubican sobre el cromosoma 26. Los polimorfismos de ADN se vinculan por su rasgo común para predecir resistencia a IPN resistente. La capacidad de los polimorfismos de ADN para predecir la resistencia a IPN se puede cuantificar utilizando la estadística r^2 , que se explicará adelante. Todos los polimorfismos de ADN comparten la característica de que esta estadística r^2 es más grande de 0.3. El polimorfismo de ADN puede ser m polimorfismos de nucleótido múltiple (es decir polimorfismos sin SNP) un polimorfismo de nucleótido sencillo, una mutación adicional, o una mutación de supresión. Cada tipo de polimorfismo de ADN proporcionado anteriormente se contempla de forma individual como parte de la presente invención para la etapa de determinar en los métodos de la presente invención.
- El polimorfismo de ADN se selecciona de cualquiera de los polimorfismos de ADN proporcionados en la Tabla 1. Cada uno de los polimorfismos de ADN proporcionados en la Tabla 1 se contemplan individualmente como parte de la presente invención.
- Los polimorfismos de ADN descritos en toda esta solicitud se definen con referencia a toda la secuencia del genoma de *Salmo salar* publicado en el banco de genes con el número de AGKD00000000 (versión AGKD00000000.1 GI: 354459050). Más particularmente, cada polimorfismo de ADN en la presente solicitud deriva su nombre como se describe aquí a partir de lo siguiente: número de acceso de Genbank, seguido de subrayado ('_') seguido por la posición del polimorfismo de ADN dentro de la secuencia de GenBank, seguido de corchetes que encierran el alelo de referencia (que aparece primero) y el alelo alternativo (que aparece segundo). El alelo de referencia es el alelo que aparece en la secuencia de referencia.
- Por ejemplo, el polimorfismo de ADN puede ser:
 AGKD01281000.1_4157 [T/TA];
 AGKD01281000.1_5527 [T/TAT];
 AGKD01021775.1_19790 [G/A];
 AGKD01281000.1_5251 [A/G], o;
 AGKD01281000.1_4338 [A/T].
- Cada uno de los polimorfismos de ADN anteriores se contempla de forma individual como parte de la presente invención.
- El método puede emplear dos polimorfismos de ADN. Cuando se emplea el método con dos polimorfismos de ADN, los dos polimorfismos de ADN constituyen una unidad, en lo sucesivo como un haplotipo. Cada haplotipo puede tener cuatro alelos diferentes, correspondientes a las cuatro combinaciones diferentes de alelos de polimorfismo de ADN en los polimorfismos de ADN individuales (por ejemplo, si el haplotipo se compone de un polimorfismo de ADN con los alelos A y T, y uno polimorfismos de ADN con alelos T y G, los cuatro posibles alelos de haplotipos son A-T, A-G, T-T, y T-G). Cada uno de estos cuatro alelos sería ya sea un alelo de resistencia o un alelo de no resistencia, de una manera análoga al método de polimorfismo de ADN único establecido anteriormente. Por lo tanto, en el caso hipotético de que un haplotipo tenga los cuatro alelos en, A-T, A-G, T-T, y T-G, podría ser que todos A-T, A-G, y T-T fueran alelos de resistencia, mientras que T-G fuera un alelo de no resistencia. En ese caso, un animal que tiene una copia del alelo A-T y una copia del alelo A-G sería resistente a IPN, un animal que tiene una copia de A-T y una copia de T-G sería semirresistente, mientras que un animal que tiene dos copias de T-G sería no resistente.
- El inventor ha descubierto un gran número de dichos haplotipos, es decir, combinaciones de dos polimorfismos de ADN, que son potentes predictores de la resistencia a IPN, más potentes que los polimorfismos de ADN individuales. Para cada uno de estos haplotipos, el inventor ha identificado que los alelos son alelos de resistencia y que los alelos son alelos de no resistencia. Los pares de polimorfismos de ADN que componen haplotipos predictivos son o bien cualquier combinación de los polimorfismos de ADN enumerados en la Tabla 1, o son cualquier combinación de un polimorfismo de ADN de la Tabla 1 con el polimorfismo de un ADN de la Tabla 2. Todos los haplotipos predictivos se enumeran en la Tabla 3, donde los polimorfismos de ADN se designan con números relativos a las Tablas 1 y Tabla 2. Cada uno de los pares de los polimorfismos de ADN se contempla para uso individual como parte de la presente invención. Todos los pares de polimorfismos de ADN comparten la característica de que su valor de r^2 (que se describirá más adelante) es mayor de 0.6.
- Por consiguiente, la presente invención por lo tanto se puede relacionar con un método que adicionalmente comprende la etapa de determinación de el alelo presente en un polimorfismo de ADN adicional, y una predicción de

si o no el salmón es resistente a necrosis pancreática infecciosa es con base en la determinación de los alelos en ambos polimorfismos de ADN.

5 Por ejemplo, el método de la presente invención puede incluir la determinación de alelos presentes en el polimorfismo de ADN AGKD01458345.1_5634[G/T], y en el polimorfismo de ADN adicional AGKD01021775.1_19790[G/A], y una predicción de si o no el salmón es resistente a necrosis pancreática infecciosa es con base en la determinación de los alelos en ambos polimorfismos de ADN.

10 Cuando se utilizan los haplotipos de dos polimorfismos de ADN en lugar de polimorfismos de ADN individuales para predecir la resistencia, primero se deben probar los alelos de haplotipos en el pescado probado, en otras palabras, se debe determinar qué alelos en el polimorfismo de ADN individuales se encuentran en los mismos cromosomas. Esto se puede hacer utilizando programas de ordenador tales como PHASE
 15 (<http://stephenslab.uchicago.edu/software.html#phase>), aunque para la mayoría de los animales los alelos de haplotipos serán evidentes (por ejemplo, si un animal tiene dos copias del alelo A en un polimorfismo de ADN, y una copia de T y una copia de G en el otro polimorfismo de ADN, sólo son posibles dos configuraciones de alelos en el haplotipo, es decir, A-G + A-T).

20 Cuando un haplotipo de dos polimorfismos de ADN se utiliza en lugar de un polimorfismo de ADN, la prueba se vuelve más predictiva en comparación a cuando sólo se utiliza un polimorfismo de ADN.

25 El método puede implicar el análisis de más de dos polimorfismos de ADN. Por ejemplo, el método de la presente invención puede implicar la determinación de más de dos polimorfismos, en los que por lo menos uno de los polimorfismos se proporciona en la Tabla 1 y/o por lo menos dos de los polimorfismos se proporcionan como un par en la tabla 3.

El método se aplica para el salmón del Atlántico (es decir, *Salmo salar*).

30 La etapa de determinar la presencia o ausencia en un salmón se puede practicar sobre una muestra tomada del salmón. La muestra puede ser cualquier muestra en la que es posible el análisis del material de ácido nucleico, como se entenderá fácilmente por el experto en la técnica. Para evitar dudas, la muestra puede ser una muestra de tejido muscular, muestra de sangre, muestra de hígado y/o una pinza de aleta.

35 El experto sería consciente de todos los métodos disponibles capaces de comprobar la presencia o ausencia de un polimorfismo de ADN. Por ejemplo, el método puede implicar el análisis de secuencia de los salmones que se van a probar. Alternativamente, el método puede implicar la extensión de una sola base de fragmentos de ADN que termina en el sitio polimórfico (por ejemplo, ensayos de Iplex de Sequenom y ensayos Infinium de Illumina), el PCR específico a alelo (por ejemplo, ensayos de SNPtype de Fluidigm o ensayos Kaspar de KBiosciences), o hibridación competitiva de sondas complementarias a los diferentes alelos (por ejemplo, el ensayo TaqMan de Applied Biosystems).

40 En consecuencia, se contempla una sonda de hibridación que es específica para uno o más de los polimorfismos de ADN mencionados anteriormente.

45 El ADN en y alrededor de los polimorfismos de ADN se pueden extrapolar a partir de los nombres dados a los polimorfismos de ADN en la Tabla 1 y Tabla 2. Además, las secuencias de ADN en y alrededor de los polimorfismos de ADN se pueden encontrar en la Tabla 4. Se contemplan las sondas de hibridación que son selectivas para estas secuencias de ADN.

50 Un salmón que se predice tiene resistencia a necrosis pancreática infecciosa de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención es más probable que produzca más descendencia que el normal ya que tiene una mayor oportunidad que el normal de tener resistencia a necrosis pancreática infecciosa. Por consiguiente, en un aspecto adicional de las presentes invenciones, se proporciona un método para seleccionar un salmón del Atlántico para uso como reproductor, en el que el salmón se selecciona, con base en la predicción por el método como se reivindica en el primer aspecto de la presente invención, por tener resistencia a necrosis pancreática infecciosa.

55 Por el contrario, un salmón predicho por el método del primer aspecto de la presente invención como que no tiene resistencia a necrosis pancreática infecciosa no sería seleccionado como reproductor.

60 Se contempla un polinucleótido aislado que comprende uno o más de los polimorfismos de ADN individuales seleccionados del grupo proporcionado en la Tabla 1 ubicado dentro de una porción de el genoma del salmón. Las secuencias de ejemplo para dichos polinucleótido aislados se pueden encontrar en la Tabla 4.

65 Los términos "alelo de haplotipo" y "alelo de polimorfismo de ADN" toman su significado normal como sería bien entendido por el experto en la técnica. Sin embargo, para evitar dudas el "alelo de polimorfismo de ADN" puede significar una de dos secuencias de nucleótidos diferentes en el sitio de un polimorfismo de ADN de la presente invención (un alelo es el "alelo de resistencia", el otro es el "alelo de no resistencia"). Sin embargo, para evitar

dudas, el “alelo de haplotipo” puede significar uno de los cuatro posibles pares de alelos de polimorfismo de ADN de la presente invención.

o:

“alelo de haplotipo” puede significar cualquier posible combinación única de alelos para ese haplotipo, es decir, cualquier combinación única de un alelo de cada uno de los polimorfismos de ADN que constituyen el haplotipo (en el contexto de los haplotipos constituido por dos polimorfismos de ADN bi-alelicos, cuatro de dichas combinaciones son posibles) La presente invención se describirá ahora a modo de ejemplo con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

La Figura 1 muestra un gráfico que ilustra las tasas de supervivencia de salmón en una necrosis pancreática infecciosa - prueba de inoculación.

La Figura 2 muestra un gráfico que ilustra la mortalidad acumulada en una exposición en baño de salmón con virus aislado C-1244 estándar.

La Figura 3 muestra un gráfico que ilustra la mortalidad acumulada en una exposición en baño de salmón con una cepa de campo noruego de virus de IPN.

1. Selección de animales de prueba

Cuarenta y cinco salmones del Atlántico del núcleo de reproducción Aqua Gen en Noruega (seleccionados de entre los progenitores de las clases de los años 2005 y 2008) se seleccionaron para la secuenciación masiva en paralelo (Illumina Hi Seq 2000). Todos los salmones en el núcleo de reproducción se derivan del salmón tomado de los ríos noruegos.

Se ha vinculado un Lote de Rasgos Cuantitativos (QTL) con resistencia a IPN en el salmón del Atlántico (Moen et al. 2009). Tres polimorfismos de ADN individuales se reportaron recientemente como asociados con el QTL (Houston et al. 2012), pero no se ha presentado una prueba para deducir si los animales individuales son resistentes o no resistentes. El QTL se encuentra en el cromosoma 26.

Se supone aquí que el QTL mencionado anteriormente para resistencia a IPN es provocado por una mutación subyacente pero desconocido dentro de un gen o de otro elemento de ADN funcional. Esta mutación desconocida se denominará en adelante como el nucleótido de rasgos cuantitativos (QTN). Se supone además que el QTN tiene dos alelos; un alelo que da una mayor resistencia (alelo de resistencia, Q) y un alelo que da disminución de resistencia (alelo de no resistencia, q).

Cuatrocientos cincuenta y cuatro grupos de hermanos completos de alevines de salmón del Atlántico fueron inoculados en depósitos individuales poco después del inicio de la alimentación (los protocolos para una prueba de inoculación estándar se pueden encontrar en Moen et al. 2009). Cada grupo de hermanos completos consistieron en 103 peces (en promedio), y muestras de tejido se recolectaron de los 10 primeros en morir dentro de grupo, así como 10 sobrevivientes (o 10 últimos en morir), después de lo cual se extrajo el ADN utilizando el kit de DNAeasy de QIAGEN (QIAGEN, Venlo, Países Bajos). De los 206 grupos de hermanos completos seleccionados, la descendencia afectada y superviviente se genotiparon con tres marcadores de microsatélites localizados dentro de la región del QTL para resistencia a IPN; Alu333, Ssa0384BSFU/II y Ssa0285BSFU, después de lo cual se identifico la fase de ligamiento entre los alelos de los tres microsatélites en cada progenitor de mapeo utilizando la cosegregación observada de alelos de los progenitores a la descendencia (el genotipado de marcadores microsatélites se discute en más detalle en Moen et al. 2009). Este genotipado se realizó de forma iterativa para que, en última instancia, se genotiparan casi todos los grupos de hermanos completos que eran propensos a tener por lo menos un pariente QTN heterocigoto (véase más adelante). Se aplicó una prueba de chi cuadrado con el fin de probar la coherencia del haplotipo de tres microsatélites y el fenotipo afectado/resistente, identificando de este modo 110 progenitores de QTN heterocigotos. Utilizando datos de estos progenitores de QTN heterocigotos, se ha creado una tabla que vincula los alelos en el haplotipo de tres microsatélites a los alelos QTN. (Si se encontró que un alelo de tres microsatélites está vinculado a ambos Q y q, sólo la fase de ligamiento más frecuente se introduce en la tabla.) Esta tabla se utiliza luego para extrapolar los genotipos en el QTN para los progenitores de mapeo que se encuentran son QTN homocigotos, así como para otros animales desde el núcleo de reproducción de Aqua Gen. Veintidós animales de Aqua Gen deducidos de esta forma tienen el genotipo QQ de QTN (es decir, se espera que proporcionen buena resistencia a IPN), así como 23 animales de Aqua Gen encontrados igualmente que tienen el genotipo qq (es decir, se espera que proporcione una pobre resistencia IPN), fueron seleccionados para posterior secuenciación de todo el genoma. Estos grupos de 22 y 23 animales fueron puestos juntos de tal manera como para minimizar la relación de los animales dentro del grupo, al maximizar la diversidad de alelos de tres microsatélites dentro de cada grupo.

2. Elaboración de un ensamble de secuencias de ADN de referencia para la región QTL

La región QTL se definió como la región entre los SNPs ESTNV_31602_808 y GCR_cBin30387_Ctg1_91 sobre el mapa de vinculación SNP de salmón del Atlántico (Lien et al. 2011). Los clones de cromosoma artificial bacteriano (BAC) que coinciden con estos SNPs se aislaron de una biblioteca BAC existente (Thorsen et al. 2004). Sobre la base de un mapa físico elaborado a partir de esta biblioteca (www.asalbase.org), se elaboró una ruta de embalsado mínimo de 31 BAC (Tabla 5). Se extrajo el ADN genómico del salmón del Atlántico (es decir, de inserción) de cada BAC. Una biblioteca de extremo emparejado etiquetado individualmente (con tamaño de inserto promedio de 350 pb) se elaboró para cada muestra de ADN de BAC, con lo cual las muestras fueron secuenciadas en multiplex en un HiSeq2000 (Illumina Inc., San Diego, EE.UU.) a una profundidad promedio de aproximadamente 800 veces la cobertura del genoma haploide. Después de la eliminación de secuencias adaptadoras residuales, descartando las lecturas demasiado cortas, el recorte de los extremos de lecturas de mala calidad, y la lectura de congruencia de extremo emparejado, un grupo de novo se elaboró dentro de cada BAC utilizando el programa 'clc_novo_assemble' de la suite de Célula de Ensamble CLC (CLC Bio, Aarhus, Dinamarca). Se utilizó a continuación Phrap versión 1.090518 (<http://phrap.org>) para ensamblar secuencias de contiguo de BAC individuales en un grupo de contiguos que abarcan todos los BAC. Finalmente, los contiguos de esta referencia se combinaron en un andamio genómico contiguo alineándolo con andamios de una versión preliminar de la secuencia del genoma del salmón del Atlántico (que había sido elaborado en casa, utilizando el software Ensamblador de Celera, en base a los datos de los primeros 27 lotes de secuencias presentados por el proyecto de secuenciación en el Archivo de Traza NCBI).

Tabla 5: Cromosomas Artificiales Bacterianos (BAC) que constituye una ruta de embalsado mínimo encontrado para abarcar la región QTL.

S0042J22	S0004K18	S0161O04	S0243D12
S0076E15	S0021H01	S0162F10	S0258L08
S0119L01	S0026N22	S0162J03	S0259M06
S0120O19	S0048P16	S0170B06	S0262M03
S0126K07	S0063G22	S0201A04	S0282P22
S0457C13	S0066E05	S0215J07	S0344A15
S0001F22	S0115B04	S0227H08	S0449E20
S0001N03	S0160J02	S0236E20	

3. Descubrimiento de polimorfismos de ADN predictivos de IPN

Los 23 animales QQ mencionados anteriormente y 22 animales qq ADN polimorfismos se secuenciaron utilizando tecnología HiSeq2000 de Illumina. Se elaboraron bibliotecas de extremo emparejado etiquetado individualmente a partir de cada muestra, antes de que las muestras se agruparon para secuenciación. Se produjo un total de 264×10^9 lecturas, que corresponde a un rendimiento por animal de dos veces el genoma haploide. Las lecturas se ensamblaron sobre la secuencia de referencia de la región QTL mencionada anteriormente utilizando los programas `clc_ref_assemble_long` y '`clc_ref_assemble`' de la suite de Célula de Ensamble CLC, produciendo dos ensamblajes correspondientes a los dos grupos de genotipo QTN. Una fracción de longitud coincidente de 0.9 y una similitud mínima de 0.98 se estipularon en un intento de minimizar el mapeo de lecturas de cromosomas homólogos. La detección de SNP se realizó en estos grupos separados utilizando el programa '`find_variations`' de la suite de Célula de Ensamble CLC, lo que permite un mínimo de una diferencia de nucleótidos a la base de referencia. Se utilizó la prueba exacta de Fisher con el fin de probar la independencia entre el genotipo QTN (es decir, el montaje) y los alelos SNP/indel. Los SNP con las estadísticas más significativas de este exacto se genotiparon en los 110 animales con QTN heterocigoto mencionados anteriormente, así como en la descendencia probada con inoculación de esos animales, y se realizó una prueba exacta de Fisher con el fin de probar la herencia independiente de alelos de SNP y alelos de QTN. El coeficiente de correlación (r^2) entre alelos en SNP y en QTN, una medida del grado de desequilibrio de ligamiento (LD) entre los lugares, también se calculó para cada SNP, utilizando la función de 'LD' de módulo de 'genética' de la suite del programa estadístico R. Un SNP se define como útil para predecir la resistencia a IPN si tenía un valor de r^2 por encima de 0.3 (esto es una suposición común entre los genetistas, véase, por ejemplo Shifman et al., Human Molecular Genetics 2003). En el presente contexto, el valor r^2 es la fracción de variación alélica de QTL explicada por el polimorfismo de ADN predictivo. Por ejemplo, si $r^2 = 0.5$, el doble que los animales deben ser genotipos para el polimorfismo de ADN predictivo con respecto a un caso hipotético de que los polimorfismos de ADN de predicción es el propia QTN.

Los SNP identificados que se correlacionan más fuertemente con la resistencia a IPN se proporcionan en la Tabla 1.

Tabla 1. Polimorfismos de ADN fuertemente asociados con resistencia a IPN. r^2 = la fracción de la variación alélica en el QTN explicado por el polimorfismo de ADN

# de polimorfismo de ADN	Nombre de de polimorfismo de ADN	Alelo de resistencia/alelo de no resistencia	r ²
1	AGKD01281000.1_4157[T/TA]	T/TA	0.57
2	AGKD01281000.1_5527[T/TAT]	T/TAT	0.57
3	AGKD01021775.1_19790[G/A]	G/A	0.57
4	AGKD01281000.1_5251[A/G]	A/G	0.54
5	AGKD01281000.1_4338[A/T]	A/T	0.54
6	AGKD01317469.1_245[T/A]	T/A	0.54
7	AGKD01281000.1_5457[A/G]	A/G	0.54
8	AGKD01028155.1_12812[A/G]	A/G	0.5
9	AGKD01452978.1_5956[A/G]	A/G	0.41
10	AGKD01039267.1_12921[T/A]	T/A	0.41
11	AGKD01059002.1_4664[T/C]	T/C	0.4
12	AGKD01451885.1_830[T/G]	T/G	0.4
13	AGKD01003456.1_35321[A/G]	A/G	0.37
14	AGKD01059002.1_16264[G/A]	G/A	0.36
15	AGKD01452978.1_6935[A/G]	A/G	0.35
16	AGKD01003456.1_36664[G/T]	G/T	0.35
17	AGKD01340746.1_282[C/T]	C/T	0.35
18	AGKD01062103.1_13615[T/G]	T/G	0.32
19	AGKD01062103.1_13695[T/C]	T/C	0.32
20	AGKD01007787.1_13666[G/A]	G/A	0.31
21	AGKD01059002.1_3603[T/G]	T/G	0.31

4. Descubrimiento de dos haplotipos de polimorfismo de ADN de predicción de resistencia a IPN

5 Los genotipos de los polimorfismos del ADN en los progenitores QTN heterocigotos y su descendencia probada con inoculación, descritos anteriormente, también se utilizaron con el fin de encontrar combinaciones de 2 polimorfismos de ADN que eran más predictivos de la resistencia a IPN que los polimorfismos de ADN individuales más predictivos. Los polimorfismos de ADN se combinaron en todas las posibles combinaciones bidireccionales, y para cada haplotipo que consiste en dos polimorfismos de ADN, se identificaron alelos de haplotipos para cada progenitor de QTN heterocigoto, y se utilizó una prueba exacta de Fisher para probar la independencia entre alelo de haplotipo y alelos de QTN. El coeficiente de correlación (r²) entre los estados alélico en el haplotipo de dos SNP y en QTN se calculó al primero mapear el haplotipo de dos SNP bajo un sistema de dos alelos al reemplazar cada nombre de alelo con el nombre del alelo QTN ya que alelo haplotipo de dos SNP en cuestión fue predominantemente vinculado a (véase la Tabla 3), seguido por el cálculo de r² utilizando la función de 'LD' del módulo " genética de la suite de programa estadístico R.

20 Los haplotipos predictivos de la resistencia a IPN, identificados de esta manera, eran combinaciones de dos polimorfismos de ADN de la Tabla 1, o eran combinaciones de polimorfismo de un ADN de la Tabla 1 y el polimorfismo de un ADN de la Tabla 2. La Tabla 3 contiene todas las combinaciones de polimorfismos de ADN encontradas que tienen un valor de r² mayor de 0.60. La Tabla 3 también contiene la identidad de los alelos de haplotipos encontrados para los respectivos haplotipos predictivos, así como la clasificación (resistente frente a no resistente) de estos alelos de haplotipos.

25 La Tabla 4 contiene las secuencias de ADN de los polimorfismos de ADN. Estas secuencias también se pueden deducir a partir de los nombres de polimorfismo de ADN, como se señaló anteriormente.

Tabla 2. Polimorfismos de ADN auxiliares, que forman pares de diagnóstico de polimorfismos de ADN en combinación con los polimorfismos de ADN de la Tabla 1.

# de polimorfismo de ADN	Nombre de de polimorfismo de ADN	Alelo de resistencia/alelo de no resistencia
22	AGKD01000927.1_15806[C/G]	C/G
23	AGKD01458345.1_5634[G/T]	T/G
24	AGKD01083029.1_8368[A/C]	C/A
25	AGKD01062103.1_13615[T/G]	T/G
26	AGKD01062103.1_13695[T/C]	T/C
27	AGKD01032349.1_7232[A/C]	A/C

28	AGKD01032349.1_14078[A/G]	G/A
29	AGKD01051656.1_1495[T/A]	A/T
30	AGKD01083029.1_5084[G/C]	C/G
31	AGKD01455926.1_1814[G/A]	A/G
32	AGKD01003456.1_1873[G/C]	G/C
33	AGKD01037589.1_572[C/T]	C/T
34	AGKD01037589.1_1369[C/A]	C/A
35	AGKD01205804.1_11559[A/G]	A/G
36	AGKD01106761.1_1717[T/C]	T/C

Tabla 3

Combinaciones predictivas de dos polimorfismos de ADN (haplotipos). r^2 = la fracción de variación alélica en el QTN se explica por el haplotipo; alelos de haplotipo = los alelos válidos del haplotipo, T-G(R) = un haplotipo que tiene el alelo T en el polimorfismo de ADN #1, G en el polimorfismo de ADN #2, es un alelo de resistencia, TA-G(N) = un haplotipo que tiene el alelo TA en el polimorfismo de ADN #1, G en el polimorfismo de ADN #2, es un alelo de no resistencia, etc. La numeración de los polimorfismos de ADN es relativa a las Tablas 1 y 2.

Polimorfismo de ADN #1	Polimorfismo de ADN #2	r^2	Alelos de haplotipo
1	23	0.84	T-T(R), T-G(R), TA-T(R), TA-G(N)
1	28	0.84	T-G(R), T-A(R), TA-G(R), TA-A(N)
2	23	0.84	T-T(R), T-G(R), TAT-T(R), TAT-G(N)
2	28	0.84	T-G(R), T-A(R), TAT-G(R), TAT-A(N)
3	23	0.84	G-T(R), G-G(R), A-T(R), A-G(N)
3	28	0.84	G-G(R), G-A(R), A-G(R), A-A(N)
4	23	0.81	A-T(R), A-G(R), G-T(R), G-G(N)
4	28	0.81	A-G(R), A-A(R), G-G(R), G-A(N)
5	23	0.81	A-T(R), A-G(R), T-T(R), T-G(N)
5	28	0.81	A-G(R), A-A(R), T-G(R), T-A(N)
6	23	0.81	T-T(R), T-G(R), A-T(R), A-G(N)
6	28	0.81	T-G(R), T-A(R), A-G(R), A-A(N)
7	23	0.81	A-T(R), A-G(R), G-T(R), G-G(N)
7	28	0.81	A-G(R), A-A(R), G-G(R), G-A(N)
1	11	0.79	T-T(R), T-C(R), TA-T(R), TA-C(N)
1	12	0.79	T-T(R), T-G(R), TA-T(R), TA-G(N)
2	11	0.79	T-T(R), T-C(R), TAT-T(R), TAT-C(N)
2	12	0.79	T-T(R), T-G(R), TAT-T(R), TAT-G(N)
3	11	0.79	G-T(R), G-C(R), A-T(R), A-C(N)
3	12	0.79	G-T(R), G-G(R), A-T(R), A-G(N)
4	11	0.78	A-T(R), A-C(R), G-T(R), G-C(N)
4	12	0.78	A-T(R), A-G(R), G-T(R), G-G(N)
5	11	0.78	A-T(R), A-C(R), T-T(R), T-C(N)
5	12	0.78	A-T(R), A-G(R), T-T(R), T-G(N)
6	11	0.78	T-T(R), T-C(R), A-T(R), A-C(N)
6	12	0.78	T-T(R), T-G(R), A-T(R), A-G(N)
7	11	0.78	A-T(R), A-C(R), G-T(R), G-C(N)
7	12	0.78	A-T(R), A-G(R), G-T(R), G-G(N)
1	31	0.76	T-A(R), T-G(R), TA-A(R), TA-G(N)
2	31	0.76	T-A(R), T-G(R), TAT-A(R), TAT-G(N)
3	31	0.76	G-A(R), G-G(R), A-A(R), A-G(N)
1	10	0.75	T-T(R), T-A(R), TA-T(R), TA-A(N)
2	10	0.75	T-T(R), T-A(R), TAT-T(R), TAT-A(N)
3	10	0.75	G-T(R), G-A(R), A-T(R), A-A(N)
4	31	0.74	A-A(R), A-G(R), G-A(R), G-G(N)
5	31	0.74	A-A(R), A-G(R), T-A(R), T-G(N)
6	31	0.74	T-A(R), T-G(R), A-A(R), A-G(N)
7	31	0.73	A-A(R), A-G(R), G-A(R), G-G(N)
8	14	0.73	A-G(R), A-A(R), G-G(R), G-A(N)
1	22	0.72	T-C(R), T-G(R), TA-C(R), TA-G(N)
2	22	0.72	T-C(R), T-G(R), TAT-C(R), TAT-G(N)
3	22	0.72	G-C(R), G-G(R), A-C(R), A-G(N)
4	10	0.72	A-T(R), A-A(R), G-T(R), G-A(N)

ES 2 643 478 T3

Combinaciones predictivas de dos polimorfismos de ADN (haplotipos). r^2 = la fracción de variación alélica en el QTN se explica por el haplotipo; alelos de haplotipo = los alelos válidos del haplotipo, T-G(R) = un haplotipo que tiene el alelo T en el polimorfismo de ADN #1, G en el polimorfismo de ADN #2, es un alelo de resistencia, TA-G(N) = un haplotipo que tiene el alelo TA en el polimorfismo de ADN #1, G en el polimorfismo de ADN #2, es un alelo de no resistencia, etc. La numeración de los polimorfismos de ADN es relativa a las Tablas 1 y 2.

Polimorfismo de ADN #1	Polimorfismo de ADN #2	r ²	Alelos de haplotipo
5	10	0.72	A-T(R), A-A(R), T-T(R), T-A(N)
6	10	0.72	T-T(R), T-A(R), A-T(R), A-A(N)
7	10	0.72	A-T(R), A-A(R), G-T(R), G-A(N)
11	32	0.7	T-G(R), T-C(R), C-G(R), C-C(N)
11	33	0.7	T-C(R), T-T(R), C-C(R), C-T(N)
11	35	0.7	T-A(R), T-G(R), C-A(R), C-G(N)
12	24	0.7	T-C(R), T-A(R), G-C(R), G-A(N)
12	30	0.7	T-C(R), T-G(R), G-C(R), G-G(N)
12	32	0.7	T-G(R), T-C(R), G-G(R), G-C(N)
12	33	0.7	T-C(R), T-T(R), G-C(R), G-T(N)
12	35	0.7	T-A(R), T-G(R), G-A(R), G-G(N)
1	21	0.69	T-T(R), T-G(R), TA-T(R), TA-G(N)
2	21	0.69	T-T(R), T-G(R), TAT-T(R), TAT-G(N)
3	21	0.69	G-T(R), G-G(R), A-T(R), A-G(N)
4	22	0.69	A-C(R), A-G(R), G-C(R), G-G(N)
5	22	0.69	A-C(R), A-G(R), T-C(R), T-G(N)
6	22	0.69	T-C(R), T-G(R), A-C(R), A-G(N)
7	22	0.69	A-C(R), A-G(R), G-C(R), G-G(N)
1	18	0.68	T-T(R), T-G(R), TA-T(R), TA-G(N)
1	19	0.68	T-T(R), T-C(R), TA-T(R), TA-C(N)
1	25	0.68	T-T(R), T-G(R), TA-T(R), TA-G(N)
1	26	0.68	T-T(R), T-C(R), TA-T(R), TA-C(N)
1	27	0.68	T-A(R), T-C(R), TA-A(R), TA-C(N)
2	18	0.68	T-T(R), T-G(R), TAT-T(R), TAT-G(N)
2	19	0.68	T-T(R), T-C(R), TAT-T(R), TAT-C(N)
2	25	0.68	T-T(R), T-G(R), TAT-T(R), TAT-G(N)
2	26	0.68	T-T(R), T-C(R), TAT-T(R), TAT-C(N)
2	27	0.68	T-A(R), T-C(R), TAT-A(R), TAT-C(N)
3	18	0.68	G-T(R), G-G(R), A-T(R), A-G(N)
3	19	0.68	G-T(R), G-C(R), A-T(R), A-C(N)
3	25	0.68	G-T(R), G-G(R), A-T(R), A-G(N)
3	26	0.68	G-T(R), G-C(R), A-T(R), A-C(N)
3	27	0.68	G-A(R), G-C(R), A-A(R), A-C(N)
4	21	0.68	A-T(R), A-G(R), G-T(R), G-G(N)
5	21	0.68	A-T(R), A-G(R), T-T(R), T-G(N)
6	21	0.68	T-T(R), T-G(R), A-T(R), A-G(N)
7	21	0.68	A-T(R), A-G(R), G-T(R), G-G(N)
11	24	0.67	T-C(R), T-A(R), C-C(R), C-A(N)
11	30	0.67	T-C(R), T-G(R), C-C(R), C-G(N)
4	18	0.65	A-T(R), A-G(R), G-T(R), G-G(N)
4	19	0.65	A-T(R), A-C(R), G-T(R), G-C(N)
4	25	0.65	A-T(R), A-G(R), G-T(R), G-G(N)
4	26	0.65	A-T(R), A-C(R), G-T(R), G-C(N)
4	27	0.65	A-A(R), A-C(R), G-A(R), G-C(N)
5	18	0.65	A-T(R), A-G(R), T-T(R), T-G(N)
5	19	0.65	A-T(R), A-C(R), T-T(R), T-C(N)
5	25	0.65	A-T(R), A-G(R), T-T(R), T-G(N)
5	26	0.65	A-T(R), A-C(R), T-T(R), T-C(N)
5	27	0.65	A-A(R), A-C(R), T-A(R), T-C(N)
6	18	0.65	T-T(R), T-G(R), A-T(R), A-G(N)
6	19	0.65	T-T(R), T-C(R), A-T(R), A-C(N)
6	25	0.65	T-T(R), T-G(R), A-T(R), A-G(N)
6	26	0.65	T-T(R), T-C(R), A-T(R), A-C(N)
6	27	0.65	T-A(R), T-C(R), A-A(R), A-C(N)
7	18	0.65	A-T(R), A-G(R), G-T(R), G-G(N)
7	19	0.65	A-T(R), A-C(R), G-T(R), G-C(N)
7	25	0.65	A-T(R), A-G(R), G-T(R), G-G(N)

Combinaciones predictivas de dos polimorfismos de ADN (haplotipos). r^2 = la fracción de variación alélica en el QTN se explica por el haplotipo; alelos de haplotipo = los alelos válidos del haplotipo, T-G(R) = un haplotipo que tiene el alelo T en el polimorfismo de ADN #1, G en el polimorfismo de ADN #2, es un alelo de resistencia, TA-G(N) = un haplotipo que tiene el alelo TA en el polimorfismo de ADN #1, G en el polimorfismo de ADN #2, es un alelo de no resistencia, etc. La numeración de los polimorfismos de ADN es relativa a las Tablas 1 y 2.

Polimorfismo de ADN #1	Polimorfismo de ADN #2	r ²	Alelos de haplotipo
7	26	0.65	A-T(R), A-C(R), G-T(R), G-C(N)
7	27	0.65	A-A(R), A-C(R), G-A(R), G-C(N)
1	29	0.63	T-A(R), T-T(R), TA-A(R), TA-T(N)
2	29	0.63	T-A(R), T-T(R), TAT-A(R), TAT-T(N)
3	29	0.63	G-A(R), G-T(R), A-A(R), A-T(N)
10	36	0.62	T-T(R), T-C(R), A-T(R), A-C(N)
11	34	0.62	T-C(R), T-A(R), C-C(R), C-A(N)
12	34	0.62	T-C(R), T-A(R), G-C(R), G-A(N)
14	20	0.62	G-G(R), G-A(R), A-G(R), A-A(N)
1	8	0.61	T-A(R), T-G(R), TA-A(R), TA-G(N)
2	8	0.61	T-A(R), T-G(R), TAT-A(R), TAT-G(N)
3	8	0.61	G-A(R), G-G(R), A-A(R), A-G(N)
4	29	0.61	A-A(R), A-T(R), G-A(R), G-T(N)
5	29	0.61	A-A(R), A-T(R), T-A(R), T-T(N)
6	29	0.61	T-A(R), T-T(R), A-A(R), A-T(N)
7	29	0.61	A-A(R), A-T(R), G-A(R), G-T(N)
21	32	0.6	T-G(R), T-C(R), G-G(R), G-C(N)
21	33	0.6	T-C(R), T-T(R), G-C(R), G-T(N)
21	35	0.6	T-A(R), T-G(R), G-A(R), G-G(N)

Tabla 4. Secuencias de los polimorfismos de ADN enumerados en la Tabla 1 y Tabla 2. La numeración es la misma que la numeración en la Tabla 1 y Tabla 2.

# de polimorfismo de ADN	Nombre del polimorfismo de ADN	Secuencias de ADN
1	AGKD01281000.1_4157[T/TA]	AAGTCTTTTTTTTT[-/A]TATATGACTATCCTT
2	AGKD01281000.1_5527[T/TAT]	TTGAGCACGTGTTTT[-/AT]GACGGTGTAGGAAGT
3	AGKD01021775.1_19790[G/A]	ACGTACGCAGGCGCA[C/T]CCCTGCGATTTAGTG
4	AGKD01281000.1_5251[A/G]	GGGAGGTCAGTGGGG[C/T]AGACAACCTAAAGCA
5	AGKD01281000.1_4338[A/T]	TCTTCAGGAAAAAAAA[A/T]ATATAATTAGTGATT
6	AGKD01317469.1_245[T/A]	CTACAACTTTCTCA[A/T]GGTATAGCAAAAAAT
7	AGKD01281000.1_5457[A/G]	GAATGAAAGCACTTT[C/T]TTGGTATCCTATGCT
8	AGKD01028155.1_12812[A/G]	GTCCCTAACATTGAGC[C/T]GTGTTTGTGGCCAG
9	AGKD01452978.1_5956[A/G]	ACTATTTTATCTGGC[C/T]CTTTCAATCAGTCCT
10	AGKD01039267.1_12921[T/A]	GATGATGGCCCCTAG[A/T]GAGTTACTGTAATGA
11	AGKD01059002.1_4664[T/C]	ACATTATAAAAAACAG[C/T]ATGAAGTGTACGTGT
12	AGKD01451885.1_830[T/G]	CAGACAGACACCTAC[A/C]AGTAGGCTATGTGTT
13	AGKD01003456.1_35321[A/G]	ACAAAGTAAGGTGGG[C/T]GGTGCAAGATTAGGC
14	AGKD01059002.1_16264[G/A]	AGTTTCAAATGAAAT[A/G]TGAATCCTTCAGGAT
15	AGKD01452978.1_6935[A/G]	GGTGAAATCATCGTG[C/T]ATAGGCTATCACAGT
16	AGKD01003456.1_36664[G/T]	GAGTACAGTGCACTC[A/C]GACAGACAGGCACAC
17	AGKD01340746.1_282[C/T]	TTTTGAGGAGGAGG[A/G]AAATACATTGTGTTT
18	AGKD01062103.1_13615[T/G]	TCTTTCACACATGAC[G/T]CCGTAATCCCCTTAC
19	AGKD01062103.1_13695[T/C]	GCAGGCAGCGCTTGA[C/T]GGCGAATTGTTTTGA
20	AGKD01007787.1_13666[G/A]	CATTTTATGCATTAT[A/G]TATCAGTGATGTTAC
21	AGKD01059002.1_3603[T/G]	AGACATAGGCTCAA[A/G/T]AATTCCTCACTGAGG
22	AGKD01000927.1_15806[C/G]	AGTGTGTTGCACATC[C/G]TGTCATGCAGACAAT
23	AGKD01458345.1_5634[G/T]	CACACTTTGTCAACA[A/C]ACATATATTATGTTA
24	AGKD01083029.1_8368[A/C]	CTGCTAATGTCCTTT[G/T]GTGGGTTTCTTTTGG
25	AGKD01062103.1_13615[T/G]	GTAACGGGATTACGG[A/C]GTCATGTGTGAAAGA
26	AGKD01062103.1_13695[T/C]	TCAAAACAATTCGCC[A/G]TCAAGCGCTGCCTGC
27	AGKD01032349.1_7232[A/C]	ACTCCAGTGCTAAG[G/T]GAAGTCTCCAACATT
28	AGKD01032349.1_14078[A/G]	CCTCCTCTCCCTCCC[A/G]GAGTCTGATGCAATT
29	AGKD01051656.1_1495[T/A]	ATTCATTAATCCAGC[A/T]ATAGTTACTGGCACC
30	AGKD01083029.1_5084[G/C]	TGCCAGAGACCCCA[C/G]TGGAGCGTTCCAGGGT
31	AGKD01455926.1_1814[G/A]	AGTCAACCGCAGTAC[C/T]GAAGCAAGCATGTAG
32	AGKD01003456.1_1873[G/C]	CGGACCAGGAGACAG[C/G]GACCCATCATTTTAT

# de polimorfismo de ADN	Nombre del polimorfismo de ADN	Secuencias de ADN
33	AGKD01037589.1_572[C/T]	GCAATGTTTCATCCTG[C/T]TTAATTCACCAAATG
34	AGKD01037589.1_1369[C/A]	CGCTACAGAAATGAC[A/C]GAAAATACACACTTC
35	AGKD01205804.1_11559[A/G]	AGATTTAGGAGGGTT[C/T]GCTCAAAATAAGAAA
36	AGKD01106761.1_1717[T/C]	TTATTCGGTGGTACC[C/T]ACTCTCAGAAATCTT

5. Proporcionar el efecto de la selección asistida por SNP

5 Inoculación 1: Un experimento se estableció con el fin de probar el efecto de la aplicación de la prueba de ADN con base en haplotipo SNP descrita anteriormente (1-4): Utilizando la prueba de ADN a base de haplotipo (con par 3 + 23 marcador, véase Tabla 3), 4 machos no resistentes, 6 machos resistentes, 6 hembras no resistentes, y 4 hembras resistentes se seleccionaron de la población reproductora de Aqua Gen. Todos los machos se cruzaron con todas las hembras, la producción de los cuatro grupos de RxR, RxN, NxR, y NxN; RxR consiste de la descendencia de machos resistentes y hembras resistentes, RxN consiste de la descendencia de machos resistentes y hembras no resistentes, NxR consiste de la descendencia de machos no resistentes y hembras resistentes, y NxN consiste de la descendencia de machos no resistentes y hembras no resistentes. Los grupos se transportaron a las instalaciones de prueba de inoculación (VESO Vikan, Namsos, Noruega) en el tamaño promedio de 0.2 g (alevines pre-arrancados), arrancados en 1 día de llegada, se aclimataron de acuerdo con el Procedimiento de Operación Estándar (SOP) S-2023, se tendieron y monitorizaron diariamente de acuerdo a S-2002 y S-2004. Los peces muertos se recogieron cada día de acuerdo con S-2000, y se registraron las mortalidades. Los parámetros ambientales se registraron diariamente. Cada uno de los grupos RxR, RxN, NxR, y NxN se probaron en dos tanques siguiendo un modelo de inoculación en baño (S-1079). Cada tanque tenía 100 alevines del grupo correspondiente. Se utilizó virus de necrosis pancreática infecciosa fresco (es decir, no congelado), procedente de un aislado de serotipo SP 1, pasaje j.no. V-1244 (aislado de campo noruego desde el 2001), el crecimiento y titulación del virus se realiza en la Escuela Noruega de Ciencias Veterinarias (Oslo, Noruega). Dos tanques adicionales se incluyeron como controles, que contenían peces con inoculación simulada de los cuatro grupos. Los resultados se proporcionan en la Figura 1.

25 Figura 1: Mortalidades en una prueba de inoculación de IPN realizada en cuatro diferentes grupos de peces producidos utilizando el método descrito en esta solicitud. De acuerdo con la prueba, todos los peces del grupo NxN eran no resistentes, todos los peces en los grupos NxR y RxN eran semirresistentes, mientras que todos los peces en el grupo RxR fueron resistentes. Los peces en el grupo de control tuvieron inoculación simulada, de modo que las mortalidades en este grupo representan las mortalidades esperadas en ausencia de virus.

30 Inoculación 2: Este experimento se estableció con el fin de comparar la mortalidad debido al aislado de virus estándar V-1244 aislado en 2001 con la mortalidad debida a una cepa de campo noruega aislada en 2012 de un criadero que experimenta la mortalidad relacionada con el IPN. Utilizando la prueba de ADN con base en el haplotipo (con par marcador 3+23, véase Tabla 3), 6 machos no resistentes, 5 machos resistentes, 6 hembras no resistentes, y 6 hembras resistentes se seleccionaron de la población reproductora de Aqua Gen. Todos los machos se cruzaron con todas las hembras, la producción de los cuatro grupos de RxR RxN, y NxN; RxR consisten de la descendencia de machos resistentes y hembras resistentes, RxN consiste de la descendencia de machos resistentes y hembras no resistentes, así como la descendencia de machos no resistentes y hembras resistentes, y NxN consiste de la descendencia de machos no resistentes y hembras no resistentes. Los grupos fueron transportados a las instalaciones de prueba de inoculación (VESO Vikan, Namsos, Noruega) en tamaño promedio de 0.2 g (alevines pre-arrancados), arrancados en 1 día de llegada, se aclimataron de acuerdo con el Procedimiento de Operación Estándar (SOP) S-2023, se tendieron y monitorizaron diariamente de acuerdo con S-2002 y S-2004. Los peces muertos se recogieron cada día de acuerdo con S-2000, y se registraron las mortalidades. Los parámetros ambientales se registraron diariamente. Cada uno de los grupos RxR, RxN y NxN se probaron en dos tanques paralelos para cada cepa de virus (V-1244 y cepa de campo) siguiendo un modelo de inoculación en baño (S-1079). Cada tanque tenía 100 alevines del grupo correspondiente. La cepa V-1244 aislada en 2001 se preparó por la Escuela Noruega de Ciencias Veterinarias (Oslo, Noruega), mientras que la cepa de campo se propagó y se valoró por Vaxxinova Noruega. Ambos aislamientos de virus se mantuvieron en refrigeración hasta su inoculación. Un tanque se incluyó como un control negativo, que contenía peces con inoculación simulada de los tres genotipos. La inoculación se terminó 45 días después de inoculación, y los resultados se proporcionan en las figuras 2 y 3. Los resultados demuestran que los peces RxR (como se determina por los métodos de la presente invención) son completamente resistentes a ambas cepas de IPNV.

Figura 2.

55 Mortalidad acumulativa en una inoculación en baño de alevines de salmón del Atlántico de diferentes genotipos IPN QTL inoculados con un aislado de prueba bien conocido de IPNV, V-1244 (Figura 2) o con una cepa de campo aislada de un criadero en 2012 (Figura 3).

6. Comparación de SNP conocidos con aquellos de la presente invención

60

Houston et al. (2012) identificaron polimorfismos de nucleótido único (SNPs) que fueron presuntamente asociados con la resistencia a IPN. En su papel revelan dos SNP (llamados Ssa0139ECIG y RAD_HT01) que se reportan tienen una particularmente fuerte asociación con resistencia a IPN. Se reportó el SNP Ssa0139ECIG por primera vez en un artículo de Moen et al., pero ese estudio no reportó ninguna forma de asociación a resistencia a IPN. Se reportó el RAD_HT01 por primera vez por Houston et al. (2012).

El SNP RAD_HT01 se identificó independientemente por el solicitante como parte de la detección con base en secuenciación de los polimorfismos de ADN asociados a resistencia a IPN discutidos anteriormente Sin embargo, se encontró que la asociación estimada a resistencia IPN era demasiado débil como para justificar más pruebas por genotipo; el valor de p (el nivel de significación de el SNP fue 0.0199, mientras que todos los SNP seleccionados para la prueba por el genotipado del presente solicitante tenían valores de p por debajo de 0.005).

El SNP Ssa0139ECIG no fue identificado independientemente por el solicitante, ya que este SNP no estaba cubierto por la secuencia de ADN de referencia utilizada en la búsqueda de la solicitante de SNP asociados a IPN. En su lugar, la asociación entre este SNP y resistencia a IPN fue probada por el solicitante mediante el genotipado de los progenitores de peces inoculados con IPN, seguido por la prueba estadística del efecto de los genotipos de SNP en estos progenitores sobre las tasas de mortalidad en su descendencia (de la misma manera discutida anteriormente para la presente invención). El grupo de datos consta de 285 grupos de hermanos completos con tasas de mortalidad registradas y progenitores genotipados. El SNP AGKD01021775.1_19790 [G/A] proporcionado en la Tabla 1 se incluyó en el análisis, como un control positivo.

La asociación entre la resistencia a SNP y IPN fue probada utilizando este modelo lineal (un SNP a la vez):

$$y = \mathbf{1}\mu + (\mathbf{Z}_s + \mathbf{Z}_d)\mathbf{u} + \mathbf{p}b + e$$

donde y es un vector de las tasas de mortalidad para todos los grupos de hermanos completos, μ es la media global, u es un vector de efectos genéticos aleatorios aditivos de los progenitores, Z_s y Z_d son matrices de incidencia padre y madre, p es un vector de copias de alelos de SNP en los progenitores (0-4) para cada grupo de hermanos completo, b es el coeficiente de regresión aleatorio asociado con el número de alelos de SNP parentales, y e es un vector de residuos aleatorios. Adicionalmente, $u \sim N(\mathbf{0}, A\sigma_u^2)$, $b \sim N(\mathbf{0}, \sigma_b^2)$, y $e \sim N(\mathbf{0}, I\sigma_e^2)$, donde A es la matriz de relaciones de numerador para los progenitores, $\sigma_u^2 = \frac{1}{4}\sigma_g^2$, σ_b^2 es la varianza genética (poligénica) aditivo total, σ_b^2 es la varianza del coeficiente de regresión aleatorio y σ_e^2 es la varianza residual de las tasas de mortalidad del grupo de hermanos completo.

Los componentes de varianza se estimaron para todos los efectos aleatorios (padre y madre genético aditivo, regresión aleatoria del efecto de SNP y residual), utilizando la metodología REML con el software DMU (Madsen y Jensen 2008). Para probar la importancia de un SNP, el modelo completo se comparó con un modelo reducido sin la regresión aleatoria en el número de alelos de SNP parentales, utilizando una prueba de razón de verosimilitud.

Se encontró que el SNP Ssa0139ECIG no tenía efecto significativo sobre la mortalidad de IPN (valor de $p = 0.64$), mientras que el SNP AGKD01021775.1_19790 [G/A] era extremadamente significativo (valor de $p = 2.86E-18$).

En el documento de Houston et al. (2012), los SNPs Ssa0139ECIG y RAD_HT01 se presentan por tener efectos fuertes (y aproximadamente iguales) sobre resistencia a IPN. Los resultados descritos anteriormente indican que los polimorfismos de ADN descritos por Houston et al. (2012) tienen poco o ningún efecto sobre la resistencia a IPN en la población probada, mientras que los polimorfismos de ADN descritos en la presente solicitud tienen efectos fuertes y muy significativos.

Referencias

Houston RD, Haley CS, Hamilton A, Guy DR, Tinch AE, Taggart JB, McAndrew BJ, Bishop SC (2008) Major quantitative trait loci affect resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Genetics* 178: 1109-15.

Houston RD, Davey JW, Bishop SC, Lowe, NR, Mota-Velasco JC et al. (2012) Characterisation of QTL-linked and genome-wide restriction site-associated DNA (RAD) markers in farmed Atlantic salmon. *BMC Genomics* 13: 244,

Lien S, Gidskehaug L, Moen T, Hayes BJ, Berg PR, Davidson WS, Omholt SW, Kent MP (2011) A dense SNPbased linkage map for Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals extended chromosome homeologies and striking differences in sex-specific recombination patterns. *BMC Genomics* 12: 615.

Madsen and Jensen (2008) DMU: a user's guide. A package for analysing multivariate mixed models, version 6, release 5.0. University of Aarhus, Tjele, Dinamarca.

5 Moen T, Hayes B, Baranski M, Berg PR, Kjøglum S, Koop BF, Davidson WS, Omholt SW, Lien S (2008) A linkage map of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) based on EST-derived SNP markers. *BMC Genomics* 9: 223.

10 Moen T, Baranski M, Sonesson AK, Kjøglum S (2009) Confirmation and fine-mapping of a major QTL for resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*): population-level associations between markers and trait. *BMC Genomics* 10: 368.

15 Shifman S, Kuypers J, Kokoris M, Yakir B, Darvasi A (2003) Linkage disequilibrium patterns of the human genome across populations. *Human Molecular Genetics* 12: 771-776.

Thorsen J, Zhu B, Frengen E, Osoegawa K, de Jong, PJ, Koop BF, Davidson WS, Høyheim B (2005) A highly redundant BAC library of Atlantic salmon (*Salmo salar*): an important tool for salmon projects. *BMC Genomics* 6: 50.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para predecir resistencia a necrosis pancreática infecciosa en el salmón del Atlántico, el método comprende determinar los alelos presentes en un polimorfismo de ADN en el salmón y predecir si o no el salmón es resistente a necrosis pancreática infecciosa con base en la determinación de los alelos, en el que el polimorfismo de ADN se selecciona de el grupo proporcionado en la Tabla 1.
- 10 2. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la capacidad de los polimorfismos de ADN para predecir la resistencia a IPN se puede cuantificar como que tiene una estadística r^2 que es más grande de 0.3.
- 15 3. Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polimorfismo de ADN se selecciona de cualquiera de los siguientes:-
 AGKD01281000.1_4157[T/TA]; AGKD01281000.1_5527[T/TAT]; AGKD01021775.1_19790[G/A];
 AGKD01281000.1_5251[A/G], y; AGKD01281000.1_4338[A/T].
- 20 4. Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se determinan los alelos presentes en un polimorfismo de ADN adicional, y una predicción de sí o no el salmón es resistente a necrosis pancreática infecciosa es con base en la determinación de los alelos en ambos polimorfismos de ADN.
- 25 5. Un método como se reivindica en la reivindicación 4, en el que el polimorfismo de ADN y polimorfismo de ADN adicional se seleccionan de uno cualquiera de los pares proporcionados en la Tabla 3.
- 30 6. Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polimorfismo de ADN(s) se ubica sobre el cromosoma 26.
7. Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de determinar los alelos presentes en un polimorfismo de ADN en el salmón se practica sobre una muestra de tejido muscular, muestra de sangre, muestra de hígado y/o una pinza de aleta.
8. Un método para seleccionar un salmón del Atlántico que es adecuado para uso como reproductor, en el que el salmón se selecciona con base en la predicción por el método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la que el salmón tendrá resistencia a necrosis pancreática infecciosa.

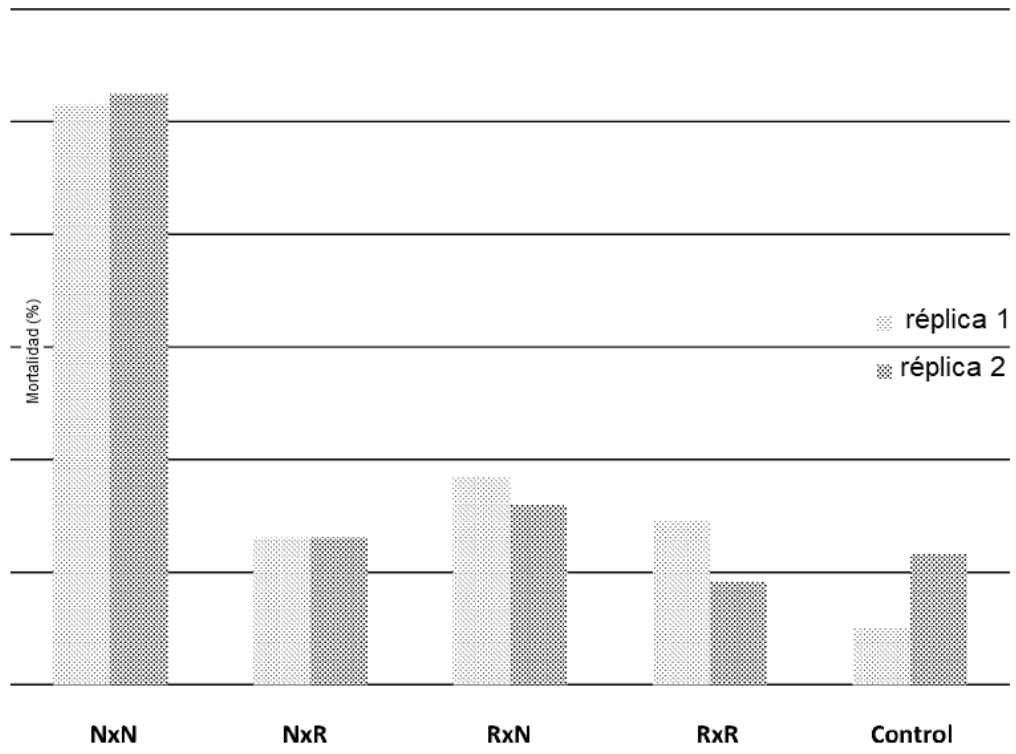


FIGURA 1

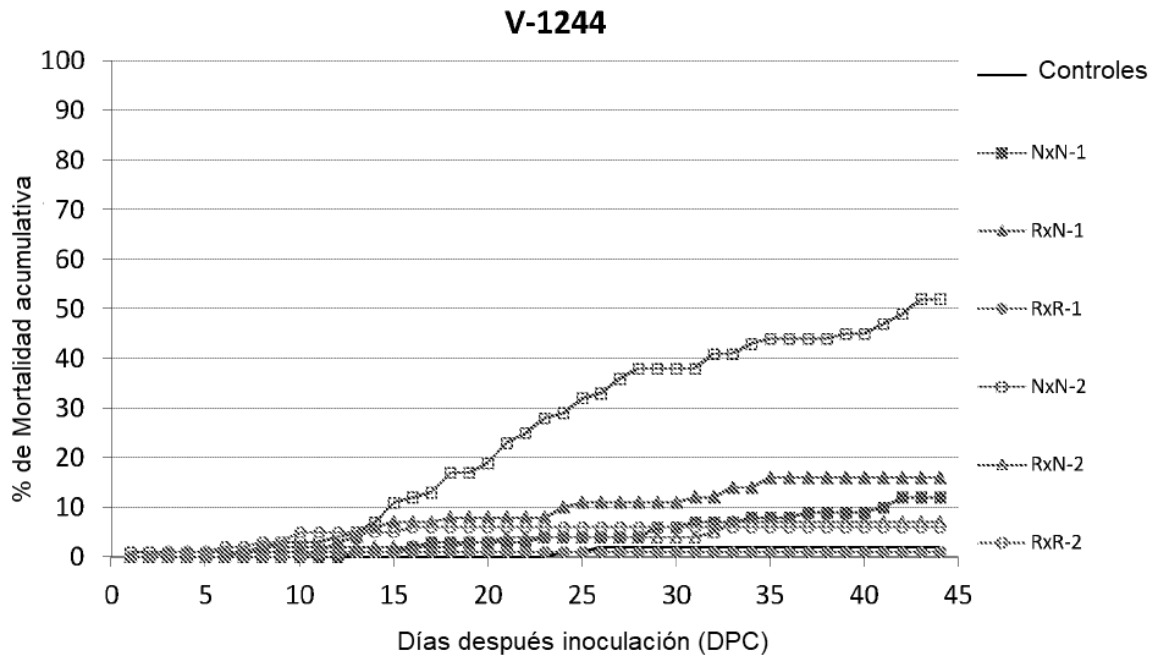


FIGURA 2

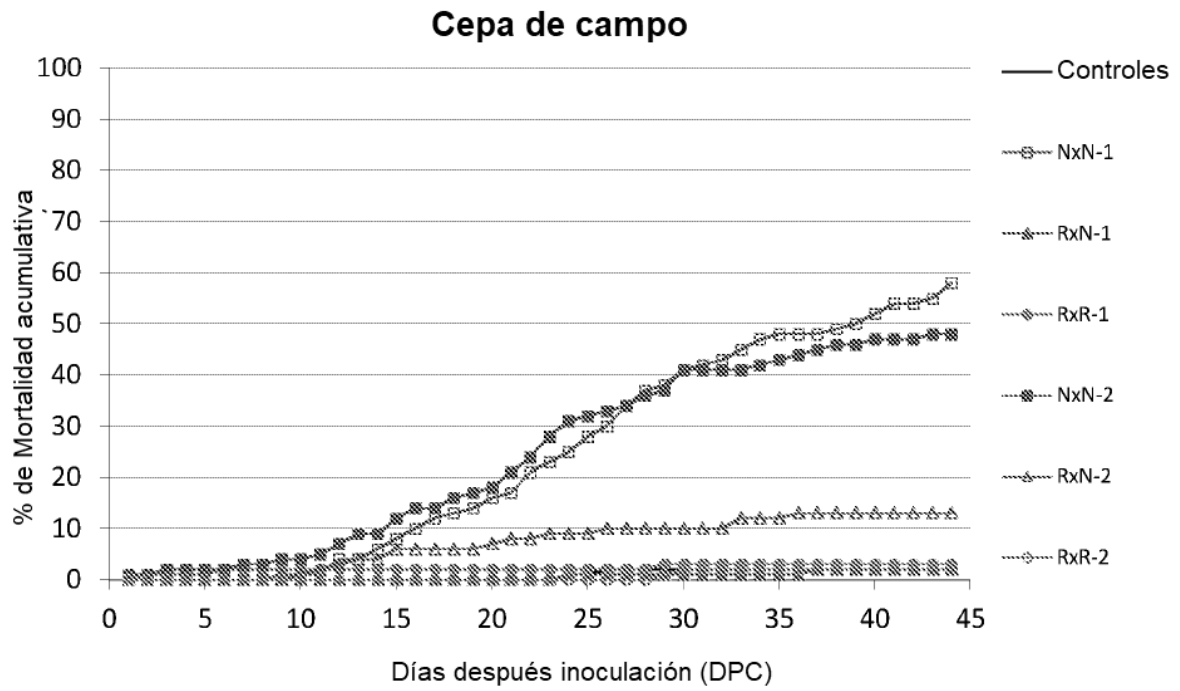


FIGURA 3