

MARÍA CRISTINA DIEZ TASCÓN

QTLS IMPLICADOS EN
LA PRODUCCIÓN LÁCTEA OVINA:
ESTUDIO DEL CROMOSOMA 6
MEDIANTE MARCADORES
DE TIPO MICROSATÉLITE



Universidad de León
Secretariado de Publicaciones

Reservados todos los derechos.
Ni la totalidad ni parte de este libro puede reproducirse o transmitirse por ningún procedimiento electrónico o mecánico, incluyendo fotocopia, grabación magnética o cualquier almacenamiento de información y sistema de recuperación, sin permiso escrito del Servicio de Publicaciones de la Universidad de León.

ISBN: 84-7719-796-2
Depósito Legal: LE.338-2000

Imprime: CELARAYN, s.l. (impresión electrónica)
Ordoño II, 31 • 24001 león

© María Cristina Diez Tascón
© Servicio de Publicaciones
Universidad de León

La autora de esta memoria ha sido beneficiaria de una beca de postgrado concedida por la Excelentísima Diputación Provincial de León.

La investigación realizada ha sido financiada por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT), con cargo a los proyectos AGF93-0273 y AGF96-0819-CP.

A mis padres
A mis hermanos
A Octavio

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento más sincero

A los directores de esta Tesis Doctoral, el Dr. Fermin San Primitivo Tirados y la Dra. Yolanda Bayón González, por su sabia orientación, su apoyo incondicional y por la confianza que me han demostrado a lo largo de todo este tiempo.

Al Dr. Fernando de la Fuente Crespo por su importante contribución al procesado estadístico de los datos, por su santa paciencia y su buen humor.

Al Dr. Juan José Arranz Santos, por su inestimable ayuda, especialmente en las últimas fases de este trabajo.

A mis compañeros, porque nunca han dudado en echarme una mano, y por todos los buenos ratos que hemos compartido.

A los ganaderos de ANCHE, por su esfuerzo diario.

A todos aquellos de los que he aprendido.

A mi familia, por estar siempre a mi lado.

A Octavio, por animarme siempre a seguir mi camino y por contagiarme su energía.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO.....	21
Introducción	21
Planteamiento	22
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	25
Aportaciones de los marcadores a la detección de QTLs	25
1. Detección de QTLs sin el empleo de marcadores	26
2. Detección de QTLs con el empleo de marcadores	27
2. 1. Utilización de marcadores individuales	28
2. 2. Utilización de marcadores ligados	29
3. Tipos de marcadores	29
3. 1. Marcadores morfológicos	29
3. 2. Polimorfismos bioquímicos	30
3. 3. Polimorfismos a nivel del DNA	30
a. RFLP.....	30
b. SSCP.....	30
c. RAPD.....	31
d. Secuencias de DNA repetidas en tándem	31
d. 1. Minisatélites	31
d. 2. Microsatélites	32
Diseños experimentales para la detección de QTLs	33
1. Poblaciones experimentales	34
1. 1. Cruzamientos entre líneas endogámicas	34
1. 2. Familias individuales de una población	35
a. Familias de medio hermanos: el diseño padre	35
b. Familias de hermanos	36
1. 3. Cruzamientos entre poblaciones	36
1. 4. Poblaciones cerradas	37
2. Modelos experimentales	37
2. 1. Cruzamientos entre líneas endogámicas	38
2. 2. Cruzamientos entre poblaciones	40
2. 3. Diseño padre	41

3. Métodos de optimización	43
3. 1. Obtención de réplicas de la progenie	44
3. 2. Diseño abuelo	44
3. 3. Análisis de los extremos de la población	45
3. 4. Mezcla selectiva de DNA	46
3. 5. Muestreo secuencial	46
4. Metodología estadística	47
4. 1. Métodos que utilizan un marcador cada vez	47
4. 2. Métodos que utilizan marcadores ligados	49
Selección asistida por marcadores	51
1. Ventajas de la selección asistida por marcadores	51
1. 1. Caracteres con algunas peculiaridades	51
1. 2. Dominancia y epistasia	52
1. 3. Caracteres correlacionados negativamente	52
1. 4. Cruzamientos con fines de mejora genética	52
2. Aplicaciones de la selección asistida por marcadores	54
Mapas genéticos. El cromosoma 6 ovino	56
1. El mapa genético ovino	58
2. El cromosoma 6 ovino	60
Loci que afectan a caracteres productivos	61
1. Especie ovina	64
1. 1. Loci implicados en caracteres cárnicos	64
1. 2. Loci implicados en caracteres reproductivos	65
1. 3. Loci implicados en caracteres de producción de lana	65
2. Especie bovina	65
2. 1. Loci implicados en caracteres de producción láctea	65
2. 2. Loci implicados en caracteres cárnicos	69
2. 3. Loci implicados en caracteres reproductivos	70
3. Especie porcina	70
3. 1. Loci implicados en caracteres cárnicos	70
3. 2. Loci implicados en caracteres reproductivos	72

MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
Diseño experimental.....	73
Animales.....	74
Marcadores	75
Caracteres estudiados	77
1. Valores fenotípicos	78
2. Valores genéticos	80
Metodología laboratorial	80
1. Extracción del DNA	80
1. 1. Extracción del DNA a partir de sangre	80
1. 2. Extracción del DNA a partir de semen	81
2. Amplificación de los microsatélites mediante PCR	81
3. Separación electroforética del producto amplificado	82
3. 1. Electroforesis en gel de agarosa	83
3. 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida	84
a. Electroforesis en gel de secuenciación	84

b. Electroforesis mediante equipo de secuenciación automática.....	85
4. Identificación de los genotipos individuales	85
Metodología estadística.	86
1. Parámetros calculados para los marcadores	86
2. Mapa de ligamiento	86
3. Estudio de detección de QTLs	86
3. 1. Análisis de marcadores individuales	87
a. Variables de valor genético	87
b. Variables fenotípicas	87
3. 2. Análisis por intervalos	88
a. Método de regresión para marcadores múltiples	89
b. Método no paramétrico	89
RESULTADOS.....	91
Variabilidad de los marcadores	91
Individuos informativos	93
Mapa de ligamiento	107
Estudio de detección de QTLs	111
1. Análisis de marcadores individuales	111
1. 1. Caracteres “cantidad de leche” y “cantidad de proteína”	111
1. 2. Carácter “porcentaje de proteína”	112
2. Análisis por intervalos	117
DISCUSIÓN	121
Marcadores	121
1. Variabilidad	121
2. Individuos informativos	122
3. Mapa de ligamiento	124
Estudio de detección de QTLs	125
1. Análisis estadísticos	126
2. Caracteres “cantidad de leche” y “cantidad de proteína”	128
3. Carácter “porcentaje de proteína”	133
CONCLUSIONES	137
RESUMEN.....	139
SUMMARY	141
BIBLIOGRAFÍA	143
ANEXO	157
ÍNDICE DE TABLAS	15
ÍNDICE DE FIGURAS	17
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	19

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Probabilidades y valores fenotípicos de un carácter cuantitativo esperados en un diseño F2	39
Tabla 2. Los número de descendientes necesarios para detectar un QTL de efecto $2a = 0,282$, para $r = 0$, en función del grado de dominancia (d)	40
Tabla 3. Probabilidades y valores fenotípicos de un carácter cuantitativo esperados en un “diseño padre”	43
Tabla 4. Potencia estadística del “diseño padre”, en función del número de padres, de hijos por padre, del efecto del QTL ($E = a/$) y probabilidad de error de Tipo I ()	43
Tabla 5. Loci ubicados por métodos físicos en el cromosoma 6 ovino.....	63
Tabla 6. Marcadores de Tipo I localizados en el mapa de ligamiento del cromosoma 6 ovino	64
Tabla 7. Número total de hijas asignadas a cada familia	76
Tabla 8. Número de madres analizadas por familia y explotación	76
Tabla 9. Origen y características de los marcadores analizados	77
Tabla 10. Marcadores analizados para cada familia	79
Tabla 11. Secuencias de los “primers” y ciclos de temperaturas empleados para la amplificación de los microsatélites	83
Tabla 12. Número de alelos y valores de PIC para cada marcador	93
Tabla 13. Número de hijas analizadas en cada familia	105

Tabla 14. Probabilidad de exclusión de la paternidad (PE _n) y errores detectados por cada marcador	105
Tabla 15. Número de hijas informativas para cada familia y marcador	108
Tabla 16. Porcentaje de hijas informativas prescindiendo del genotipo materno	108
Tabla 17. Valores de probabilidad (P) obtenidos para el parámetro VGL	114
Tabla 18. Valores de probabilidad (P) obtenidos para el parámetro VFL	114
Tabla 19. Valores de probabilidad (P) obtenidos para el parámetro VGCP	115
Tabla 20. Valores de probabilidad (P) obtenidos para el parámetro VFCP	115
Tabla 21. Valores de probabilidad (P) obtenidos para el parámetro VGPP	116
Tabla 22. Valores de probabilidad (P) obtenidos para el parámetro VFPP.....	116
Tabla 23. Valores de probabilidad (P) para los caracteres “cantidad de leche” y “cantidad de proteína”, en la Familia 6	130
Tabla 24. Valores de probabilidad (P) para el carácter “porcentaje de proteína”.....	134

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aportaciones de los marcadores a la detección de QTLs	28
Figura 2. Diseño padre	41
Figura 3. Mapa de ligamiento del cromosoma 6 ovino	62
Figura 4. Diseño experimental	75
Figura 5. Mapa de ligamiento de los microsatélites analizados	78
Figura 6. Frecuencias alélicas del microsatélite OarCP125	94
Figura 7. Electroferograma del microsatélite OarCP125	94
Figura 8. Frecuencias alélicas del microsatélite McM53	95
Figura 9. Electroferograma del microsatélite McM53	95
Figura 10. Frecuencias alélicas del microsatélite OarAE101	96
Figura 11. Autorradiografía del microsatélite OarAE101	96
Figura 12. Frecuencias alélicas del microsatélite BM143	97
Figura 13. Autorradiografía del microsatélite BM143	97
Figura 14. Frecuencias alélicas del microsatélite BMS360	98
Figura 15. Electroferograma del microsatélite BMS360	98
Figura 16. Frecuencias alélicas del microsatélite BM4621	99
Figura 17. Autorradiografía del microsatélite BM4621	99

Figura 18. Frecuencias alélicas del microsatélite BM4311	100
Figura 19. Electroferograma del microsatélite BM4311	100
Figura 20. Frecuencias alélicas del microsatélite CSRD293	101
Figura 21. Electroferograma del microsatélite CSRD293	101
Figura 22. Frecuencias alélicas del microsatélite OarJMP8	102
Figura 23. Autorradiografía del microsatélite OarJMP8	102
Figura 24. Frecuencias alélicas del microsatélite McM214	103
Figura 25. Electroferograma del microsatélite McM214	103
Figura 26. Frecuencias alélicas del microsatélite OarJMP12	104
Figura 27. Electroferograma del microsatélite OarJMP12	104
Figura 28. Haplotipos más probables de los padres	109
Figura 29. Mapa de ligamiento obtenido para el cromosoma 6 ovino	110
Figura 30. Nivel de información del mapa de ligamiento	117
Figura 31. Distribución de los valores del $\log_{10} (1/P)$ a lo largo del cromosoma 6 en la Familia 6 (Análisis de regresión)	118
Figura 32. Distribución de los valores del $\log_{10} (1/P)$ a lo largo del cromosoma 6 en la Familia 6 (Análisis no paramétrico)	119
Figura 33. Distribución del carácter “cantidad de proteína” en la Familia 6	130
Figura 34. Comparación de los mapas de ligamiento del cromosoma 6 ovino y bovino	132

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

cM: centimorgan

dATP: desoxiadenosina trifosfato

dCTP: desoxicitidina trifosfato

dGTP: desoxiguanosina trifosfato

dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfato

dTTP: desoxitimidina trifosfato

DNA: ácido desoxirribonucléico

EDTA-K₃: sal tripotásica del ácido etilendiamino tetraacético

EDTA: sal disódica del ácido etilendiamino tetraacético

ibd: idéntico por descendencia

MAS: selección asistida por marcadores

PCR: reacción en cadena mediante la polimerasa

P_{En}: probabilidad de exclusión de la paternidad

PIC: contenido de información del polimorfismo

QTL: locus que afecta a un carácter cuantitativo (Quantitative Trait Locus)

RAPD: polimorfismo de DNA de amplificación aleatoria

RFLP: polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción

SDS: dodecilsulfato sódico

STR: repetición simple en tándem

SSCP: polimorfismo de conformación de cadena simple

TEMED: N,N,N',N' tetrametiletilendiamina

Tris: hidroximetil aminometano

VNTR: repetición en tándem de número variable

INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO

INTRODUCCIÓN

Los principios y modelos desarrollados por la Genética Cuantitativa, aplicados a los programas de selección y mejora genética durante los últimos cincuenta años, han incrementado considerablemente la eficiencia económica de las especies domésticas. La eficacia demostrada por dichos métodos, junto con la dificultad que conlleva el estudio individual de cada uno de los loci implicados en la expresión de un carácter cuantitativo, dejaron en un segundo plano, durante mucho tiempo, el intento de resolver, en términos de herencia mendeliana, el componente genético de los caracteres productivos.

La principal limitación para el análisis de los efectos individuales de estos loci fue, durante décadas, la escasa disponibilidad de marcadores genéticos apropiados. Si bien la utilización de los polimorfismos bioquímicos e inmunológicos permitió un avance relativo en este campo, el impulso clave fue el descubrimiento de los polimorfismos de DNA, en particular de las secuencias de tipo microsatélite.

Los microsatélites se han convertido, en muy pocos años, en los marcadores genéticos de mayor utilidad, debido a que presentan todas las características que califican a un marcador como ideal. Su estructura, constituida por repeticiones en tándem de una unidad iterativa compuesta por un reducido número de bases, explica el alto grado de polimorfismo que presentan. Además, son muy abundantes, se encuentran distribuidos de manera uniforme en el genoma y muestran un tipo de herencia mendeliana codominante. Por otra parte, su análisis mediante la técnica de PCR permite una identificación rápida y precisa de los genotipos de los individuos.

La utilidad de los microsatélites como marcadores se pone especialmente de relieve en el caso particular de los estudios destinados a la detección de los loci determinantes de los caracteres cuantitativos (QTLs). Los experimentos diseñados con tal fin requieren un elevado número de marcadores genéticos, cuyas localizaciones cromosómicas conocidas sean utilizadas como puntos de referencia.

De forma paralela al descubrimiento de nuevos tipos de marcadores genéticos se ha producido el desarrollo de distintos diseños experimentales y procedimientos estadísticos de análisis, que hacen posible una detección más eficiente del ligamiento entre los marcadores y los QTLs. El desarrollo actual de los mapas de ligamiento permite, no sólo la detección del efecto asociado al marcador, sino también la localización relativa del QTL, en términos de distancia a los marcadores próximos, y la estimación de su efecto.

Muchos especialistas coinciden en que la información molecular no va a sustituir a los programas de selección convencionales, pero sí puede complementarlos. La Selección Asistida por Marcadores (MAS) puede ayudar a resolver aquellas situaciones en las que los métodos tradicionales no han sido totalmente eficaces, como es el caso de los caracteres de baja heredabilidad o de aquellos que sólo pueden medirse en un sexo.

La detección de QTLs constituye, a su vez, un primer paso para la determinación de su naturaleza, a través de la clonación de posición, o bien del análisis de los genes candidatos presentes en la región cromosómica particular. Esta metodología facilitará el análisis de los caracteres de importancia económica, mediante la identificación y el aislamiento de sus componentes biológicos individuales. Más allá del campo de la Producción Animal, la identificación de los alelos que causan predisposición a enfermedades multifactoriales comunes puede permitir el desarrollo de métodos de prevención adecuados.

Finalmente, cabe añadir que la base teórica de la Genética Cuantitativa será más realista cuando se conozcan el número y las propiedades de los genes implicados en cada carácter, lo que contribuirá a comprender de una forma más profunda el fenómeno de la evolución.

PLANTEAMIENTO

La producción láctea constituye un carácter de elevada importancia económica, sumamente complejo desde el punto de vista genético. La expresión de los genes que codifican las proteínas lácteas ocurre únicamente durante la lactación, en las células epiteliales de la glándula mamaria. Para que tenga lugar el inicio de la lactogénesis, durante el último tercio de la gestación el sistema endocrino experimenta toda una cascada de eventos que preparan la glándula mamaria para la secreción de leche.

Hasta el momento, los programas genéticos aplicados se han centrado, fundamentalmente, en conseguir un incremento en la cantidad de leche producida. La mejora, tanto a nivel cuantitativo como cualitativo, sería mucho más eficiente si se conocieran cada uno de los loci que intervienen en la expresión de este carácter.

En los últimos años, se han abordado en las especies ganaderas diversos estudios relacionados con la detección de loci implicados en la determinación de caracteres cuantitativos

(QTLs). En la mayoría de los casos, los marcadores genéticos utilizados han sido las secuencias de tipo microsatélite, ya que reúnen las características que mejor se adaptan a este tipo de diseños experimentales.

En el caso de los caracteres de producción láctea los experimentos se han centrado en el ganado vacuno. En esta especie, gracias a la inseminación artificial, cuya utilización se ha implantado desde hace mucho tiempo, se dispone de familias muy grandes con un progenitor común, lo que permite obtener una notable potencia estadística en los diseños destinados a la detección de QTLs. En la actualidad se están realizando estudios en los que se incluye toda la dotación cromosómica, y que han permitido localizar, muy recientemente, varias regiones con influencia sobre este tipo de producción.

En el ganado ovino no se conocen investigaciones paralelas. El desarrollo de los mapas de ligamiento ha sido posterior al de la especie bovina y la estructura poblacional de la mayoría de las razas ovinas no ha sido la más adecuada, disponiéndose en pocos casos de familias grandes que permitan emprender un estudio de localización de QTLs, sin recurrir a un diseño de cruzamientos entre poblaciones diferenciadas genéticamente. La gran cantidad de agrupaciones raciales ovinas, aisladas reproductivamente entre sí, constituye un problema adicional.

No obstante, hay que considerar que el ganado ovino presenta, en la actualidad, algunos aspectos favorables, respecto al vacuno. Generalmente se asume que, debido a la intensa selección a la que ha estado sometido durante largo tiempo este último, los QTLs con efecto importante pueden estar próximos a la fijación o incluso ya fijados, mientras que los que se encuentran segregando son aquellos de efectos menores. Dado que la contribución individual de estos loci a la varianza fenotípica total es modesta, su localización no resulta sencilla. En una situación muy distinta se encuentran las poblaciones ovinas, en las que se espera una variabilidad genética mucho mayor.

El estudio planteado se realiza en la oveja de raza Churra, que constituye el grupo de ganado ovino más importante de la Comunidad Autónoma de Castilla y León. Desde el año 1986 se está desarrollando un programa de Mejora Genética, coordinado por la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino Selecto de Raza Churra (ANCHE) y dirigido por el grupo de Genética del Departamento de Producción Animal I de la Universidad de León. El objetivo de selección es incrementar la cantidad y la calidad de la leche producida, procurando alterar lo menos posible las características de rusticidad de la raza. El esquema de selección implica la realización de pruebas de descendencia con fines de valoración genética. La primera valoración de sementales se realizó en el año 1990, y hasta 1993 el reducido número de inseminaciones fue un factor limitante. En los últimos años se ha producido un incremento notable del número de rebaños y de ovejas incluidos en las pruebas de valoración.

En la oveja Churra parecían concurrir una serie de condiciones que la convertían en un objetivo adecuado para este tipo de estudios:

~ Es una raza de aptitud fundamentalmente láctea, cuyo reciente programa de selección permite esperar un nivel elevado de variabilidad en los loci implicados en esta producción.

~ El esquema de selección contempla la inseminación artificial como nexo de unión de los rebaños, lo que permite disponer de familias relativamente grandes de medio-hermanas, repartidas en diferentes explotaciones.

~ Se encuentran a nuestra disposición tanto los datos del control lechero oficial, como las valoraciones genéticas de los reproductores estimadas por nuestro grupo de investigación.

Debido a todo ello, y a pesar de que el tamaño de las familias no era muy elevado en el momento de abordar el estudio, consideramos de interés iniciar una primera aproximación a la detección de QTLs implicados en la producción de leche del ganado ovino.

El estudio se centró en el cromosoma 6, cuya elección se fundamentó en varios aspectos. En primer lugar, a este cromosoma se han asignado los loci responsables de los tipos proteicos mayoritarios de la leche, las caseínas, que podrían constituir un factor determinante de los niveles productivos. En segundo lugar, en este cromosoma ovino se han centrado muchas investigaciones, debido a que en él se localiza el locus Booroola, de elevado interés económico. Como consecuencia de lo anterior, es el cromosoma ovino para el que se ha obtenido el mapa de ligamiento más completo.

En función de todo lo expuesto anteriormente, nos planteamos como **OBJETIVO** abordar la detección de QTLs implicados en la producción láctea del ganado ovino, centrándonos en el cromosoma 6 y utilizando, como marcadores genéticos, secuencias de tipo microsatélite.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

APORTACIONES DE LOS MARCADORES A LA DETECCIÓN DE QTLS

El modelo cuantitativo considera que la variación genética continua es debida, por una parte, a la acción simultánea de un gran número de loci, cuyo efecto individual es pequeño y aditivo y, por otra, a la influencia ambiental, así como a la interacción entre ambas.

La transmisión de los loci implicados en la expresión de los caracteres cuantitativos, está regida por los mismos principios genéticos que regulan la herencia cualitativa. Sin embargo, el seguimiento individual de cada uno de esos loci, se ha visto dificultado por la ausencia de una relación observable entre genotipo y fenotipo.

Cabe destacar, no obstante, que la idea de separar los diferentes loci a través de su relación de ligamiento con un marcador, ya fue propuesta por Karl Sax en 1923. Los experimentos de SAX (1923), realizados acerca del aspecto de las semillas de la judía común (*Phaseolus vulgaris*), demostraron la asociación entre un carácter cuantitativo, como es el tamaño de la semilla, y ciertos caracteres de herencia mendeliana, relacionados con la pigmentación de la misma (SOLLER, 1990; KEARSEY y POONI, 1996).

Años más tarde, BREESE y MATHER (1957) desarrollaron métodos para obtener cromosomas recombinantes, poseedores de un determinado segmento delimitado por marcadores. De este modo, fueron capaces de estudiar, segmento a segmento, la influencia del cromosoma III en el número de quetas abdominales y esternopleurales de *Drosophila*, y demostrar, en cada uno de ellos, la existencia de loci con efecto relevante sobre los caracteres estudiados.

A partir de la combinación de ambos conceptos, THODAY (1961) plantea la posibilidad de determinar sistemáticamente la totalidad de los loci que contribuyen a la expresión de un cierto carácter cuantitativo, por medio del análisis de ligamiento a marcadores genéticos distribuidos por todo el genoma.

La limitación principal para poner en práctica esta propuesta fue, durante años, la ausencia de marcadores genéticos adecuados. Los marcadores morfológicos, además de ser es-

casos, presentaban múltiples inconvenientes, como el bajo grado de polimorfismo en las poblaciones naturales, o el hecho de estar sujetos a relaciones de dominancia y epistasia. El descubrimiento de los marcadores inmunológicos y bioquímicos, si bien supuso un gran avance, no fue suficiente para permitir un estudio exhaustivo del genoma. Con la introducción de los marcadores identificados a nivel de DNA, y de manera especial las secuencias de tipo microsatélite, el problema de disponer de marcadores óptimos se considera virtualmente resuelto.

En la actualidad, existen mapas genéticos para todas las especies domésticas de interés productivo, algunos de los cuales se encuentran próximos a la saturación. Esto hace potencialmente posible la localización cromosómica precisa de los loci que afectan a los caracteres cuantitativos. Cada uno de estos loci recibe la designación de QTL (del inglés, Quantitative Trait Locus), desde que GELDERMANN introdujera este concepto en 1975.

1. DETECCIÓN DE QTLS SIN EL EMPLEO DE MARCADORES

Distintos loci que influyen sobre caracteres cuantitativos han podido ser evidenciados tras el descubrimiento de ciertos alelos, cuya contribución a la expresión fenotípica del carácter es lo suficientemente importante como para detectarse mediante el análisis de su segregación individual. En general, su efecto es superior a tres desviaciones estándar con respecto a la media poblacional, valor que caracteriza a las mutaciones mendelianas clásicas.

Desde el punto de vista de la producción animal, podemos citar varios ejemplos de loci de efecto mayor que influyen sobre caracteres cuantitativos, como el locus *MH* (conocido como gen de la hipertermia maligna), implicado en características cárnicas en la especie porcina, el locus *mh* implicado en la hipertrofia muscular bovina o el locus *FecB* responsable del fenotipo “booroola” que influye en la prolificidad de la especie ovina.

Cuando un QTL está segregando en una población, la distribución global de los fenotipos depende de las distribuciones de las distintas clases genotípicas. Teniendo en cuenta este hecho, los principios en los que se basa la detección del efecto del locus cuantitativo son los siguientes (ELSEN, 1993; FALCONER y MACKAY 1996):

~ *Desviación de la normalidad y multimodalidad.* El efecto de la segregación de un locus puede deducirse de la observación de una modificación en la forma normal de la curva de distribución fenotípica del carácter en la población. Esta modificación puede consistir en una desviación de la normalidad (de tipo platicúrtico o leptocúrtico) o en una multimodalidad, si el efecto del locus es lo suficientemente grande.

~ *Proporciones mendelianas.* Dentro de una familia, las proporciones de las distintas clases genotípicas pueden predecirse a partir de las leyes de la herencia mendeliana. De este modo, conociendo los genotipos parentales, es posible tipificar la distribución del carácter en la familia.

~ *Heterogeneidad de la varianza entre familias.* La variabilidad entre familias viene explicada por la posibilidad de que el QTL se encuentre segregando en unas familias, pero no en otras. De igual manera, existirán diferencias entre las familias donde el QTL segregue, en función de las combinaciones que presenten los genotipos parentales.

La mayoría de los análisis estadísticos dirigidos a la detección del efecto de un QTL tienen en cuenta estos principios. En general, se trata de contrastar dos hipótesis. Bajo la hipótesis H_0 , que considera la no existencia del QTL, las curvas de distribución fenotípicas (tanto la global como la familiar) serán normales. Bajo la hipótesis H_1 , el efecto de la segregación del QTL dará lugar a una modificación en la normalidad de dichas curvas.

El análisis sin utilización de marcadores presenta tres inconvenientes fundamentales:

~ falta de robustez, debido a la complejidad que supone la diferenciación de un desvío de la normalidad en la distribución fenotípica.

~ baja potencia estadística, relacionada con la dificultad para detectar el efecto del QTL, aunque éste se encuentre segregando.

~ ineficacia para evaluar la posible segregación de varios QTLs.

2. DETECCIÓN DE QTLs CON EL EMPLEO DE MARCADORES

En ausencia de marcadores, la posible segregación de un QTL viene indicada por la ausencia de normalidad en la distribución fenotípica del carácter. No obstante, la mayoría de los loci que segregan en una población no dan lugar a un efecto aparente.

La disponibilidad de un marcador que cosegregue con el locus cuantitativo permite “marcar” cada una de las clases genotípicas de dicha distribución. Este fenómeno aparece ilustrado en la Figura 1: una distribución leptocúrtica puede ser originada por la naturaleza misma del carácter (por ejemplo, el peso de la canal del cerdo), o por la existencia de dos o tres distribuciones genotípicas subyacentes. En presencia de un marcador es posible diferenciar ambas situaciones (ELSEN, 1994).

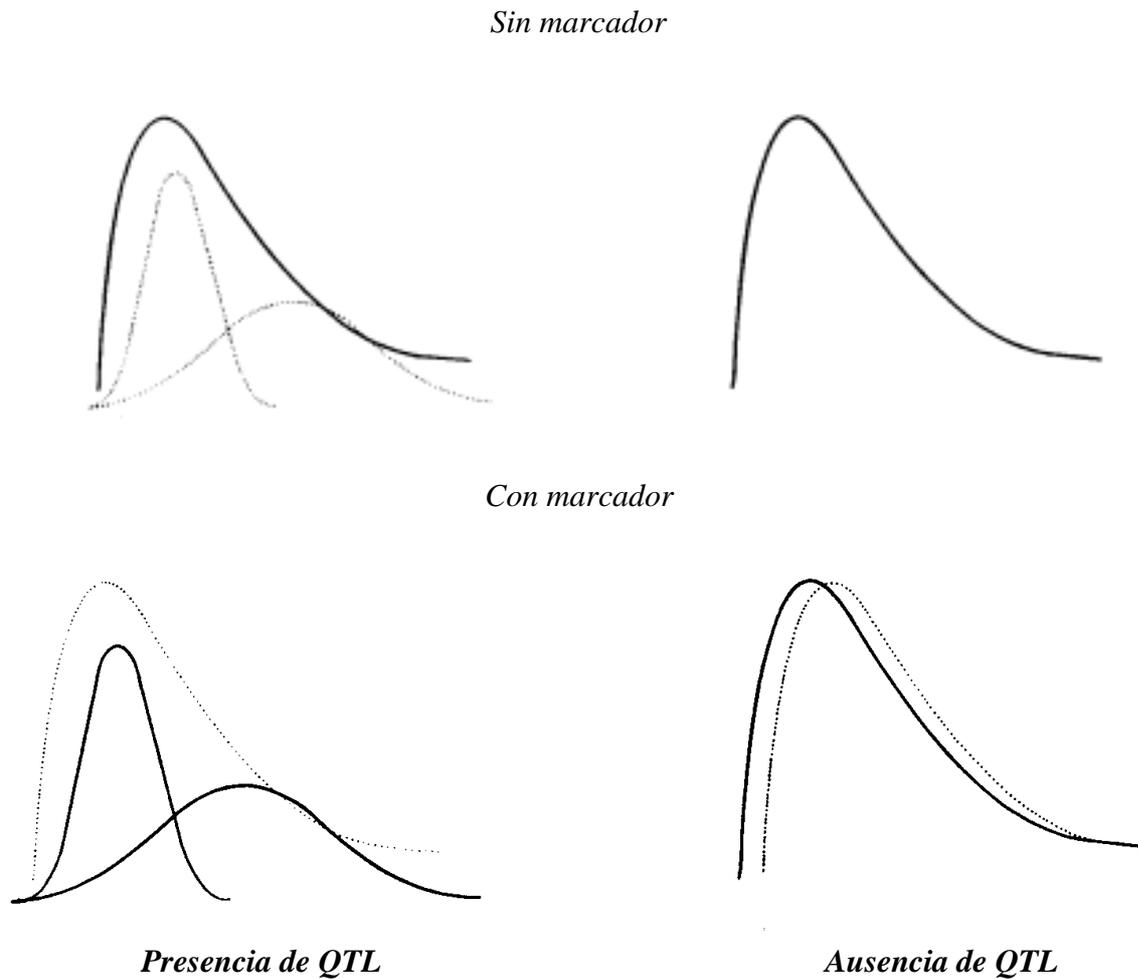
Consecuentemente, la utilización de marcadores en la detección de QTLs presenta una serie de ventajas (ELSEN, 1993, 1994):

~ mayor robustez estadística, como consecuencia del mejor discernimiento entre el efecto del QTL y cualquier otro efecto ajeno al mismo.

~ mayor potencia estadística, es decir, menor probabilidad de aceptar la no existencia del QTL cuando éste se encuentra, efectivamente, segregando.

~ posibilidad de analizar caracteres de herencia oligogénica.

Figura 1. Aportaciones de los marcadores a la detección de QTLs (Tomado de ELSEN, 1994)



2.1 . UTILIZACIÓN DE MARCADORES INDIVIDUALES

Los primeros estudios encaminados a la detección de QTLs se basaban en la búsqueda de un efecto cuantitativo asociado, cada vez, a un único marcador (SAX, 1923; SOLLER *et al.*, 1976).

En general, este tipo de análisis presenta una serie de limitaciones:

~ la magnitud del efecto fenotípico del QTL es sistemáticamente subestimada, por efecto de la recombinación entre el marcador y el QTL.

~ la localización del QTL no se resuelve con precisión, debido a la dificultad que supone diferenciar un efecto fenotípico pequeño de una distancia grande entre el marcador y el QTL.

~ el número de individuos necesario para la detección de un QTL, utilizando un único marcador, es considerablemente elevado.

2. 2. UTILIZACIÓN DE MARCADORES LIGADOS

La posibilidad de detectar un QTL mediante marcadores situados en el mismo grupo de ligamiento, ya fue sugerida por THODAY (1961). LANDER y BOTSTEIN (1989) desarrollaron el procedimiento conocido como “análisis por intervalos” (*interval mapping*), basado en la información contenida en los mapas genéticos y en la aplicación de métodos estadísticos de máxima verosimilitud. HALEY y KNOTT (1992) modificaron el método con objeto de aplicar análisis estadísticos de regresión. Esta metodología resuelve los inconvenientes que presenta la utilización de marcadores individuales:

~ la probabilidad de detectar estadísticamente un QTL es más elevada, debido a que el análisis limita el número de falsos positivos que aparecerían por efecto de la recombinación.

~ por la misma razón, la estimación del efecto fenotípico del QTL, así como su localización dentro de la región cromosómica flanqueada por los marcadores, es más precisa.

~ el tamaño de muestra requerido para obtener una potencia estadística determinada es menor que para el caso de un único marcador.

3. TIPOS DE MARCADORES

Las propiedades de los marcadores genéticos ideales se resumen en los siguientes puntos: neutralidad fenotípica, polimorfismo elevado, abundancia, herencia mendeliana codominante, distribución uniforme por todo el genoma y detección sencilla. Aunque en la actualidad se emplean marcadores que reúnen, en general, estas características, su disponibilidad es relativamente reciente.

3. 1. MARCADORES MORFOLÓGICOS

Durante décadas, los únicos marcadores disponibles fueron los genes responsables de cambios morfológicos discretos y fenotípicamente visibles. En algunas especies, como *Drosophila*, la existencia de líneas poseedoras de mutaciones de este tipo hizo posible la detección de segmentos cromosómicos con influencia en la expresión de diferentes caracteres cuantitativos.

No obstante, el empleo de estos marcadores no siempre resultaba posible. Las mutaciones que se conocían, además de ser escasas para la mayoría de los organismos, raramente presentaban variación alélica en las poblaciones. Por lo general, se trataba de mutaciones recesivas, lo que dificultaba la identificación del genotipo en los individuos heterocigóticos. A menudo estaban sujetas a relaciones de epistasia y pleiotropía. Otro problema frecuente era que el mutante mostrase algún tipo de efecto deletéreo sobre los individuos portadores, lo que originaba una alteración en la segregación alélica observada (TANKSLEY, 1993).

3. 2 POLIMORFISMOS BIOQUÍMICOS

El descubrimiento de que las formas alélicas de las proteínas podían ser diferenciadas mediante técnicas de electroforesis, supuso el comienzo de la era de los marcadores moleculares.

En comparación con las mutaciones morfológicas, los polimorfismos bioquímicos resultaban más ventajosos, debido a su relativa abundancia, su neutralidad fenotípica, su tipo de herencia (mendeliana codominante) y la práctica ausencia de relaciones de epistasia y pleiotropía. Sin embargo, el número de marcadores proteicos existentes seguía siendo insuficiente para cubrir todo el genoma. Además, el polimorfismo exhibido por la mayoría de estos marcadores se limitaba a tan solo dos o tres formas alélicas, lo que daba lugar a un elevado porcentaje de individuos no informativos en los estudios de segregación (TANKSLEY, 1993).

3. 3. POLIMORFISMOS A NIVEL DEL DNA

La identificación de los polimorfismos a nivel del DNA constituyó el avance más importante en materia de marcadores moleculares. Por otra parte, el descubrimiento de la “Reacción en Cadena de la Polimerasa” (PCR), permitió el desarrollo de nuevos procedimientos para detectar este tipo de variaciones. En general, los marcadores de DNA presentan las características de los marcadores ideales.

a. RFLP

Las endonucleasas de restricción, capaces de cortar el DNA a nivel de secuencias específicas, permiten diferenciar segmentos de diferente tamaño en el DNA de un individuo. La existencia de mutaciones puntuales en estas secuencias “diana”, da lugar a la aparición del “Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción” (RFLP). Tradicionalmente, la detección de los RFLPs se ha llevado a cabo por medio de la digestión del DNA genómico con un enzima determinado, seguida de la separación electroforética en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos, transferencia de los mismos a una membrana mediante la técnica de “Southern”, e hibridación de una sonda específica de la secuencia que se desea detectar.

La disponibilidad de técnicas de PCR ha dado lugar al procedimiento conocido como PCR-RFLP. El método consiste en aislar y amplificar mediante PCR el fragmento que contiene el lugar de restricción que se desea analizar, seguido de la digestión con la endonucleasa correspondiente.

b. SSCP

El fundamento de la identificación del “Polimorfismo de Conformación de Cadena Simple” (SSCP) es la observación de la movilidad electroforética de las cadenas sencillas de

un fragmento de DNA amplificado, desnaturalizado y migrado en un gel no desnaturalizante (ORITA et al., 1989). Cuando un individuo presenta en uno de sus cromosomas una mutación que afecta al fragmento, existirá una diferencia en la conformación de las cadenas que se manifestará por una variación en el patrón electroforético.

c. RAPD

Una variación de la técnica de PCR consiste en utilizar un solo cebador corto e inespecífico. La hibridación de este “primer” con secuencias homólogas del genoma, da lugar a la amplificación de una serie de fragmentos anónimos, que muestran herencia mendeliana, generalmente dominante y a veces codominante. De este modo, la hibridación o no hibridación del primer en una determinada región, detectará un polimorfismo que podrá ser identificado en virtud de la amplificación o no amplificación de un determinado fragmento. El polimorfismo así detectados se denomina “Polimorfismo de DNA de Amplificación Aleatoria” (RAPD), y se pone de manifiesto mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio (WILLIAMS et al., 1990).

d. Secuencias de DNA repetidas en tándem

El término DNA satélite tiene su origen en la observación, tras la centrifugación isopícnica del DNA en gradiente de cloruro de cesio, de ciertas bandas menores separadas de la banda principal. El análisis de estas bandas “satélite”, reveló una estructura en forma de repeticiones en tándem de una unidad, constituida por una secuencia nucleotídica de longitud determinada. Aunque más tarde se descubrieron estructuras similares no detectables mediante centrifugación (satélites crípticos), el término “satélite” se hizo extensivo para designar a toda secuencia que exhibiese este tipo de organización (SINGER y BERG, 1993).

Las secuencias con estructura de DNA satélite se clasifican, en función del tamaño de la unidad de repetición, en macrosatélites (o simplemente satélites), midisatélites, minisatélites y microsátélites. El interés de estas secuencias como marcadores se limita a los dos últimos tipos, que serán considerados a continuación.

d. 1. Minisatélites

Los minisatélites, también llamados “regiones hipervariables” y “repeticiones en tándem de número variable” (VNTR), presentan una unidad de repetición cuyo tamaño oscila entre 5 y 100 pares de bases. Su característica principal es el extremado polimorfismo que presentan, que se debe a su elevada tasa de mutación y que se manifiesta en la variación alélica del número de repeticiones en tándem.

Los minisatélites pueden localizarse en diferentes regiones cromosómicas, si bien su ubicación preferente se encuentra en las zonas subteloméricas (ROYLE et al., 1988). JEFFREYS

et al. (1985) identificaron el primer minisatélite en un intrón del gen de la mioglobina humana. Otros minisatélites destacables son los contenidos en el gen humano de la globina y en el gen de la proteína III del bacteriófago M13.

El procedimiento para detectar los minisatélites es muy similar al descrito para los RFLPs. En este caso, las secuencias que contienen minisatélites son utilizadas como sondas para producir “huellas genéticas de DNA” (DNA fingerprints).

d. 2. Microsatélites

En el caso de los microsatélites, el tamaño de la unidad iterativa de las repeticiones en tándem oscila entre 1 y 5 pares de bases. Al igual que los minisatélites, son secuencias de tipo VNTR, aunque éste término se reserva comúnmente para designar a los primeros, utilizándose para los microsatélites el de “repeticiones simples en tándem” (STR).

Los microsatélites son muy abundantes en los genomas eucarióticos, y se encuentran ampliamente distribuidos en los cromosomas. Tienen una localización específica donde, a modo de “isletas”, se hallan flanqueados por secuencias únicas. Se calcula que cada 10 kilobases de DNA existe un microsatélite (TAUTZ, 1989).

HAMADA et al. (1982) describen la secuencia $(TG)_n$ como la más frecuente, estimando en 5×10^4 el número de microsatélites de este tipo por genoma haploide. Esto equivaldría a una representación cada 50-100 kilobases (BECKMANN y WEBER, 1992). No obstante, ELLEGREN (1993) encuentra que la secuencia $(A)_n$ es la más abundante en la especie porcina. Otras repeticiones frecuentes son $(TC)_n$, $(CAC)_n$ y $(GATA)_n$, si bien parece probable que cualquier tipo de combinación corta de nucleótidos exista como microsatélite (TAUTZ y RENZ, 1984; VERGNAUD, 1989).

WEBER (1990) diferencia tres tipos de repeticiones en tándem, en función de la perfección de la secuencia repetida:

~ son *repeticiones perfectas* aquellas en las cuales la secuencia que se repite no sufre ninguna interrupción.

~ las *repeticiones imperfectas* presentan entre uno y tres nucleótidos interrumpiendo la secuencia en tándem, existiendo a ambos lados de la interrupción al menos tres repeticiones completas.

~ las *repeticiones compuestas* se definen como aquellas en las que una secuencia repetida en tándem se halla interrumpida por otra secuencia repetida, de unidad iterativa diferente. Las repeticiones compuestas se subdividen a su vez en perfectas e imperfectas, en función de la estructura de la secuencia repetida principal.

Como en el caso de los minisatélites, los microsatélites exhiben variaciones alélicas que se diferencian en el número de unidades de repetición en tándem. Estas formas alélicas se transmiten a la descendencia mediante un tipo de herencia mendeliana codominante (WEBER y MAY, 1989).

La detección de los microsatélites es relativamente sencilla mediante técnicas de PCR. Como se ha comentado, las secuencias flanqueantes son específicas del locus donde éste se encuentra ubicado. A partir de ellas, es posible elaborar los cebadores o “primers” que se necesitan para delimitar al microsatélite en la reacción de amplificación (WEBER y MAY, 1989). La identificación de los distintos alelos se realiza en virtud de las diferencias de tamaño del producto amplificado. Estas diferencias corresponden, en pares de bases, al incremento en el número de unidades de repetición que presentan unos alelos con respecto a otros.

Los microsatélites no aparecen muy conservados entre especies evolutivamente distantes, pero su grado de conservación entre especies próximas es considerablemente elevado (STALLINGS *et al.*, 1991). Este hecho ofrece la posibilidad de utilizar “primers” heterólogos para su amplificación en especies próximas (MOORE *et al.*, 1991). No obstante, en ocasiones, estas secuencias utilizadas como “primers” presentan variaciones entre especies, debido a fenómenos mutacionales. Como consecuencia, se originan fallos de amplificación que dan lugar a “alelos nulos o silentes” (CALLEN *et al.*, 1993; PEMBERTON *et al.*, 1995).

La formación de nuevos alelos se debe probablemente a la actuación de dos mecanismos que actúan de manera independiente: el apareamiento erróneo por deslizamiento o “slippage” durante la replicación del DNA y el sobrecruzamiento desigual durante la meiosis (LEVINSON y GUTMAN, 1987).

Las características de los microsatélites, que cumplen las propiedades de los marcadores genéticos ideales, hacen de ellos los marcadores de elección en los estudios de ligamiento genético y en la elaboración de mapas génicos. Otras aplicaciones incluirían la determinación de relaciones familiares y el establecimiento de distancias genéticas entre especies o razas.

DISEÑOS EXPERIMENTALES PARA LA DETECCIÓN DE QTLS

La mayoría de los estudios dirigidos a la detección de QTLs mediante la utilización de marcadores genéticos se han basado en la asunción de los siguientes principios (WELLER *et al.*, 1997):

1. Los caracteres cuantitativos se encuentran distribuidos normalmente.
2. Tanto los QTLs como los marcadores se transmiten de acuerdo con los principios de la herencia mendeliana.
3. Detección de un efecto significativo asociado al marcador debida a un único QTL.

4. No existen efectos pleiotrópicos de los marcadores sobre los caracteres cuantitativos.
5. Sólo dos alelos del QTL segregan en la población.
6. El QTL tiene únicamente un efecto aditivo sobre el carácter cuantitativo.
7. No existen interacciones entre los alelos del QTL (dominancia).
8. No existen interacciones entre el QTL y otros loci (epistasia).

Diversos estudios han analizado algunos de estos principios. La desviación de la normalidad puede estudiarse fácilmente, y corregirse mediante transformaciones algebraicas cuando es muy aparente (WELLER, 1987). El argumento para asumir la presencia de un único QTL ligado al marcador no tiene otra consistencia que la de suponer la baja probabilidad de que dos QTLs de efecto mayor se encuentren ligados (WELLER *et al.*, 1988). La suposición de que únicamente existen dos alelos del QTL en segregación, es adecuada para los modelos de cruzamiento entre líneas de elevada endogamia, pero puede ser problemática en otro tipo de diseños. Varios estudios han demostrado que el efecto del QTL puede afectar, no sólo a la media (efecto aditivo), sino también a la varianza del carácter (efecto multiplicativo) (EDWARDS *et al.*, 1987; WELLER *et al.*, 1988). En cuanto a las interacciones los alelos de un QTL entre sí y con otros loci, éstas han sido evidenciadas ampliamente en diferentes experimentos.

1. POBLACIONES EXPERIMENTALES

La detección de un QTL con la ayuda de un marcador depende de la existencia de un desequilibrio de ligamiento entre ambos loci. Este fenómeno genera efectos cuantitativos asociados al marcador, que se pueden evidenciar mediante la utilización de métodos estadísticos apropiados.

Los experimentos diseñados con este fin, basados en la detección de dicho desequilibrio de ligamiento, varían en función de la población de que se disponga y del carácter que se considere. Teniendo en cuenta estos factores, SOLLER (1991) diferencia cuatro situaciones posibles:

1.1. CRUZAMIENTOS ENTRE LÍNEAS ENDOGÁMICAS

Cuando se cruzan dos líneas endogámicas distintas, que poseen alelos fijados para los loci marcador y QTL, es posible detectar el efecto del locus cuantitativo asociado al marcador, mediante la comparación del valor del carácter cuantitativo en los descendientes de la F_2 o del retrocruzamiento, que hayan heredado uno u otro alelo del marcador.

Este tipo de diseño ha sido utilizado fundamentalmente para la detección de QTLs en genética vegetal, donde se dispone de numerosas líneas puras. En cuanto a su aplicación en genética animal, el modelo está limitado a ciertas especies, como el ratón, en las cuales es factible la producción de líneas de elevada endogamia. En lo que se refiere a las especies de interés productivo, únicamente se ha utilizado en aquellos casos en que el producto del cruzamiento es de interés comercial.

Ejemplos de la utilización del cruzamiento entre líneas endogámicas, los encontramos en los experimentos realizados por SAX (1923), EDWARDS *et al.* (1987) y WELLER *et al.* (1988).

1. 2. FAMILIAS INDIVIDUALES DE UNA POBLACIÓN

Para la mayoría de las especies domésticas no existen líneas endogámicas disponibles, y su producción orientada a la detección experimental de QTLs no es una alternativa económicamente viable. Consecuentemente, los análisis deben realizarse sobre las poblaciones ya existentes.

En general, en estas poblaciones tanto el QTL como el marcador se encuentran segregando. Si ambos loci están ligados, es posible detectar el desequilibrio de ligamiento mediante el análisis de familias individuales de la población. A este respecto, las estructuras familiares que pueden contemplarse son de dos tipos: familias de medio hermanos o familias de hermanos.

a. Familias de medio hermanos: el diseño padre

En ciertas especies de interés productivo, como es el caso de la bovina o la ovina, especialmente en aquellas poblaciones en las que se practica la inseminación artificial, es posible disponer de grandes familias integradas por un progenitor, y su descendencia de medio hermanos. El progenitor suele ser un semental con un elevado número de descendientes, hermanos únicamente por parte de padre. La utilización de esta estructura familiar da nombre al modelo de estudio conocido como “diseño padre”, “diseño de medio hermanos”, o “diseño hija” si la progenie del semental está constituida por hembras.

El “diseño padre” se basa en el análisis de la segregación de los alelos de un marcador, en la progenie de un semental heterocigótico para dicho locus. En función del alelo del marcador que hayan recibido del padre común, es posible establecer dos grupos de descendientes. Si el semental fuese además heterocigótico para un QTL que cosegrega con el marcador, es de esperar que entre los dos grupos de descendientes exista una diferencia en el valor del carácter cuantitativo, que puede ser detectada mediante la utilización de métodos estadísticos adecuados.

El diseño padre fue elaborado por NEIMANN-SÖRENSEN y ROBERTSON (1961), y aplicado en diversos experimentos de detección de QTLs implicados en caracteres de producción láctea en ganado bovino de leche (GELDERMANN et al., 1985; GONYON et al., 1987; HAENLEIN et al., 1987; ANDERSSON-EKLUND y RENDEL, 1993; BOVENHUIS y WELLER, 1994).

b. Familias de hermanos

HASEMAN y ELSTON (1972) describieron un modelo alternativo, teniendo en cuenta una estructura poblacional formada por múltiples familias, integradas por los dos progenitores y dos o más hijos comunes a ambos. En principio, el modelo fue ideado para su aplicación en la especie humana, pero podría utilizarse en especies polítopas (WELLER, 1996).

El diseño está basado en la proporción de alelos compartidos por los hermanos, o “alelos idénticos por descendencia” (ibid, identical by descent). Así, cuando existe un QTL ligado al marcador, la proporción de alelos ibd del marcador constituye una estimación de la proporción de alelos ibd del QTL. HASEMAN y ELSTON (1972) elaboraron un modelo estadístico de regresión para detectar la presencia del QTL, teniendo en cuenta la proporción de alelos ibd.

1. 3. CRUZAMIENTOS ENTRE POBLACIONES

Existen poblaciones que exhiben diferencias radicales en el valor cuantitativo de un determinado carácter. Es de esperar que en esas poblaciones las frecuencias alélicas para el QTL en cuestión sean muy diferentes y que estén próximas a la fijación. Por el contrario, para el marcador, tanto los alelos como sus frecuencias pueden ser muy similares. Ejemplos de esta situación incluirían los productos finales de un proceso de selección divergente, con fines experimentales o comerciales, así como aquellas poblaciones que muestran diferencias genéticas importantes, como consecuencia de su historia selectiva particular (por ejemplo, razas bovinas de aptitud cárnica frente a razas de aptitud láctea). En esta categoría también englobaríamos a ciertas razas autóctonas resistentes a enfermedades específicas, como la raza bovina africana tripanotolerante N'Dama.

El procedimiento consiste en cruzar individuos de ambas poblaciones originando una generación F_1 a partir de la cual se generará una F_2 (mediante inter o retrocruzamiento). El seguimiento de los alelos del marcador permitirá clasificar a estos descendientes en dos grupos, según hayan heredado el fragmento cromosómico correspondiente a la población que exhibe el valor “alto” o el “bajo” del carácter.

Este diseño está siendo utilizado en el programa europeo para la construcción del mapa de ligamiento porcino (PiGMaP), mediante el cruzamiento de razas chinas con razas europeas, que exhiben diferencias fenotípicas para numerosos caracteres (ARCHIBALD *et al.*, 1991).

1. 4. POBLACIONES CERRADAS

En una población cerrada, el desequilibrio de ligamiento entre un marcador y un QTL sólo puede generarse por deriva génica. El grado de desequilibrio esperado es una función del tamaño efectivo de la población (N_e) y de la frecuencia de recombinación (r). Para $r \leq 1/N_e$, el máximo grado se alcanza cuando el número de generaciones que transcurren, desde la última generación en equilibrio, se encuentra entre $N_e/2$ y N_e .

En diversas poblaciones animales, N_e es relativamente pequeño, debido a la intensa selección practicada en los machos. Muchas de estas poblaciones han sido mantenidas en pureza durante más de 25 generaciones, por lo que se podría esperar la existencia de un desequilibrio de ligamiento entre ambos loci para $r \leq 0,05$.

En principio, el efecto asociado al marcador podría ser detectado mediante el análisis de de la población en su totalidad, clasificando a los individuos en función del genotipo del marcador, y comparando los grupos establecidos mediante un análisis de varianza. En la práctica, las poblaciones de interés productivo suelen estar formadas por familias de medio hermanos, por lo que es recomendable que el análisis se efectúe subordinando los genotipos del marcador a los padres o incluso a los abuelos.

2. MODELOS EXPERIMENTALES

Son diversos los modelos experimentales desarrollados con el objetivo de detectar QTLs, con la ayuda de marcadores genéticos. Todos ellos parten de la misma hipótesis, que asume la presencia de un QTL, **A**, en desequilibrio de ligamiento con un marcador, **M**, siendo r la frecuencia de recombinación entre ambos loci.

A priori, se considera la existencia de sólo dos alelos en la población, tanto para el QTL (designados como **A**₁ y **A**₂), como para el marcador (designados como **M**₁ y **M**₂). Un individuo de genotipo **M**₁**A**₁/**M**₂**A**₂ transmitirá a la mitad de su progenie el alelo **M**₁ y a la otra mitad el alelo **M**₂. Con la excepción de los descendientes recombinantes, aquellos que hereden el alelo **M**₁ recibirán conjuntamente el alelo **A**₁, y los que hereden el alelo **M**₂ recibirán el alelo **A**₂.

El efecto fenotípico esperado para cada clase genotípica del QTL, **A**₁**A**₁, **A**₁**A**₂ y **A**₂**A**₂, será respectivamente a , d y $-a$. Se podrá deducir la presencia de un QTL en segregación, si existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias fenotípicas de los descendientes que hayan recibido alelos alternativos del marcador.

Los diferentes diseños propuestos, adaptados a la población experimental en estudio, difieren en el modo de conseguir progenitores heterocigóticos para el QTL y el marcador. En

general, podemos hablar de dos clases de diseños: los basados en técnicas de cruzamiento y los consistentes en análisis de familias individuales de la población.

2. 1. CRUZAMIENTOS ENTRE LÍNEAS ENDOGÁMICAS

El principio en el que se basa este diseño experimental, que fue propuesto por SOLLER *et al.* (1976), es el que se describe a continuación:

El cruzamiento de dos líneas parentales endogámicas (P_1 y P_2), homocigóticas tanto para el QTL (A) como para el marcador (M), origina una generación F_1 cuyos individuos son doblemente heterocigóticos para ambos loci. Cuando estos individuos se cruzan entre sí (diseño F_2), o se retrocruzan con los individuos homocigóticos de las dos líneas parentales (diseño retrocruzamiento), se obtendrán tres tipos de descendientes, clasificados en función de las tres posibles clases genotípicas del marcador (M_1M_1 , M_1M_2 y M_2M_2). La Tabla 1 muestra las probabilidades genotípicas del QTL, así como los valores fenotípicos esperados, en función de las clases genotípicas del marcador, para el caso de un diseño F_2 .

La clave para detectar la segregación del QTL es la comparación de la media del carácter cuantitativo, entre las distintas clases genotípicas del marcador. El test de significación puede ser sencillamente un análisis estadístico “t de Student” o ANOVA. La mayoría de los estudios se han basado en variaciones del modelo lineal siguiente:

$$Y_{ijk} = A_i + B_j + e_{ijk}$$

donde Y_{ijk} es el valor del carácter cuantitativo para el individuo k del bloque j y genotipo i ; A_i es el efecto del genotipo del marcador i ; B_j es el efecto del bloque j , representativo de los efectos ambientales, y e_{ijk} es el efecto residual individual.

Cuando el contraste entre dos clases genotípicas es significativamente diferente de 0, se acepta la hipótesis de la existencia de un QTL ligado al marcador. Las comparaciones de mayor interés son las siguientes:

M_1M_1 - M_1M_2 en el retrocruzamiento con la línea parental P_1 y en el diseño F_2

M_1M_2 - M_2M_2 en el retrocruzamiento con la línea parental P_2 y en el diseño F_2

M_1M_1 - M_2M_2 en el diseño F_2

Tomando como ejemplo este último contraste, encontramos que el efecto del QTL (δ), estimado como la diferencia entre clases homocigóticas es $2a(1-2r)$, simplificándose como $2a$ para $r = 0$ (ver Tabla 2).

SOLLER *et al.* (1976) estudiaron la potencia de su diseño, en términos de número de descendientes necesarios para detectar un QTL, que contribuyera a incrementar la varianza

aditiva en un 1%, con respecto a la varianza genotípica total en la F_2 (probabilidad de error de Tipo I, $\alpha = 0,05$; probabilidad de error de Tipo II, $\beta = 0,10$).

Para $r = 0$, la diferencia entre las dos clases homocigóticas en este locus, sería equivalente a $2a = 0,282\sigma$. La Tabla 2 muestra la estimación del número de descendientes, teniendo en cuenta distintas situaciones de dominancia a nivel del QTL. De este estudio se deduce que el diseño F_2 suele ser más recomendable que el diseño retrocruzamiento, puesto que requiere menor número de descendientes para una potencia estadística equivalente.

Las consecuencias del ligamiento incompleto sobre la potencia del experimento, pueden deducirse de la expresión que relaciona el número de descendientes (N) con el efecto que se desea detectar (δ), asumiendo que los valores fenotípicos están normalmente distribuidos:

$$N = 2 (z_{\alpha/2} + z_{\beta})^2 / (\delta / \sigma_w)^2$$

donde σ_w es la desviación típica entre clases genotípicas del marcador, y z el ordinal de la curva normal tipificada correspondiente a las proporciones $\alpha/2$ y β .

Para $r = 0$, el valor δ de los diferentes contrastes posibles es el que aparece en la Tabla 2. Para $r \neq 0$, todos los valores de la Tabla 2 deben multiplicarse por $(1-2r)$. Siendo N inversamente proporcional al cuadrado de $(1-2r)$, puede observarse que un pequeño aumento del valor de r , genera un gran incremento en el tamaño de muestra requerido para localizar un QTL, para una potencia dada. Un efecto análogo sucede cuando la fijación de los alelos del QTL no es completa (SOLLER *et al.*, 1976).

Tabla 1. Probabilidades y valores fenotípicos del carácter cuantitativo esperados en un diseño F_2 (Tomado de WELLER *et al.*, 1997)

Marcador		QTL		Carácter cuantitativo	
Genotipo	Probabilidad	Genotipo	Probabilidad	Valor medio	Valor esperado
M_1M_1	1/4	A_1A_1	$(1-r)^2$	a	$a(1-2r)+2dr(1-r)$
		A_1A_2	$2r(1-r)$	d	
		A_2A_2	r^2	-a	
M_1M_2	1/2	A_1A_1	$r(1-r)$	a	$d(1-2r+2r^2)$
		A_1A_2	$1-2r+2r^2$	d	
		A_2A_2	$r(1-r)$	-a	
M_2M_2	1/4	A_1A_1	r^2	a	$-a(1-2r)+2dr(1-r)$
		A_1A_2	$2r(1-r)$	d	
		A_2A_2	$(1-r)^2$	-a	

Tabla 2. Número de descendientes necesario para detectar un QTL de efecto $2a = 0,282$, para $r = 0$, en función del grado de dominancia (d) (Tomado de SOLLER *et al.*, 1976)

Cruzamiento	Contraste	δ	Número de descendientes		
			$d = -a$	$d = 0$	$d = a$
Retrocruzamiento P1	$M_1M_1-M_1M_2$	$a-d$	525	2100	∞
Retrocruzamiento P2	$M_1M_2-M_2M_2$	$a+d$	∞	2100	525
Retrocruzamiento combinado	$(M_1M_1-M_1M_2) + (M_1M_2-M_2M_2)$	$2a$	2100	2100	2100
F₂	$M_1M_1-M_2M_2$	$2a$	1050	1050	1050

2. 2. CRUZAMIENTOS ENTRE POBLACIONES

Este diseño, propuesto por BECKMANN y SOLLER (1988), constituye la aplicación del cruzamiento entre líneas endogámicas a poblaciones que difieren en un cierto carácter cuantitativo. En tales poblaciones, los alelos del QTL se encuentran próximos a la fijación, mientras que los correspondientes al locus marcador continúan segregando.

El procedimiento consiste en cruzar al azar individuos de dos poblaciones que exhiban respectivamente un valor “alto” y “bajo” para el carácter cuantitativo. De este modo se obtendrá una F_1 heterocigótica para el QTL. Los individuos de la F_1 serán asimismo cruzados al azar dando lugar a una F_2 . El seguimiento de la segregación de los alelos del marcador, desde la generación parental hasta la F_2 , permitirá diferenciar dos tipos de descendencia, según se espere que el fragmento cromosómico ligado al marcador proceda de la población de valor “alto” o “bajo” para el carácter cuantitativo. Entre ambos grupos de descendientes se comparará el valor medio estimado para el carácter cuantitativo, por ejemplo mediante un análisis estadístico “t de Student”. La apreciación de una diferencia estadísticamente significativa indicaría la existencia de ligamiento entre el QTL y el marcador.

BECKMANN y SOLLER (1988) encuentran que cuanto más próximos sean los valores de las frecuencias de los alelos del marcador en las dos poblaciones, mayor es el número de descendientes que requiere el análisis de ligamiento, en relación al precisado en un cruzamiento entre líneas endogámicas para una potencia estadística equivalente. Por ejemplo, para frecuencias alélicas iguales en la generación parental, en el caso de un marcador dialélico, el número de descendientes requerido sería cuatro veces superior.

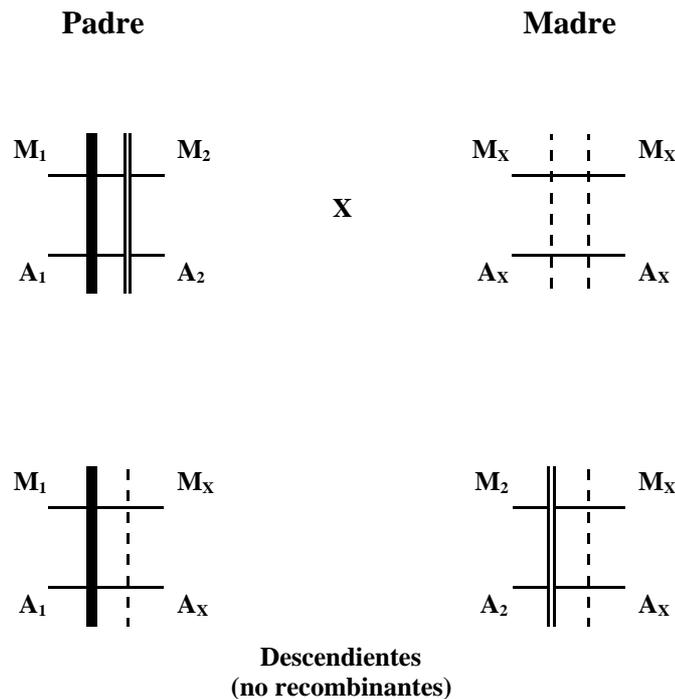
La potencia estadística del análisis se ve incrementada con el empleo de marcadores polialélicos. Es obvio que, cuando se dispone de sistemas de alelos múltiples, la posibilidad

de realizar el seguimiento de los alelos del marcador a través de dos generaciones es considerablemente superior. Así, cuando se utiliza un marcador que posee más de 10 alelos con frecuencias similares, la potencia del análisis se aproxima a la que se obtiene mediante el cruceamiento entre líneas endogámicas, para un número equivalente de descendientes en la F_2 .

2. 3. DISEÑO PADRE

Cuando se dispone de poblaciones en las cuales tanto el locus marcador como el QTL se encuentran segregando, el grado de desequilibrio de ligamiento que se puede generar mediante prácticas de cruzamiento es muy limitado. En estas situaciones, el modelo experimental más adecuado es el conocido como “diseño padre”, “diseño hija” o “diseño de medio hermanos”. Este modelo fue sugerido por NEIMANN-SÖRENSEN y ROBERTSON (1961) para su aplicación a la detección de QTLs en ganado bovino de leche. La Figura 2 representa esquemáticamente el fundamento de este diseño.

Figura 2. Diseño padre



El desarrollo experimental del diseño padre requiere identificar, de entre el conjunto de posibles progenitores de la población, aquellos que sean heterocigóticos tanto para el locus marcador como para el QTL. Teniendo en cuenta que inicialmente sólo es posible conocer el genotipo de los individuos a nivel del marcador, se debe partir de ascendientes heterocigóticos para dicho locus. De entre ellos, únicamente serán válidos, a efectos de la detección del ligamiento, aquellos individuos que sean, además, heterocigóticos para el QTL. Esto sólo podrá asumirse *a posteriori*, si entre los dos grupos de descendientes que hayan recibido uno u otro alelo del marcador existe una diferencia estadísticamente significativa para el valor del carácter.

ter cuantitativo. En la Tabla 3 aparecen las probabilidades genotípicas a nivel del QTL, y los valores fenotípicos del carácter cuantitativo, que se esperan en la progenie de un individuo heterocigótico, en función del alelo recibido para el locus marcador.

El contraste de interés, en el caso del “diseño padre”, es el de las clases alélicas de origen paterno (M_1 - M_2) que viene dado por la expresión $(1-2r) [a + d (q-p)]$. El factor $\alpha = [a + d (q-p)]$ define la fórmula general para el efecto de la sustitución de un alelo (FALCONER y MACKAY, 1996).

Para el caso de codominancia a nivel del QTL, el contraste se puede expresar como $a(1-2r)$. Como puede observarse, este valor es sólo la mitad del obtenido en la comparación análoga del diseño F_2 de un cruce entre líneas endogámicas. Consecuentemente, el número de descendientes que se necesitan para obtener una potencia estadística similar, es cuatro veces superior, sin olvidar que, en este caso, dicho número debe obtenerse de la descendencia de un único individuo. La utilización de marcadores polialélicos mejora considerablemente la situación, al permitir la detección de un número mucho más elevado de individuos informativos.

La potencia del análisis basado en un único progenitor es necesariamente baja por dos razones fundamentales. La primera se refiere a las limitaciones que existen en el número de descendientes por individuo, incluso cuando se practica la inseminación artificial. La segunda alude a la posibilidad de que el progenitor sea homocigótico para el QTL, lo que impediría detectar el efecto aunque éste se encuentre segregando en la población.

Así pues, es conveniente realizar el estudio simultáneamente en varias familias. Para ello, se debe tener en cuenta, que la fase en que se encuentren los alelos del marcador y del QTL puede ser diferente para cada una de ellas. El modelo lineal apropiado sería:

$$Y_{ijk} = S_i + M_{ij} + e_{ijk}$$

donde Y_{ijk} es el valor del carácter cuantitativo de la hija k del padre i , que recibió el alelo j ; S_i es el efecto del padre i ; M_{ij} es el efecto del alelo j , jerarquizado al padre i , y e_{ijk} es el efecto residual.

La potencia experimental del diseño fue calculada por SOLLER y GENIZI (1978), sobre la base de un análisis ANOVA. WELLER *et al.* (1990), abordaron la estimación de la misma partiendo del análisis χ^2 , que requiere un cálculo más sencillo. Los resultados que obtuvieron se muestran en la Tabla 4.

Como puede observarse, los QTLs de pequeño efecto ($a = 0,1\sigma$, donde a es la mitad de la diferencia entre homocigóticos para el QTL), serían muy difíciles de detectar, incluso analizando un número muy elevado de descendientes. Sin embargo, los QTLs de efecto superior ($a = 0,3\sigma$) podrían evidenciarse con un número de hijos relativamente bajo. En cualquier caso, para un número dado de descendientes, la potencia es superior cuando éstos están repartidos entre un menor número de padres, que si se da la situación opuesta (SOLLER, 1991).

Tabla 3. Probabilidades y valores fenotípicos del carácter cuantitativo esperados en un “diseño padre” (Tomado de WELLER *et al.*, 1997).

Alelo paterno			Alelo materno		Carácter cuantitativo	
Marcador	QTL	Probabilidad	QTL	Probabilidad	Valor medio	Valor esperado
M_1	A ₁	1-r	A ₁	p	a	$a(p-r) + d(1-r-p+2rp)$
			A ₂	1-p	d	
	A ₂	r	A ₁	p	d	
			A ₂	1-p	-a	
M_2	A ₂	1-r	A ₁	p	d	$a(r+p-1) + d(p+r-2rp)$
			A ₂	1-p	-a	
	A ₁	r	A ₁	p	a	
			A ₂	1-p	d	

Tabla 4. Potencia estadística del “diseño padre”, en función del número de padres, hijos por padre, efecto del QTL ($E = a/\sigma$) y probabilidad de error de Tipo I (α). (Tomado de WELLER *et al.*, 1990)

			Potencia estadística					
Padres	Número de Hijos por padre	Análisis	$\alpha = 0,05$			$\alpha = 0,01$		
			E = 0,1	E = 0,2	E = 0,3	E = 0,1	E = 0,2	E = 0,3
5	200	1000	0,11	0,37	0,68	0,03	0,18	0,50
	400	2000	0,19	0,64	0,89	0,07	0,44	0,80
10	200	2000	0,15	0,54	0,88	0,05	0,31	0,76
	400	4000	0,27	0,84	0,98	0,11	0,70	0,96
20	200	4000	0,20	0,76	0,99	0,07	0,56	0,95
	400	8000	0,41	0,97	0,99	0,20	0,93	0,99

3. MÉTODOS DE OPTIMIZACIÓN

El presupuesto de un experimento diseñado para la detección de QTLs depende de cuatro factores principales: la producción de individuos adecuados para llevar a cabo el análisis, la recogida de datos correspondientes al carácter cuantitativo, el análisis laboratorial de los marcadores y el procesado final de los datos. La obtención de la máxima potencia estadística por unidad de coste depende del control de cada uno de estos factores.

El análisis de los marcadores suele destacar como el factor económicamente más importante del experimento (BECKMANN y SOLLER, 1983). DARVASI y SOLLER (1994a) estimaron

que, para cualquier estudio inicial de detección de QTLs, la mayor eficiencia económica se obtiene cuando el espacio entre marcadores es de unos 50 centimorgans.

Con objeto de disminuir el presupuesto de los experimentos, han sido desarrolladas diversas técnicas que se caracterizan por una reducción en el número de genotipos que deben ser analizados para los marcadores, a expensas de un número más elevado de individuos evaluados para el carácter cuantitativo. A continuación se describen algunos de estos procedimientos.

3. 1. OBTENCIÓN DE RÉPLICAS DE LA PROGENIE

Una variación del diseño de cruzamiento entre líneas endogámicas, aplicable a especies vegetales en las que es posible practicar autofecundaciones, consiste en la producción de réplicas de la descendencia. Este sistema permite incrementar el número de individuos en los que se puede medir el carácter cuantitativo, mientras que sus genotipos para los marcadores pueden deducirse analizando, únicamente, a un individuo de cada línea (COWEN, 1988; SOLLER y BECKMANN, 1990).

La principal ventaja de este procedimiento es la reducción de la varianza residual, que se consigue al estimarse de un modo más preciso el valor medio del carácter cuantitativo de cada línea. No obstante, la eficiencia del método disminuye a medida que aumentan la heredabilidad del carácter o la frecuencia de recombinación entre el marcador y el QTL (SOLLER y BECKMANN, 1990).

3. 2. DISEÑO ABUELO

El “diseño abuelo” es un método alternativo al “diseño padre”, que permite reducir considerablemente el número de descendientes analizados para los marcadores.

Al igual que el “diseño padre”, el “diseño abuelo” se basa en el estudio de la segregación de los alelos de un marcador en la descendencia de un progenitor heterocigótico, seguido de la comparación del valor medio del carácter cuantitativo entre los dos grupos de descendientes que hereden alelos alternativos. La diferencia consiste en que, en el “diseño abuelo”, el valor del carácter cuantitativo de cada individuo se obtiene, a su vez, a partir de los datos de su progenie, mediante la aplicación de un “test de descendencia”. De este modo, se minimiza la varianza ambiental, lográndose estimar más precisamente el valor fenotípico de los individuos evaluados.

Este modelo fue propuesto inicialmente por WELLER *et al.* (1990), para su aplicación en vacuno de leche, con el nombre de “diseño nieta”. En este caso particular, se parte de un semental de élite, cuyos hijos son analizados para los marcadores y cuyas nietas son utilizadas para la valoración de sus padres respectivos.

El modelo lineal, propuesto por WELLER *et al.* (1990), es análogo al comentado para el “diseño hija”, y se basa en la ecuación siguiente:

$$Y_{ijkl} = G_i + M_{ij} + SO_{ijk} + e_{ijkl}$$

siendo Y_{ijkl} el valor cuantitativo de la nieta l, hija del padre k, hijo a su vez del abuelo i, y receptor del alelo j a nivel del marcador; G_i es el efecto del abuelo i; M_{ij} es el efecto del alelo j del abuelo i. SO_{ijk} es el efecto del hijo k (del abuelo i) que ha recibido el alelo j; por último, e_{ijkl} es el efecto residual asociado a cada observación. El análisis estadístico inmediato es un ANOVA de tres niveles, con los hijos subordinados a los alelos del marcador que, a su vez, están subordinados a los abuelos.

WELLER *et al.* (1990) calcularon la potencia estadística de su “diseño nieta”, observando que ésta se incrementaba en función de la magnitud del efecto del QTL, así como del número de abuelos, de hijos por abuelo y de nietas por hijo. Por el contrario, la potencia disminuía a medida que aumentaba la heredabilidad del carácter. Como es de esperar, para un mismo número de nietas, la potencia es mayor cuando éstas se encuentran distribuidas entre un menor número de hijos. Comparativamente, el “diseño nieta” es más potente que el “diseño hija” para un número equivalente de individuos analizados para el marcador. Sin embargo, esta ventaja se hace menos patente a medida que aumenta el efecto del QTL.

El “diseño nieta” ha sido empleado diversos experimentos, como los desarrollados por GEORGES *et al.* (1995), ASHWELL *et al.* (1997) o RON *et al.* (1998) dirigidos a la detección de QTLs en bovino de aptitud láctea. MOODY *et al.* (1996) analizaron la aplicación del modelo a razas de aptitud cárnica, concluyendo que el número de análisis genotípicos que se requerirían para lograr una potencia estadística razonable es muy elevado, y que sólo serían detectados QTLs de efecto moderado o alto.

3. 3. ANÁLISIS DE LOS EXTREMOS DE LA POBLACIÓN (*SELECTIVE GENOTYPING*)

El fundamento de este método es la modificación que experimentan las frecuencias alélicas de los marcadores durante el proceso de selección. Así, si entre los extremos de la curva de distribución fenotípica de un carácter se observan diferencias significativas en las frecuencias alélicas de un marcador, es de esperar que éste se encuentre ligado a un QTL con influencia sobre este carácter (STUBER *et al.*, 1980).

El análisis de los extremos de la población consiste en seleccionar, de entre la descendencia obtenida en un diseño F_2 o retrocruzamiento, a aquellos individuos que muestren un valor fenotípico “alto” o “bajo” para el carácter cuantitativo. El genotipo para el marcador se analizará únicamente en los individuos seleccionados, contrastándose el valor medio del ca-

rácter cuantitativo entre aquellos que hayan heredado alelos alternativos (LEBOWITZ *et al.*, 1987). El método puede ser aplicado igualmente a un “diseño padre”, eligiendo de entre la progenie de cada semental, los individuos que presenten producciones extremas (SOLLER, 1990).

Este procedimiento permite incrementar la potencia del experimento por individuo analizado para el marcador, a expensas de un aumento en el número de valoraciones fenotípicas (DARVASI y SOLLER, 1992a). Si además se combina con un “análisis por intervalos”, el número de individuos analizados para el marcador se ve reducido considerablemente, en relación a otros procedimientos de potencia estadística equivalente (hasta siete veces, según LANDER y BOTSTEIN, 1989).

No obstante, el método presenta ciertas desventajas: la primera consiste en que, cuando se trata de estudiar varios caracteres, es necesario analizar una muestra poblacional diferente para cada uno de ellos. La segunda se refiere a que las estimaciones del efecto del QTL por este procedimiento son sesgadas. Por último, cuando en la población existe una mezcla de genotipos a nivel del QTL, con medias iguales, pero diferentes varianzas, este efecto no podrá ser estimado seleccionando los individuos de los extremos de la población, debido a que uno de los genotipos será más frecuente cerca de la media (WELLER y WYLER, 1992).

3. 4. MEZCLA SELECTIVA DE DNA (*SELECTIVE DNA POOLING*)

Una variante del método anterior se basa en la preparación de dos mezclas de DNA, cada cual representa a los individuos pertenecientes a uno u otro extremo de la población (DARVASI y SOLLER, 1994b). De este modo, cada marcador podrá ser examinado mediante dos únicos análisis, uno por cada mezcla. Obviamente, los genotipos individuales para cada marcador no pueden ser determinados, pero sí las frecuencias alélicas relativas, que se estimarán mediante densitometría, en función de la intensidad de las bandas obtenidas en el análisis laboratorial (KHATIB *et al.*, 1994).

En comparación con el método anterior, la mezcla selectiva de DNA proporciona una potencia estadística inferior, debido al error técnico que se comete al estimar las frecuencias alélicas de los marcadores. Sin embargo, este procedimiento es más ventajoso para el estudio conjunto de diferentes caracteres, dada la facilidad que supone la preparación de mezclas de DNA adecuadas para cada uno de ellos.

3. 5. MUESTREO SECUENCIAL

El muestreo secuencial, sugerido por MOTRO y SOLLER (1993), consiste en analizar los marcadores en una muestra reducida de la población, comprobando si cada uno de ellos

muestra un efecto cuantitativo asociado muy evidente o, por el contrario, claramente nulo. Para aquellos marcadores que se encuentren en el límite de mostrar un efecto asociado significativo, se ampliará el análisis a otros individuos de la población, con el fin de confirmar la existencia de tal efecto.

El número de análisis genotípicos que requiere este procedimiento se reduce a la mitad, con respecto a los métodos convencionales, cuando se estudia un único carácter. Si por el contrario, el número de caracteres que se considera es alto, este método no es muy eficaz, dado que prácticamente todos los marcadores mostrarán una tendencia hacia la significación para alguno de los caracteres.

4. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

4.1. MÉTODOS QUE UTILIZAN UN MARCADOR CADA VEZ

Los primeros estudios orientados a la detección de QTLs se basaban en el empleo de un solo marcador cada vez, y en la aplicación de métodos estadísticos de comparación simple de medias, entre grupos de individuos convenientemente clasificados según el genotipo del marcador.

Los procedimientos usuales, tales como los análisis “t de Student” y ANOVA, han sido utilizados principalmente en los diseños basados en cruzamientos (WELLER *et al.*, 1987; EDWARDS *et al.*, 1987). Para su aplicación a otros modelos experimentales, como los diseños “padre” y “abuelo”, es necesario tener en cuenta que, dentro de cada familia particular, los alelos del marcador y del QTL pueden encontrarse en diferente fase de ligamiento, por lo que no es adecuado agrupar la información obtenida de diferentes familias en un análisis ANOVA de un nivel.

En el caso del “diseño padre”, una posibilidad consiste en introducir la interacción padre x marcador en un análisis ANOVA de dos niveles. Otra opción es la realización de un ANOVA jerárquico, en el cual los grupos de descendientes que reciben el mismo alelo están subordinados a los padres. También es posible utilizar los métodos χ^2 y “t de Student” en análisis familiares independientes. En relación al “diseño abuelo”, es posible efectuar un análisis ANOVA jerárquico de tres niveles, con los hijos subordinados a los alelos del marcador, que a su vez estarán subordinados a los padres (WELLER *et al.*, 1990).

Aunque estos procedimientos son capaces de detectar la existencia de un QTL ligado a un marcador, la información que aportan no permite diferenciar si se trata de un QTL de efecto pequeño estrechamente ligado, o de uno de efecto grande que se encuentre situado a mayor distancia del marcador. Por esta razón, su utilidad se limita a la exploración de la existencia de un QTL, previa a la realización de un análisis estadístico más adecuado. Otro incon-

veniente destacable de estos métodos es su ineficacia para detectar la presencia de alelos dominantes a nivel del QTL. Esta información no la pueden proporcionar las medias estimadas en las distintas clases genotípicas del marcador, pero sí sus varianzas, que serán desiguales en el caso de que existan alelos dominantes (ASÍNS y CARBONELL, 1988). Este hecho fue observado experimentalmente por EDWARDS *et al.* (1987), STUBER *et al.* (1987) y WELLER *et al.* (1988).

Una alternativa para estimar el efecto del QTL así como la fracción de recombinación entre éste y el marcador, es el empleo de métodos estadísticos de máxima verosimilitud. Aunque su aplicación requiere conocer el tipo de distribución del carácter, generalmente se asume que ésta es normal.

Una función de verosimilitud se construye a partir de dos tipos de datos: los observados y los calculados a partir de valores de prueba que maximicen la función (FALCONER y MACKAY, 1996). Tomando como base un cruzamiento entre líneas endogámicas, los parámetros de interés son la frecuencia de recombinación (r), las medias y las varianzas de las tres diferentes clases genotípicas del marcador. El test de significación es el logaritmo en base 10 de la relación L/L_0 (que se distribuye como una χ^2), donde L es la máxima verosimilitud observada y L_0 es la verosimilitud calculada para la hipótesis H_0 (ausencia de QTL en segregación).

WELLER (1986) utilizó el método de los momentos para estimar las medias y las varianzas de las dos clases homocigóticas, calculando la máxima verosimilitud del resto de los parámetros. Por su parte, LUO y KEARSEY (1989, 1991) establecieron una serie de ecuaciones que les permitieron calcular todas las medias y las varianzas, a partir del valor de r que maximizase la función de verosimilitud.

Los inconvenientes de los métodos de máxima verosimilitud, utilizando un marcador cada vez, se refieren a que las estimaciones de distancia y efecto utilizando un solo marcador generalmente son poco exactas. Además, la localización del QTL es relativa al marcador, es decir, puede estar a ambos lados del mismo.

Otra propuesta analítica, que permite localizar un QTL en un cromosoma y estimar su efecto, es el modelo de regresión simple elaborado por KEARSEY y HYNNE (1994). Según la expresión que relaciona la mitad de la diferencia de medias entre las clases homocigóticas del marcador i (δ_i) y la frecuencia de recombinación (r_i)

$$\delta_i = d(1 - 2r_i)$$

en la posición real del QTL debería existir una regresión lineal entre δ_i y $(1 - 2r_i)$, de pendiente d , que pase a través del origen de coordenadas. Realizando esta regresión a intervalos regulares, por ejemplo, cada 2 cM a lo largo del cromosoma, será posible identificar la

posición más probable del QTL, como aquella en la cual la suma de cuadrados residual de la regresión se minimiza (KEARSEY y POONI, 1996).

4. 2. MÉTODOS QUE UTILIZAN MARCADORES LIGADOS

Cuando se dispone de un mapa de ligamiento, es posible abordar la localización de los QTLs analizando los intervalos flanqueados por dos marcadores consecutivos. Este procedimiento se conoce como “análisis por intervalos” (*interval mapping*). En comparación con los métodos que emplean un marcador cada vez, el análisis por intervalos es más eficaz para separar el efecto de un QTL, requiere menos progenie para detectar un efecto dado y puede utilizarse para diferenciar QTLs ligados.

En sentido estricto, el análisis por intervalos es una extensión del modelo que utiliza un solo marcador cada vez. Así pues, las clases genotípicas del marcador se establecen de un modo similar, considerando en este caso la información aportada por cada pareja de marcadores ligados. El número de clases genotípicas se incrementa en relación al anterior. Por ejemplo, en un diseño retrocruzamiento se obtendrían cuatro clases genotípicas, y nueve en un diseño F_2 . Para cada clase genotípica se pueden estimar los valores medios de las desviaciones aditiva (a) y dominante (d).

La mayoría de las aplicaciones del análisis por intervalos se han llevado a cabo empleando métodos de máxima verosimilitud. Por extensión del término utilizado en genética humana, el logaritmo de la relación de verosimilitud (L/L_0), en el contexto del análisis por intervalos, se conoce con la denominación de “LOD score”. LANDER y BOTSTEIN (1989) propusieron este método para explorar la posible localización de un QTL a lo largo de un cromosoma, por ejemplo, a espacios de 1 cM. La posición más probable, dentro del intervalo delimitado por dos marcadores, vendrá dada por aquellos valores de frecuencia de recombinación y de efecto aditivo del QTL para los cuales el “LOD score” se maximice. Si se representa gráficamente el “LOD score” frente a la posición cromosómica en cM, el máximo de la curva, por encima del valor umbral establecido, indica la posición más probable del QTL.

Los métodos de máxima verosimilitud utilizando pares de marcadores han sido adaptados a los diseños de hermanos (KNOTT y HALEY, 1992) y de medio hermanos (WELLER, 1990).

El inconveniente principal de los métodos de máxima verosimilitud se encuentra en sus complicados requerimientos informáticos, que dificultan su aplicación a medida que los modelos se hacen más complejos (por ejemplo, cuando se desea asumir la presencia de más de un QTL).

HALEY y KNOTT (1992) demostraron que los métodos de regresión, siendo mucho más accesibles desde el punto de vista informático, alcanzan una potencia similar a la de los méto-

dos de máxima verosimilitud, por lo que resultan más recomendables. El modelo de intervalos que elaboraron estos autores, sobre la base de un cruzamiento entre líneas endogámicas, consiste en realizar una regresión de los valores fenotípicos de cada clase genotípica, sobre los coeficientes fenotípicos aditivo y dominante, calculados para una posición fija del QTL. El análisis de regresión se repite a intervalos de 1 cM a lo largo del cromosoma, siendo la localización más probable del QTL aquella en la que se maximice el ratio de la varianza de regresión.

MARTÍNEZ y CURNOW (1992) observaron que la presencia de un segundo QTL en las inmediaciones del intervalo flanqueado por un par de marcadores, podía afectar a la estimación del efecto y la posición del QTL situado dentro del intervalo. El análisis estadístico, revelaba la existencia de un “QTL fantasma” en un punto intermedio entre los dos QTLs reales. Para resolver el problema, estos autores propusieron el empleo de tres marcadores ligados delimitando dos segmentos, lo que supone una búsqueda sobre un espacio bidimensional.

Diversos autores recomiendan los métodos de regresión múltiple para la detección de varios QTLs con ayuda de múltiples marcadores.

El método sugerido por MORENO-GONZÁLEZ (1992), consiste en la aplicación de una “regresión paso a paso”, asumiendo múltiples intervalos consecutivos flanqueados por marcadores, y suponiendo la existencia de QTLs en cada intervalo.

HALEY *et al.* (1994) observaron que la aplicación del análisis “por intervalos” al cruzamiento entre poblaciones, presentaba el inconveniente de que no todos los marcadores resultaban completamente informativos. Como consecuencia, para cada cruzamiento realizado, los intervalos podían estar flanqueados por marcadores diferentes. Esto podía llevar a un sesgo en la localización de un QTL, en favor de un intervalo más informativo en lugar del correcto. Una situación similar se presentaba al aplicar el modelo a los diseños “padre” y “abuelo” (KNOTT *et al.*, 1996). En estos casos es improbable que todos los progenitores sean heterocigóticos para todos los marcadores incluidos en el estudio, lo que implica diferencias en la composición de los intervalos. Para solventar el problema en ambos diseños, estos autores adaptaron el análisis de regresión desarrollado por HALEY y KNOTT (1992), empleando todos los marcadores pertenecientes al grupo de ligamiento.

Con el fin de evitar que el efecto de un QTL presente en un intervalo se vea afectado por la influencia de otros QTLs ajenos al mismo, JANSEN (1993) y ZENG (1993) describieron procedimientos que utilizan los marcadores ajenos a cada intervalo como cofactores. Estos métodos, aplicables a cruzamientos entre líneas endogámicas, no son viables cuando se trata de poblaciones ganaderas, debido a la diferencia de información contenida en cada intervalo. La propuesta de MÄKI-TANILA *et al.* (1998) trata de resolver este inconveniente, sustituyendo el uso de los marcadores como cofactores, por el de los QTLs más probables presentes en el genoma.

SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES

Los procedimientos tradicionales de selección animal se han basado en el modelo genético aditivo, según el cual, el valor genotípico de un individuo es la suma de los efectos de los distintos loci individuales. Para la mayoría de los caracteres de interés económico, el valor genotípico no puede ser observado, razón por la cual la selección debe fundamentarse en datos fenotípicos. De manera ideal, el resultado óptimo se obtiene cuando un valor fenotípico alto se corresponde con un valor genotípico alto.

Es indudable que la identificación molecular de los loci de interés económico permitiría obtener un incremento en la respuesta a la selección, afectando tanto a la rapidez como a la precisión del proceso de mejora genética.

El objetivo primordial de la detección de los QTLs que afectan a la expresión de caracteres económicamente interesantes es, precisamente, su manipulación con fines selectivos, lo que ha dado lugar a la denominada Selección Asistida por Marcadores (MAS, *Marker Assisted Selection*).

1. VENTAJAS DE LA SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES

Aunque la mejora genética tradicional ha permitido obtener excelentes resultados para diversos caracteres, entre los que destaca la producción láctea, no ha sido capaz de dar respuesta a la problemática planteada en todos los casos. La utilidad de la información aportada por marcadores se pone de relieve precisamente en aquellos aspectos en los que los métodos convencionales no han demostrado ser eficaces.

1. 1. CARACTERES CON ALGUNAS PECULIARIDADES

La Selección Asistida por Marcadores puede complementar a la tradicional cuando se trata de mejorar caracteres que presentan alguna de las siguientes propiedades:

~ *Baja heredabilidad.* Los ejemplos típicos son los caracteres relacionados con la fertilidad y la resistencia a enfermedades. Clásicamente, cuando el carácter presenta una heredabilidad baja, la estimación del valor genotípico se realiza en base a datos individuales y familiares. En estos casos, la información aportada por un marcador, analizado tanto en el individuo como en sus familiares, incrementa sustancialmente la eficiencia de la selección. De acuerdo con LANDE y THOMPSON (1990), dicha eficiencia se multiplica por dos cuando los datos empleados en la estimación proceden de una familia de medio hermanos.

~ *Distribución fenotípica no normal.* Este apartado incluiría ciertos caracteres categóricos, como los dos ejemplos citados en el párrafo anterior, y también aquellos caracteres continuos cuya distribución es asimétrica, como el recuento de células somáticas de la leche.

~ *Expresión en un sólo sexo*. En el caso de caracteres como la producción de leche o el tamaño de la camada, el empleo de marcadores facilita la selección en el sexo que no manifiesta el carácter. La situación más extrema se ejemplifica en los caracteres relacionados con la producción láctea. Mientras que los machos tienen una fertilidad casi ilimitada, pero no expresan el carácter, la fertilidad de las hembras y sus posibilidades de selección son muy reducidas. LANDE y THOMPSON (1990) encuentran que la utilización de marcadores incrementa la eficiencia selectiva de este tipo de caracteres, incluso si presentan una heredabilidad alta.

~ *Expresión tardía o estimación post-sacrificio*. Aquí incluiríamos caracteres como la tasa de supervivencia y la composición corporal. La utilización de marcadores en estados juveniles, o incluso embrionarios, ofrece la posibilidad de realizar una estimación del carácter antes de que se exprese (SMITH y SIMPSON, 1986; LANDE y THOMPSON, 1990).

1. 2. DOMINANCIA Y EPISTASIA

La selección tradicional utiliza únicamente la variación genética aditiva, sin tener en cuenta la producida como consecuencia de las relaciones de dominancia y epistasia. La existencia de tales interacciones ha sido puesta de manifiesto en diferentes ocasiones (por ejemplo, EDWARDS *et al.*, 1987; WELLER *et al.*, 1988). El empleo de marcadores permitiría la utilización de estas fuentes de variación genética (LANDE y THOMPSON, 1990).

1. 3. CARACTERES CORRELACIONADOS NEGATIVAMENTE

Los procedimientos clásicos tampoco han dado respuesta a la selección de caracteres correlacionados negativamente. El ejemplo más típico de correlación negativa se da entre la cantidad de leche producida y el porcentaje de grasa. Mientras que la producción láctea, como objetivo principal de selección, ha experimentado un gran progreso, el porcentaje de grasa ha sufrido, incluso, un retroceso, a pesar de ser un carácter de alta heredabilidad y distribución cuasinormal. La utilización de marcadores, en este tipo de casos, podría llevar a la detección de QTLs de efecto positivo para ambos caracteres.

1. 4. CRUZAMIENTOS CON FINES DE MEJORA GENÉTICA

Los métodos tradicionales de mejora genética tampoco han resultado plenamente eficaces en relación a los cruzamientos. Los principales objetivos del cruzamiento son la heterosis, el incremento de la variación genética y la introgresión.

Heterosis

La obtención de los cruzamientos óptimos ha sido frecuentemente una cuestión de ensayo y error entre las distintas combinaciones posibles. Una vez obtenidos dichos cruzamien-

tos, los métodos tradicionales no presentan alternativas para lograr una mejora posterior. En relación con la heterosis, las ventajas fundamentales que se derivan del empleo de marcadores son las que se citan a continuación (SOLLER y BECKMAN, 1983):

~ Para el caso de cruzamientos conocidos, la identificación de los loci implicados permitiría comprender las causas del vigor híbrido, en términos de número de QTLs implicados, tipo de efecto genético (sobredominancia o epistasia) y magnitud del efecto de cada QTL.

~ Por otra parte, el análisis de nuevas líneas haría posible la detección de QTLs con efectos heteróticos que, introducidos en las líneas clásicas mediante prácticas de introgresión, podrían derivar en la construcción de cruzamientos específicos con un grado máximo de vigor híbrido.

Incremento de la variabilidad genética

Cuando se cruzan dos razas con objeto de obtener una población de mayor varianza genética para el carácter de interés, es posible utilizar los métodos tradicionales para incrementar el valor de dicho carácter en la dirección adecuada. Sin embargo, dado que este proceso se basa únicamente en el valor fenotípico, durante el mismo pueden perderse otros loci de efecto deseable.

Generalmente, sólo las mejores estirpes son utilizadas como líneas parentales. Otras, aparentemente inferiores, pueden poseer alelos relevantes de efecto menos evidente, constituyendo una fuente de variación genética “críptica”. El conocimiento previo de estos QTLs podría dar lugar a estrategias para la recuperación de dichos alelos.

Introgresión

La introgresión es el proceso por el cual un alelo es transferido desde una estirpe a otra. Clásicamente, se lleva a cabo mediante retrocruzamientos sucesivos con la estirpe receptora, reteniéndose en cada generación únicamente a los animales portadores del alelo de interés. La progenie de las últimas generaciones es cruzada entre sí para obtener individuos homocigóticos para el alelo en cuestión (SOLLER y PLOTKIN-HAZAN, 1977). La introgresión es menos común en las especies animales que en las vegetales. No obstante, existen dos ejemplos notables de su práctica en especies domésticas: el gen Booroola ovino, y los genes responsables de la tripanotolerancia de la raza bovina N'Dama.

Es obvio que sin ayuda de marcadores genéticos la introgresión sólo se puede llevar a cabo cuando los alelos son fácilmente identificables en los descendientes. La utilización de marcadores ofrece la posibilidad de realizar el proceso para loci cuyo efecto no es evidente, especialmente si el QTL se encuentra acotado entre dos marcadores adyacentes. Cabe añadir que el empleo de marcadores incrementaría la eficiencia de la introgresión, incluso en el caso

de loci de efecto mayor, al permitir la identificación temprana de los alelos de interés (WELLER y FERNANDO, 1991).

2. APLICACIONES DE LA SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES

La tasa de mejora genética equivale a la suma de la ganancia genética por generación a través de las cuatro vías de herencia posibles (padre-hijo, padre-hija, madre-hijo, madre-hija), dividido por la suma de los intervalos generacionales. Este parámetro depende de la intensidad de la selección y de la precisión en las valoraciones de los sementales candidatos.

La selección asistida por marcadores puede contribuir a la mejora genética de una raza de tres formas distintas:

~ *Incrementando la exactitud de las valoraciones genéticas.* La información aportada por los marcadores, en combinación con la obtenida a partir de datos fenotípicos añade precisión a las evaluaciones genéticas de los animales.

~ *Incrementando la intensidad de selección.* El empleo de marcadores permite efectuar la selección precoz de los individuos sobre la base de una información molecular real, lo que revierte en un incremento de la intensidad de selección.

~ *Disminuyendo el intervalo generacional.* La utilización de marcadores para la evaluación genética de los animales a edades tempranas tiene como consecuencia la reducción del intervalo generacional.

A continuación se destacan algunas de las propuestas de aplicación de la selección asistida por marcadores.

Incorporación del “valor molecular” a los índices de selección

Este modelo fue sugerido por LANDE y THOMPSON (1990) y se basa en la estimación del valor mejorante asociado a cada uno de los marcadores que se encuentran ligados a un QTL, mediante un cálculo de regresión múltiple. Es de esperar que, utilizando un número adecuado de marcadores y una muestra poblacional lo suficientemente amplia, la varianza aditiva del carácter asociada a los marcadores se aproxime bastante a la explicada por el QTL en cuestión. El valor asignado a aquellos marcadores de efecto más aparente constituye lo que los autores denominan el “valor molecular” (*molecular score*). Dicho valor puede ser combinado con el valor fenotípico del individuo mediante su incorporación a los índices de selección.

Información molecular aplicada al método BLUP

FERNANDO y GROSSMAN (1989) elaboraron un modelo mixto que incluye el efecto del QTL asociado al marcador y la varianza aditiva no ligada al mismo. No obstante, para que este método sea práctico es necesario que el QTL esté acotado entre dos marcadores. En un

futuro, la disponibilidad de mapas de ligamiento saturados permitirá, localizar los QTLs en fragmentos de tamaño mínimo.

Cada QTL y sus marcadores flanqueantes podrá entonces ser considerado como un haplotipo de fácil seguimiento en la descendencia. Así, el efecto asociado al haplotipo podrá ser incorporado al modelo animal para efectuar la valoración de los individuos de la población.

Selección de sementales

En los programas de selección para producción láctea aplicados en la actualidad, la precisión en la valoración de los sementales es muy elevada, teniendo en cuenta que se realiza a partir de un número considerable de hijas.

El método propuesto por KASHI et al. (1990) pretende mantener la precisión de dichas valoraciones al tiempo que incrementa la intensidad de la selección.

Se asume que los QTLs que afectan a la producción láctea son conocidos, y que cabe realizar el seguimiento de los alelos favorables mediante la utilización de marcadores genéticos. De este modo, es posible seleccionar de entre la descendencia de un semental de élite, a los jóvenes sementales que hayan heredado de su ascendiente un número aceptable de alelos relevantes para los QTLs de interés.

Como consecuencia, se produce el incremento de la intensidad de la selección. Los individuos seleccionados serán posteriormente valorados a partir de su descendencia, de acuerdo con los métodos tradicionales.

Los autores estiman que el aumento en la mejora genética anual proporcionado por este método puede oscilar entre un 15 y un 30%. WELLER y FERNANDO (1991) y WELLER (1996) señalan, a propósito de este método, la opción de prescindir de la evaluación de los sementales en función de la progenie, lo que revertiría en un acortamiento de los intervalos generacionales.

Velogenética

GEORGES y MASSEY (1991) apuestan por un nuevo concepto que denominan Ingeniería Asistida por Marcadores o “Velogenética”, y que se fundamenta en el uso sinérgico de la Selección Asistida por Marcadores y la manipulación de las células germinales. La aplicación de este tipo de tecnología abre nuevas expectativas para la rápida introgresión de genes de interés, en virtud de la posibilidad de reducir de un modo extremo el intervalo generacional. Por otra parte, al contrario que la transgénesis, la “velogenética” respeta la organización de los genes, evitando las expresiones aberrantes.

MAPAS GENÉTICOS. EL CROMOSOMA 6 OVINO

Durante los últimos años, el desarrollo de diferentes técnicas de biología molecular, orientadas a la localización de segmentos cromosómicos en la especie humana, ha dado lugar a un importante avance en la elaboración de los mapas genéticos de las especies domésticas.

Este hecho se ha visto plasmado en la progresiva aparición y continua actualización de los mapas genéticos de las especies de mayor interés, entre las que destacan la bovina (FRIES *et al.*, 1989; BARENDSE *et al.*, 1994; BISHOP *et al.*, 1994; EGGEN y FRIES, 1995; MA *et al.*, 1996; KAPPES *et al.*, 1997), la ovina (CRAWFORD *et al.*, 1995; MADDOX *et al.*, 1996; BROAD *et al.*, 1997; DE GORTARI *et al.*, 1998), la caprina (VAIMAN *et al.*, 1996), la porcina (ELLEGREN *et al.*, 1994; ROHRER *et al.*, 1994; ARCHIBALD *et al.*, 1995; YERLE *et al.*, 1995; ROHRER *et al.*, 1996) y la aviar (BURT *et al.*, 1995).

El gran interés de la obtención de dichos mapas se fundamenta en la utilidad que representan para la consecución de los siguientes objetivos:

~ ubicación de los loci que afectan a caracteres productivos, resistencia o susceptibilidad a enfermedades y manipulación de los mismos mediante técnicas de selección asistida por marcadores.

~ clonación de los genes de interés sin el conocimiento previo del producto que codifican (clonación de posición *-positional cloning-*).

~ comprensión de la evolución de los genomas por medio del estudio comparado de los genes homólogos en diferentes especies.

La elaboración de los mapas genéticos se ha llevado a cabo por medio de diferentes técnicas, siendo el objetivo final la ubicación ordenada de los segmentos de DNA en los genomas. Los estudios de segregación, realizados en familias de referencia, permiten obtener mapas de ligamiento, que representan la distancia que separa los loci en términos de frecuencia de recombinación. La producción de paneles de células somáticas híbridas hace posible el establecimiento de grupos sinténicos de loci, que pueden ser asignados a cromosomas específicos mediante estudios del cariotipo de dichas células. La hibridación *in situ* permite localizar un segmento concreto de DNA en una región específica de un cromosoma. La electroforesis de campo pulsado (PFGE), se utiliza en la determinación de agrupaciones o “clusters” de genes.

Cada experimento de construcción de mapas tiene como resultado un mapa particular, con sus limitaciones y errores experimentales. El objetivo principal de la cartografía genética actual, es el establecimiento de un consenso entre la información aportada por los diferentes laboratorios dedicados a la elaboración de mapas, con el fin de integrar los mapas físicos y los mapas de ligamiento de las distintas especies, en mapas globales de alta resolución.

En un intento de establecer un lenguaje común para el desarrollo del mapa físico humano, OLSON *et al.* (1989) sugirieron el diseño de puntos únicos de referencia, a partir de segmentos de DNA conocidos. Dichos segmentos se denominaron STS (Sequence Tagged Sites), y se definieron como secuencias cortas, específicas de locus y fácilmente detectables mediante técnicas de PCR. Considerando que las características de los microsátélites son precisamente su detección inmediata mediante PCR, su especificidad, su distribución uniforme y, además, su polimorfismo, BECKMANN y SOLLER (1990) propusieron su utilización como STS, para la tipificación de los mapas físicos de todos los genomas eucarióticos, y su integración con los mapas de ligamiento.

El desarrollo del mapa genético de una especie determinada puede beneficiarse de la información aportada por los mapas de otras especies, en virtud de la conservación de diferentes secuencias de DNA, a través del proceso evolutivo. Teniendo en cuenta el empleo de dicha información, O' BRIEN *et al.* (1993) sugirieron que la construcción de mapas genéticos se realizase en base a dos tipos de marcadores que denominaron de Tipo I y de Tipo II.

Los marcadores de Tipo I son los genes. Por lo general, aparecen conservados entre especies, al igual que las relaciones de sintenia que mantienen con otros marcadores de Tipo I. No siempre son polimórficos, por lo que su localización suele realizarse por medio de métodos físicos. Las principales aplicaciones de los marcadores de Tipo I son la comparación de loci homólogos entre especies diferentes y la extensión de los mapas de especies en proceso incipiente de estudio, a partir de mapas ampliamente desarrollados, como el humano o el del ratón.

Los marcadores de Tipo II son segmentos anónimos y altamente polimórficos, como los minisátélites, los microsátélites, y los "Polimorfismos de Conformación de Cadena Simple" (SSCP). No muestran un elevado grado de conservación, sino en especies evolutivamente muy relacionadas. Son localizados preferentemente en mapas de ligamiento en virtud del polimorfismo que presentan. Su función es esencial como marcadores en el clonaje de posición de loci adyacentes.

La integración de los mapas físicos y de ligamiento consiste fundamentalmente en la ubicación de loci comunes a ambos, que suelen designarse como loci "ancla".

Cuando los marcadores de Tipo I presentan un cierto grado de polimorfismo, o lo que es lo mismo, muestran segregación alélica, pueden ser incorporados a los mapas de ligamiento. O' BRIEN *et al.* (1993) proponen una lista de marcadores de Tipo I adecuados como loci "ancla" de referencia en diferentes especies de mamíferos.

Del mismo modo, los marcadores de Tipo II, previamente ubicados en mapas de ligamiento, pueden ser utilizados como "ancla" mediante su incorporación a los mapas físicos. En

este sentido, se han desarrollado diferentes estrategias, algunas de las cuales se citan a continuación:

~ El procedimiento conocido como DISC-PCR (Direct *In situ* Single Copy-PCR) permite situar una secuencia microsatélite en una región cromosómica, mediante su amplificación directa por PCR sobre una preparación de cromosomas en metafase. Esta técnica es muy útil en la especie porcina, en virtud de la relativa facilidad con que se diferencian sus cromosomas. No obstante, es aplicable a otras especies que no presenten la misma ventaja, si se combina con algún método de identificación cromosómica como la hibridación de células somáticas o el “pintado” de cromosomas (TROYER *et al.*, 1994).

~ El sondeo iterativo de genotecas, ya sean de cósmidos, fago lambda, bacterianas (BAC) o de levaduras (YAC), se basa en detectar, por medio de técnicas de PCR, aquellos clones que contengan un microsatélite determinado, que haya sido previamente localizado en un mapa de ligamiento.

El fragmento de DNA que contiene al microsatélite podrá ser utilizado posteriormente como sonda para hibridación *in situ*, lo que permitirá identificar su posición cromosómica (THIEVEN *et al.*, 1997). Esta estrategia está siendo muy utilizada en el establecimiento de secuencias contiguas (“contigs”).

~ Los métodos de microdissección física de cromosomas en metafase, practicados con ayuda de agujas de vidrio ultrafinas y micromanipuladores, permiten generar genotecas específicas de una región cromosómica determinada. A partir de estas genotecas, es posible identificar la posición de cualquier marcador con un alto grado de resolución (HOZIER y DAVIS, 1992).

1. EL MAPA GENÉTICO OVINO

El cariotipo de la especie ovina está constituido por 54 cromosomas, de los cuales un par son cromosomas sexuales y 26 pares son autosomas. La mayoría de ellos son acrocéntricos o telocéntricos, con la excepción de los pares autosómicos 1, 2 y 3, que son metacéntricos al igual que el pequeño cromosoma Y. Se ha estimado el tamaño mínimo del genoma ovino en 2770 centiMorgans (CHAPMAN y BRUÈRE, 1977).

El número de loci situados físicamente en el genoma ovino es actualmente de 201 (BROAD *et al.*, 1997). De ellos, 126 han sido localizados mediante un panel de células somáticas híbridas y 89 mediante hibridación *in situ* (la diferencia entre el número total y la suma de los loci ubicados por cada técnica se debe a que algunos de ellos han sido localizados por medio de ambas).

La posición cromosómica de algunos loci ha resultado problemática, debido a la dificultad que ha existido tradicionalmente para diferenciar algunos cromosomas:

~ las caseínas α_2 (*CSN1S2*) y $-\beta$ (*CSN2*) han sido localizadas en los cromosomas 4 y 6, debido a un desacuerdo en la nomenclatura de ambos cromosomas (ANSARI *et al.*, 1992; BROAD *et al.*, 1994b; HAYES *et al.*, 1993a,b). Actualmente se acepta que este cromosoma sea designado como cromosoma 6.

~ la esterasa D (*ESD*) ha sido asignada a los cromosomas 3 y 10, sin que hasta el momento se haya resuelto la ambigüedad.

~ la glutatión reductasa (*GSR*) ha sido ubicada en los cromosomas 24 y 26, aunque estudios recientes demuestran que su localización correcta está en el cromosoma 26 (BROAD *et al.*, 1997).

~ el factor- β 1 de crecimiento transformante (*TGFBI*) podría localizarse tanto en el cromosoma 8 como en el cromosoma 16 (WOODALL *et al.*, 1994).

En cuanto al mapa de ligamiento ovino, con anterioridad a 1994 era muy rudimentario, contando con tan sólo 17 marcadores, asignados a siete grupos de ligamiento (MONTGOMERY y CRAWFORD, 1997). La primera etapa de un proyecto destinado a la detección de marcadores para el locus responsable del fenotipo Booroola (*FecB*), llevó a la identificación de 19 grupos de ligamiento, con un total de 52 marcadores de tipo RFLP y microsatélite. De los 19 grupos de ligamiento, 13 pudieron ser asignados a cromosomas ovinos (CRAWFORD *et al.*, 1994).

Un año más tarde, se publicó el primer mapa de ligamiento autosómico ovino (CRAWFORD *et al.*, 1995). Su extensión era de 2070 cM, e incluía un total de 242 marcadores entre RFLPs (7), proteínas polimórficas (7) y microsatélites (228). De los microsatélites localizados, 19 mostraban asociación con genes conocidos, mientras que el resto eran secuencias anónimas ovinas (86), bovinas (126) y cervunas (1).

La primera actualización del mapa de ligamiento autosómico ovino, fue presentada por MADDOX *et al.* (1996). Este mapa se extiende 2661 cM, e incluye 146 marcadores de nueva incorporación, lo que suma un total de 388 marcadores. La mayoría de ellos son de tipo microsatélite y, de ellos, 21 se encuentran asociados a genes conocidos. El resto de los marcadores son de tipo RFLP (23), SSCP (7) y proteínas polimórficas (6). El número total de genes representados es de 57.

Recientemente ha sido publicado el denominado mapa genético ovino de segunda generación (DE GORTARI *et al.*, 1998), cuya longitud abarca 3063 cM, en los 26 grupos de ligamiento autosómicos, y 127 cM en el cromosoma X. Este mapa ha sido elaborado, fundamentalmente, con microsatélites de origen bovino, lo que resulta especialmente interesante, a

efectos de realizar estudios evolutivos, y de relacionar la información referente a la identificación de QTLs entre diferentes especies de bóvidos.

2. EL CROMOSOMA 6 OVINO

El cromosoma 6 ovino es de tipo telocéntrico y su longitud representa el 4,31% del genoma (MATEJKA y CRIBIU, 1987). Presenta homología con el cromosoma 6 bovino, el cromosoma 4 humano, los cromosomas murinos 3 y 5, y el cromosoma 8 porcino (LORD *et al.*, 1996). En él se sitúan loci de gran interés económico, como la mutación *FecB*, responsable del fenotipo Booroola, y los genes de las caseínas.

El mapa genético del cromosoma 6 ovino ha experimentado un importante desarrollo, debido precisamente a la localización en el mismo de la mutación *FecB*.

El fenotipo Booroola se manifiesta únicamente en las hembras adultas portadoras de la mutación, por un incremento en la tasa de ovulación y en el tamaño de la camada. El intento de localizar un marcador que permitiera un diagnóstico precoz de los animales portadores, llevó a MONTGOMERY *et al.* (1993) a estudiar la segregación de 145 marcadores de DNA, logrando evidenciar por primera vez el ligamiento entre algunos de estos marcadores y el locus *FecB*. Las secuencias más próximas resultaron ser dos microsátélites, OarAE101 y OarHH55. Aunque entonces se desconocía la ubicación cromosómica de dichos microsátélites, el análisis reveló que ambos se encontraban ligados a un RFLP para la fosfoproteína secretada 1 (*SPP1*), que había sido localizada en el cromosoma 4 humano.

Con el fin de ampliar el estudio a otros genes de dicha región cromosómica, los mismos autores desarrollaron diferentes RFLPs, comprobando el ligamiento de *FecB* al factor de crecimiento epidérmico (*EGF*) y al factor I del complemento (*IF*).

En un trabajo posterior, MONTGOMERY *et al.* (1994) asignaron la mutación *FecB* al cromosoma 6 ovino aplicando dos procedimientos distintos.

El primero de ellos consistió en extender el grupo de ligamiento que incluía la mutación *FecB*, mediante la incorporación de nuevos loci localizados en el cromosoma 4 humano. Entre estos loci se encontraba la caseína α s1 (*CSN1S1*). Se sabía que las caseínas se localizaban en el cromosoma 6 de la especie bovina (THREADGILL y WOMACK, 1990). También se sabía que los genes de las caseínas se encontraban estrechamente ligados, tanto en la especie bovina (FERRETI *et al.*, 1990; THREADGILL y WOMACK, 1990) como en la ovina (LEVÉZIEL *et al.*, 1991; LIEN *et al.*, 1993). Uno de estos genes, concretamente el de la caseína β ovina, había sido localizado en la región 6q23-q31 mediante hibridación *in situ* (ANSARI *et al.*, 1992). Dado que el locus *FecB* formaba parte del mismo grupo de ligamiento, su localización en el cromosoma 6 resultaba evidente.

El segundo procedimiento consistió en el empleo de un panel de células somáticas híbridas oveja x hamster (BURKIN *et al.*, 1993), mediante el cual lograron situar en el cromosoma 6 ovino algunos de los marcadores pertenecientes al grupo de ligamiento que incluía *FecB*.

Utilizando esta última técnica, BROAD *et al.* (1994b) ampliaron el estudio a otros loci, incluyendo las caseínas α S1 (*CSNIS1*), α S2 (*CSNIS2*) y β (*CSN2*). Los resultados de estos experimentos confirmaban la localización del locus *FecB* en el cromosoma 6 ovino, al tiempo que corroboraban la homología entre los cromosomas 6 ovino y bovino y el cromosoma 4 humano.

A partir de estos descubrimientos, la elaboración del mapa de ligamiento del cromosoma 6 fue objeto de especial atención, siendo patente la evolución experimentada por el mismo en los últimos años. CRAWFORD *et al.* (1995) presentaron un mapa que incluía 12 loci y se extendía 128 cM. LORD *et al.* (1996) incorporaron nuevos marcadores, desarrollando un mapa constituido por 35 loci distribuidos a lo largo de 154 cM. En el mapa autosómico actualizado por MADDOX *et al.* (1996), el cromosoma 6 incluye 42 loci y se extiende 158,2 cM (Figura 3).

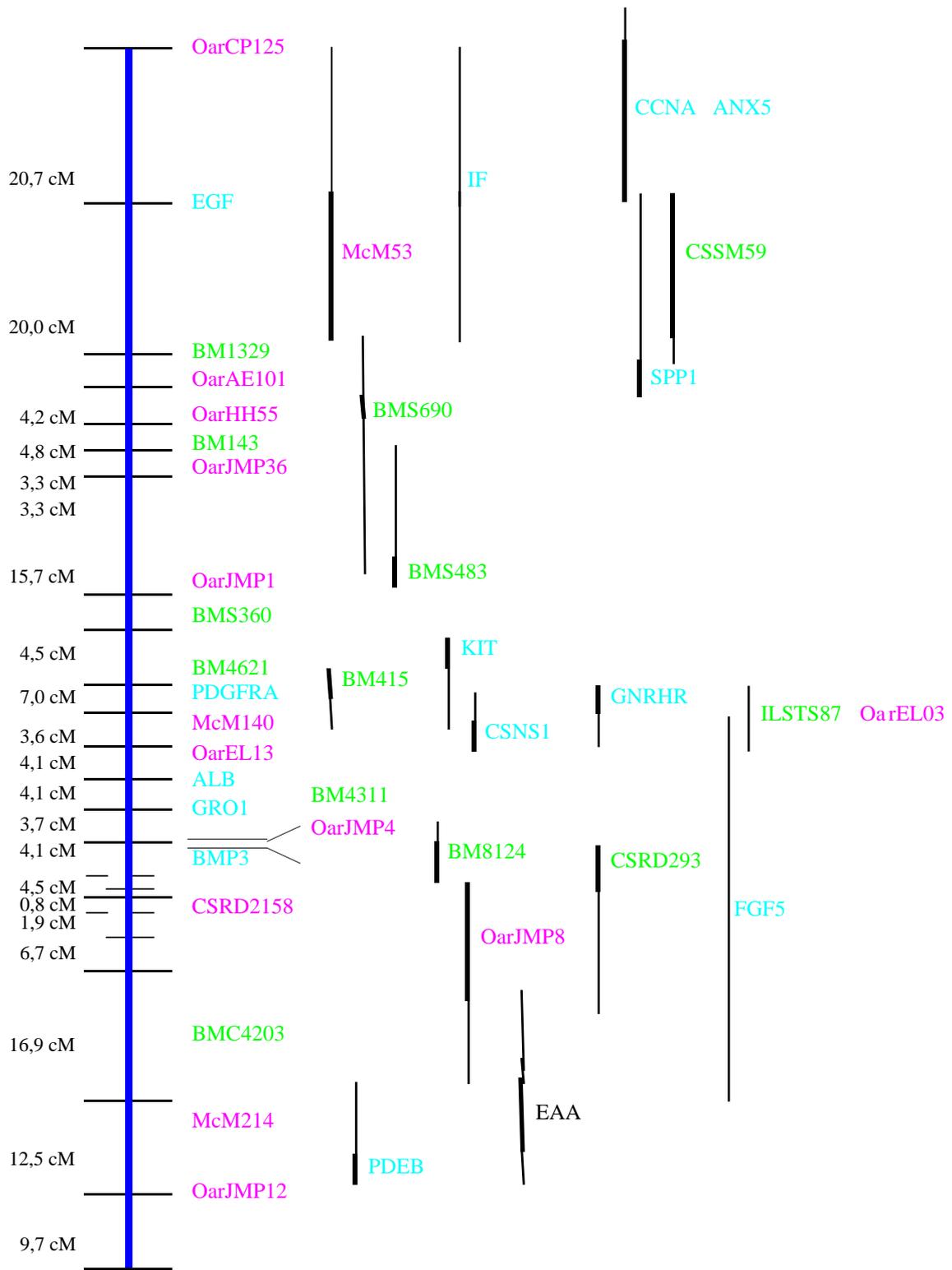
En la Tabla 5 se muestran los loci que han sido localizados por métodos físicos en el cromosoma 6 ovino. Por otra parte, en la Tabla 6 aparecen los marcadores de Tipo I situados en el mapa de ligamiento de este cromosoma.

LOCI QUE AFECTAN A CARACTERES PRODUCTIVOS

En su acepción más amplia, el término QTL (del inglés, Quantitative Trait Locus) hace referencia a cualquier región cromosómica implicada en la determinación de un carácter cuantitativo. No obstante, el concepto de QTL es arbitrario, y su significado ha sido objeto de diferentes interpretaciones.

Así, mientras que ciertos autores (como TANKSLEY, 1993), asocian a los QTLs directamente con los poligenes, otros (como MAYO y FRANKLIN, 1998) extienden el concepto a todas aquellas regiones cromosómicas, de función primaria desconocida, que afectan a los caracteres cuantitativos de interés, independientemente de que se trate de poligenes o de genes mayores.

En la actualidad se observa una tendencia a sustituir el término QTL por el de ETL (Economical Trait Locus), que designaría de un modo global a todas las regiones cromosómicas que afectan a caracteres de importancia económica. A continuación se describen algunos de estos loci.



158,2 cM

● Microsatélites ovinos ● Microsatélites bovinos ● RFLPs ● Polimorfismos proteicos

Las líneas verticales indican la localización estimada y el trazo grueso la más probable.

Tabla 5. Loci ubicados por métodos físicos en el cromosoma 6 ovino

Símbolo	Nombre	Ubicación	Técnica	Referencia
ADH2	Polipéptido β de alcohol deshidrogenasa 2 (clase 1)	6cen	P	Lumsden <i>et al.</i> (1995)
ALB	Albúmina	6q	CSR	Broad <i>et al.</i> (1994b)
CSN1S1	Caseína α S1	6	CSR	Broad <i>et al.</i> (1994b)
CSN1S2	Caseína α S2	4q32*	ISI	Hayes <i>et al.</i> (1993)
		6	CSR	Broad <i>et al.</i> (1994b)
CSN2	Caseína β	U18	CSR	Imam-Ghali <i>et al.</i> (1991)
		6q22-q31	ISI	Ansari <i>et al.</i> (1992)
		4q32*	ISI	Hayes <i>et al.</i> (1992)
		6	CSR	Broad <i>et al.</i> (1994b)
CSN3	Caseína κ	U18	CSR	Imam-Ghali <i>et al.</i> (1991)
		6	SIN	Broad <i>et al.</i> (1997)
D6S1	Microsatélite OarJMP8	6q34-q35	ISI	Pearce <i>et al.</i> (1994)
D6S2	Microsatélite BM1329	6cen	ISF	Lumsden <i>et al.</i> (1995)
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	6	CSR	Montgomery <i>et al.</i> (1994)
GRO1	Oncogén GRO1	6	CSR	Broad <i>et al.</i> (1994a)
IF	Factor I del complemento	6	CSR	Broad <i>et al.</i> (1994b)
KIT	Oncogén homólogo del sarcoma viral felino 4 de Hardy-Zuckerman (v-kit)	6	CSR	Broad <i>et al.</i> (1994b)
PDEB	Polipéptido β de la fosfodiesterasa de GMP cíclico (receptor de los bastones)	6	CSR	Broad <i>et al.</i> (1994b)
		6q33-qter	ISI	Lord <i>et al.</i> (1996)
PDGFRA	Polipéptido α del receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas	6	CSR	Montgomery <i>et al.</i> (1994)
PPAT	Fosforibosilfosfato amidotransferasa	6	CSC	Burkin <i>et al.</i> (1991, 1993)
SPP1	Fosfoproteína secretada 1	6	CSR	Montgomery <i>et al.</i> (1994)
TPI1L	Triosafosatoisomerasa 1 (similar)	6q	CSR	Broad <i>et al.</i> (1993)

CSC: hibridación de células somáticas, complementación (selección nutricional); **CSR:** hibridación de células somáticas, corte con enzimas de restricción y transferencia e hibridación de DNA (Southern); **ISI:** hibridación *in situ* isotópica; **ISF:** hibridación *in situ* por fluorescencia; **SIN:** sintenia con otros marcadores; **P:** PCR en clones previamente localizados. *Actualmente aceptada su designación como cromosoma 6.

Tabla 6. Marcadores de Tipo I localizados en el mapa de ligamiento del cromosoma 6 ovino

Símbolo	Nombre	Tipo	Referencia
ALB	Albúmina	RFLP	Montgomery <i>et al.</i> (1993)
ANX5	Anexina V	RFLP	Montgomery <i>et al.</i> (1995)
BMP3	Proteína 3 morfogénica ósea	RFLP	Montgomery <i>et al.</i> (1995)
CCNA	Ciclina A	RFLP	Lord <i>et al.</i> (1996)
CSN1S1	Caseína α S1	RFLP	Levéziel <i>et al.</i> (1991) Di Gregorio <i>et al.</i> (1991)
EAA	Antígeno A eritrocítico	Polimorfismo proteico	Nguyen y Bunch (1980)
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	RFLP	Montgomery <i>et al.</i> (1993)
GRO1	Oncogén GRO1	RFLP	Montgomery <i>et al.</i> (1995)
IF	Factor I del complemento	RFLP	Montgomery <i>et al.</i> (1993)
KIT	Oncogén homólogo del sarcoma viral felino 4 de Hardy-Zuckerman (v-kit)	RFLP	Montgomery <i>et al.</i> (1993)
PDEB	Polipéptido β de la fosfodiesterasa de GMP cíclico (receptor de los bastones)	RFLP	Montgomery <i>et al.</i> (1995)
PDGFRA	Polipéptido α del receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas	RFLP	Montgomery <i>et al.</i> (1993)
SPP1	Fosfoproteína secretada 1	RFLP	Montgomery <i>et al.</i> (1993)

1. ESPECIE OVINA

1. 1. LOCI IMPLICADOS EN CARACTERES CÁRNICOS

El ejemplo más conocido se refiere a la hipertrofia muscular ovina, más conocida como fenotipo “callipyge”. Éste se caracteriza por el incremento de la masa muscular, la reducción de la grasa intramuscular y la mejora del índice de conversión de los corderos. El locus autosómico responsable de este fenotipo ha sido ubicado en la región distal del cromosoma 18 (COCKETT *et al.*, 1994).

Recientemente se ha demostrado que la transmisión del carácter “callipyge” no sigue las reglas de la herencia mendeliana, sino que se trata de un fenómeno designado como “sobredominancia polar”. Los únicos individuos que expresan el carácter son los heterocigóticos que hayan recibido el alelo dominante de su padre (COCKETT *et al.*, 1996).

1. 2. LOCI IMPLICADOS EN CARACTERES REPRODUCTIVOS

Uno de los factores que influyen de manera más significativa en la productividad del ganado ovino es el número de corderos nacidos vivos. Aunque han sido identificados diversos loci que actúan sobre la prolificidad de la especie ovina, sin duda el más destacable es el locus *FecB*, responsable del fenotipo Booroola. Se trata de una mutación autosómica con un efecto aditivo sobre la tasa de ovulación y parcialmente dominante sobre el número de descendientes nacidos vivos. Los estudios realizados hasta el momento han llevado a la detección de marcadores ligados a *FecB*, así como a la ubicación del locus en el cromosoma 6 ovino (MONTGOMERY *et al.*, 1993, 1994). Las investigaciones actuales se dirigen a la detección de un marcador lo suficientemente próximo a *FecB* como para ser utilizado con fines económicos. Al mismo tiempo se pretende aislar el gen responsable y abordar el estudio de su expresión.

1. 3. LOCI IMPLICADOS EN CARACTERES DE PRODUCCIÓN DE LANA

Los estudios referentes a loci implicados en caracteres de producción de lana son escasos. Aunque se conocen algunos genes mayores, como el “gen N”, también denominado “gen Drysdale” (DRY, 1955) o el “gen Lustre” (BLAIR, 1990), la variación continua que muestran la mayor parte de estos caracteres hace esperar la influencia de loci de menor efecto.

Actualmente se está desarrollando en Nueva Zelanda un proyecto de detección de QTLs relacionados con diferentes parámetros de cantidad y calidad de la lana. El diseño experimental se basa en el cruzamiento Merino x Romney. Los resultados preliminares muestran la asociación entre un microsatélite y el diámetro de la fibra de lana (HENRY *et al.*, 1998).

2. ESPECIE BOVINA

2. 1. LOCI IMPLICADOS EN CARACTERES DE PRODUCCIÓN LÁCTEA

Por su importancia económica, cabe mencionar en primer lugar la mioencefalopatía degenerativa progresiva del ganado bovino, o síndrome de Weaver, que constituye otro ejemplo de asociación entre un defecto genético y un carácter cuantitativo, en este caso la producción láctea (HOESCHELE y MEINERT, 1990).

Se trata de un locus autosómico de herencia mendeliana recesiva. El síndrome se manifiesta en los individuos homocigóticos, entre los 6 y 8 meses de edad, y cursa con paresia muscular pélvica, ataxia y alteraciones propioceptivas, así como con atrofia gonadal. El examen histológico de la médula espinal muestra una degeneración Walleriana de la materia blanca con formación de esferoides. Los animales heterocigóticos no presentan signos de enfermedad, observándose, en el caso de las hembras, un importante incremento en la cantidad de leche y materia grasa producidas, con respecto a las hembras normales no portadoras.

Los fenómenos genéticos que asocian el síndrome de Weaver con la producción láctea se desconocen aún. En la actualidad, las investigaciones se centran en la detección de un posible QTL asociado al gen responsable del síndrome. Esta tarea ha sido iniciada con la identificación de un marcador estrechamente ligado al mencionado gen en el grupo sinténico U13 (GEORGES *et al.*, 1993), asignado posteriormente al cromosoma 4 bovino.

Es necesario resaltar que es precisamente en la especie bovina en la que se han centrado, hasta el momento, las investigaciones acerca de la identificación de QTLs con influencia sobre la producción láctea.

El experimento considerado pionero fue publicado en 1961 por NEIMANN-SÖRENSEN y ROBERTSON. Si bien este trabajo no obtuvo resultados relevantes, merece ser señalado como el primer intento de investigar la presencia de QTLs en una población ganadera y el primero en el que se propuso la aplicación del “diseño hija”. Otras innovaciones de este estudio fueron la utilización de los grupos sanguíneos como marcadores, y la introducción de los métodos estadísticos χ^2 y ANOVA.

Diversos estudios posteriores se han basado en la aplicación del “diseño hija” y en la utilización de sistemas de grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos como marcadores.

Destacan los trabajos realizados por GELDERMANN *et al.* (1985), GONYON *et al.* (1987) y HAENLEIN *et al.* (1987). En todos ellos se evidenciaron efectos sobre caracteres de producción láctea, asociados a marcadores proteicos, principalmente a proteínas lácteas. No obstante, estos estudios no tienen en cuenta la diferencia entre el efecto directo de los alelos de los marcadores y el efecto de posibles QTLs ligados a los mismos.

BOVENHUIS y WELLER (1994) lograron separar ambos efectos, mediante la introducción de métodos estadísticos de máxima verosimilitud. De este modo, demostraron la existencia de efectos directos de las caseínas α S1, β y κ y la lactoglobulina β , sobre caracteres de producción y composición de la leche, al tiempo que detectaron la presencia de un QTL ligado a las caseínas κ y β , con efectos significativos sobre la concentración de grasa en la leche.

La implicación de los alelos de las caseínas bovinas sobre la producción láctea ha sido considerada en diversos estudios que, sin embargo, ofrecen resultados poco consistentes entre sí. Algunos autores como VELMALA *et al.* (1995) y LIEN *et al.* (1995) creen que estas aparentes discrepancias se deben a que dichos estudios han asumido la existencia de un efecto directo del polimorfismo de las caseínas sobre los caracteres, consistiendo los experimentos en análisis poblacionales con individuos no emparentados.

VELMALA *et al.* (1995) consideraron la posibilidad de que el verdadero efecto se debiera a un QTL ligado a las caseínas. Por ello, la manera de abordar el estudio fue utilizando como marcadores los haplotipos (en lugar de los alelos) de las mismas, aplicando en este caso

un “diseño nieta” a una población bovina de raza Ayrshire. Ninguno de los haplotipos detectados mostró un efecto directo sobre los caracteres analizados. Sin embargo, en el análisis familiar pudieron observarse diferencias significativas para la cantidad de leche y el porcentaje de grasa.

El experimento llevado a cabo por LIEN *et al.* (1995) en el ganado bovino noruego es de características similares. En este caso, los autores se basaron en la hipótesis de que las mutaciones asociadas a un incremento productivo se encontrarían en las secuencias reguladoras. Esto explicaría las diferencias observadas entre experimentos, dado que la fase en que se hallasen estas mutaciones, en relación a los alelos analizados, sería diferente entre individuos. De entre los haplotipos identificados, uno mostró una asociación con las cantidades de leche y proteína producidas, para todas las familias en que éste estaba presente, y que se caracterizaban por un poseer antepasado común. Estos resultados fueron interpretados como un indicio de la presencia de, al menos un QTL, en la región donde se ubican los genes de las caseínas.

Otro de los marcadores proteicos de interés en producción láctea es el locus amilasa-1 (*AMY1*). Los estudios llevados a cabo por GELDERMANN *et al.* (1985), y por ANDERSSON-EKLUND y RENDEL (1993) parecen indicar que este locus se encuentra ligado a un QTL con un efecto considerable sobre la cantidad de grasa de la leche.

La mayoría de los experimentos realizados en años recientes, se han basado en la aplicación del “diseño nieta” (WELLER *et al.*, 1990) y en el empleo de marcadores a nivel del DNA, en especial las secuencias de tipo microsatélite.

RON *et al.* (1994) desarrollaron el primer experimento de detección de QTLs de interés en producción láctea, utilizando microsatélites como marcadores. En su estudio, analizaron 10 microsatélites de diferente localización cromosómica. Sólo uno de ellos, situado en el cromosoma 21, mostró un efecto asociado a las cantidades de leche y proteína producidas.

GEORGES *et al.* (1995) abordaron la primera búsqueda global de QTLs en el genoma bovino. Para ello analizaron 159 microsatélites distribuidos uniformemente en los autosomas. El estudio llevó a la detección de cinco QTLs, ubicados respectivamente en los cromosomas 1, 6, 9, 10 y 20 (este último ha sido confirmado por ARRANZ *et al.*, 1998). Cada uno de ellos produce un efecto particular sobre los caracteres estudiados, tal y como se describe a continuación:

Los QTLs identificados en los cromosomas 1 y 10 afectan tanto a la producción de leche, como a la producción de grasa y proteína. Sin embargo, mientras que el QTL ubicado en el cromosoma 1 interviene en mayor medida sobre la cantidad de proteína, el situado en el cromosoma 10 actúa preferentemente sobre la cantidad de grasa. Aunque es difícil conocer los

mecanismos que llevan a estos efectos, podrían estar relacionados con interacciones aún desconocidas entre la composición de grasa y proteína.

Los QTLs detectados en los cromosomas 6 y 20 parecen actuar de un modo similar, influyendo en la producción de leche, sin afectar aparentemente al contenido en proteína y grasa. Así, cuando el efecto se traduce en un incremento de la cantidad de leche, los porcentajes de proteína y grasa disminuyen. Este fenómeno podría explicarse por un incremento en la presión osmótica de la leche, probablemente debido a un aumento de la secreción de lactosa, lo que originaría un flujo de agua en la glándula mamaria, destinado a restaurar la isosmolaridad.

El QTL identificado en el cromosoma 9 origina una variación en la producción de leche, que afecta de forma paralela a las cantidades de grasa y proteína. Aparentemente, este QTL no afecta de modo significativo a las concentraciones de grasa y proteína. Estos efectos podrían deberse a una modificación, bien en el número de células secretoras de la glándula mamaria, bien en la producción media de cada una de estas células.

La importancia del cromosoma 6 bovino, como candidato para el asentamiento de QTLs con influencia sobre la producción láctea ha sido considerada en varios experimentos.

KÜHN *et al.* (1996) emplearon técnicas de microdissección física para aislar determinados fragmentos del cromosoma 6, e identificar en los mismos marcadores de tipo microsatélite. Mediante la aplicación de un “diseño nieta”, encontraron dos efectos distintos en la misma región cromosómica. Así, en concordancia con los resultados obtenidos por GEORGES *et al.* (1995), para una de las familias analizadas, un marcador mostró asociación con la cantidad de leche producida, sin que los porcentajes de grasa y proteína sufrieran ninguna modificación aparente. En el caso de otra familia, y para un marcador ligado al anterior, el efecto fue observado tanto para la cantidad de leche, como para las cantidades de grasa y proteína.

Con objeto de demostrar la aplicación del método estadístico de regresión múltiple propuesto por KNOTT *et al.* (1994), en combinación con el cálculo de los valores críticos sugerido por CHURCHILL y DOERGE (1994), SPELMAN *et al.* (1996) investigaron la presencia de QTLs en el cromosoma 6, analizando nueve microsatélites localizados a lo largo del mismo. El resultado fue la detección de un QTL con influencia sobre el porcentaje de proteína aunque, dada su ubicación cromosómica, podría tratarse del mismo QTL identificado por GEORGES *et al.* (1995).

Por otra parte, la aplicación del procedimiento estadístico desarrollado por MÄKI-TANILA *et al.* (1998), basado en la utilización de los posibles QTLs presentes en el genoma como cofactores, llevó a diferenciar dos QTLs distintos con influencia sobre el porcentaje de proteína en el cromosoma 6. Mientras que parece obvio que uno de ellos es el mismo que detectaron GEORGES *et al.* (1995), el otro se localizaría en las proximidades del locus donde se ubican las caseínas.

VILKKI *et al.* (1997) centraron sus estudios en el cromosoma 9, empleando para este análisis seis microsatélites distribuidos uniformemente. Los resultados que obtuvieron no resultaron estadísticamente significativos, posiblemente debido al pequeño tamaño de la población disponible. No obstante, sus observaciones sugieren la presencia de un QTL con efecto sobre las cantidades de leche y proteína, en la misma región del cromosoma 9 indicada por GEORGES *et al.* (1995).

En la actualidad, existen distintos proyectos orientados a la búsqueda global de QTLs en el genoma bovino, algunos de los cuales han rendido sus primeros resultados.

En un estudio preliminar realizado mediante un “diseño nieta”, ASHWELL *et al.* (1997) encontraron efectos asociados a 13 microsatélites de los 16 que analizaron, en relación a caracteres de cantidad y composición de la leche, recuento de células somáticas y vida productiva del animal. Estos resultados son parte de una fase de exploración del genoma y la mayoría de ellos requieren un estudio más exhaustivo. No obstante, una de las asociaciones obtenidas parece corroborar la existencia de un QTL en el cromosoma 21, con influencia sobre las cantidades de leche, grasa y proteína producidas, tal y como había sido observado previamente por RON *et al.* (1994).

Otros resultados recientes son los presentados por MOSIG *et al.* (1998). Mediante la aplicación de un “diseño hija” y de técnicas de “mezcla selectiva de DNA”, estos autores detectaron la posible presencia de nueve QTLs, con influencia sobre el porcentaje de proteína, tres de ellos en el cromosoma 6 y el resto en los cromosomas 3, 4, 7, 9, 10 y 13, respectivamente. Algunos de estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores, en concreto los detectados en los cromosomas 3 (RON *et al.*, 1996), 4 (GEORGES *et al.*, 1993), y uno de los evidenciados en el cromosoma 6, asociado al locus *CSN3* ó caseína κ (VELMALA *et al.*, 1995).

Los resultados iniciales de un experimento que se está llevando a cabo en el ganado bovino noruego, señalan la posible presencia de un QTL en el cromosoma 6, que afectaría a la cantidad de leche, sin mostrar una influencia aparente sobre el porcentaje de proteína (GÓMEZ-RAYA *et al.*, 1998). La región cromosómica donde se asentaría este QTL coincide con la referida por GEORGES *et al.* (1995), KÜHN *et al.* (1996) y SPELMAN *et al.* (1996). Los autores sugieren que el efecto detectado podría deberse a interacciones epistáticas entre los alelos del QTL y los alelos de otros loci.

2. 2. LOCI IMPLICADOS EN CARACTERES CÁRNICOS

Uno de los caracteres de mayor interés es la hipertrofia muscular bovina, o carácter “culón” que, a diferencia de lo que sucede en la especie ovina, se manifiesta al nacimiento, incluso en el útero, causando una elevada incidencia de partos distócicos. El fenotipo “culón”

es debido a una mutación autosómica recesiva, localizada en la región centromérica del cromosoma 2 (CHARLIER *et al.*, 1995). GROBET *et al.* (1997) han confirmado recientemente la naturaleza de esta mutación. Se trata de una delección de 11 pares de bases en la región codificadora del gen de la miostatina (*MSTN*), que provoca la formación temprana de un codón de terminación.

Pocos datos se conocen acerca de otros loci relacionados con caracteres cárnicos en esta especie. BEEVER *et al.* (1990) realizaron un estudio en una única familia, mediante la aplicación de un “diseño padre”, empleando como marcadores sistemas de grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos. Los resultados obtenidos sugieren la presencia de un QTL ligado al sistema sanguíneo RBC-B, que afecta al crecimiento pre-destete y al contenido en grasa de la canal. Otro posible QTL, implicado en el contenido muscular, estaría ligado al sistema BoLA.

2. 3. LOCI IMPLICADOS EN CARACTERES REPRODUCTIVOS

En relación a este tipo de caracteres en la especie bovina, los únicos resultados que recoge la bibliografía consultada corresponden a un estudio que parece evidenciar la existencia de un QTL en el cromosoma 7 y tal vez dos QTLs en el cromosoma 23, todos ellos implicados en la tasa de ovulación (BLATTMANN *et al.*, 1996).

3. ESPECIE PORCINA

3. 1. LOCI IMPLICADOS EN CARACTERES CÁRNICOS

En el cerdo han sido identificados dos loci de efecto mayor con influencia sobre la producción y las características de la carne: la mutación *HAL* y la mutación *RN*.

La mutación *HAL*, en heterocigosis, produce efectos beneficiosos sobre las características de la canal, tales como mayor peso y menor contenido en grasa. En homocigosis, es responsable de la enfermedad conocida como hipertermia maligna o síndrome de estrés porcino. Las consecuencias de esta enfermedad son la muerte súbita del animal debida al estrés, y la producción de carne pálida blanda y exudativa (PSE, del inglés Pale, Soft, Exudative). Una manifestación característica de los individuos homocigóticos es su sensibilidad a la anestesia con halotano, método que ha sido utilizado tradicionalmente para su diagnóstico.

En la actualidad, se sabe que la mutación *HAL* es debida a una sustitución nucleotídica en uno de los genes implicados en el canal de liberación del calcio. Se trata del gen del receptor de la rianodina (*RYR1*), que ha sido localizado en el cromosoma 6 porcino. Este conocimiento ha permitido el desarrollo de un sistema de diagnóstico precoz de los animales sensibles, basado en un procedimiento PCR-RFLP (FUJII *et al.*, 1991).

La mutación dominante *RN*, descrita en la raza Hampshire, da lugar a un bajo pH de la carne y, consecuentemente, a un bajo rendimiento en la producción de jamón cocido de los animales portadores. Según demostraron ESTRADÉ *et al.* (1993a, b), este efecto es debido a un incremento de hasta un 70% en la cantidad de glucógeno que se acumula en el músculo.

El locus *RN* ha sido ubicado en el cromosoma 15 (MARIANI *et al.*, 1996; MILAN *et al.*, 1995). Las investigaciones actuales se dirigen a la clonación y caracterización del gen responsable, así como al desarrollo de un sistema de diagnóstico (ANDERSSON, 1995).

Por lo que se refiere a detección de QTLs, el trabajo realizado por CLAMP *et al.* (1992) constituye un ejemplo de aplicación del “diseño padre” en la especie porcina. El análisis de la descendencia de un macho heterocigótico para varios marcadores proteicos mostró la asociación de los loci *GPI* (glucosa fosfato isomerasa), *HP* (haptoglobina) y *PGD* (fosfogluconato deshidrogenasa) con parámetros relacionados con el crecimiento y la cantidad de masa muscular.

No obstante, la mayoría de los experimentos de detección de QTLs en esta especie se ha llevado a cabo a partir de cruzamientos entre variedades genéticamente diferentes.

ANDERSSON *et al.* (1994) realizaron un estudio basado en el cruzamiento entre el cerdo doméstico y el jabalí, mediante el cual localizaron, en el cromosoma 4 porcino, un QTL con influencia sobre el crecimiento, la cantidad de grasa abdominal y dorsal y la longitud del intestino delgado, carácter este último estrechamente correlacionado con el crecimiento. El mismo experimento puso de manifiesto la presencia de un QTL, con influencia sobre el peso al nacimiento y la ganancia diaria de peso, en el cromosoma 13.

La extensión de este mismo estudio a generaciones posteriores (MARKLUND *et al.*, 1996) y el desarrollo de otros proyectos de análisis genómico en el cerdo (MILAN *et al.*, 1998) parecen corroborar la existencia del QTL ubicado en el cromosoma 4.

Mediante el cruzamiento entre razas europeas de carne y razas prolíficas chinas, YU *et al.* (1995) demostraron la implicación de un factor activador de la hormona del crecimiento, el locus *PITI*, sobre diversos caracteres relacionados con la producción cárnica. Este locus ha sido ubicado en el cromosoma 13, por lo que parece probable que se trate del mismo QTL detectado por ANDERSSON *et al.* (1994).

Diversos estudios han evidenciado la existencia de QTLs con influencia sobre caracteres cárnica en el cromosoma 7 porcino. Dado que en la región centromérica de este cromosoma se encuentra el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), asociado tradicionalmente a este tipo de caracteres, no se descarta la posible implicación de este locus en los resultados obtenidos (ROTHSCHILD, 1998).

De igual modo, en el cromosoma 6 ha sido detectado un posible QTL con efecto sobre caracteres de crecimiento, pero parece estar relacionado con el locus *RYRI*, responsable de la hipertermia maligna (GELDERMANN *et al.*, 1996).

3. 2. LOCI IMPLICADOS EN CARACTERES REPRODUCTIVOS

Aunque los estudios dirigidos a la detección de QTLs con influencia sobre caracteres reproductivos en la especie porcina son escasos, podemos hacer referencia a algunos de los resultados obtenidos hasta el momento.

Varios experimentos han evidenciado la posible presencia de QTLs relacionados con la tasa de ovulación en el cromosoma 8. Son especialmente interesantes los resultados obtenidos por RATHJE *et al.* (1997) y MILAN *et al.* (1998), puesto que localizan el efecto en la región homóloga del cromosoma 6 ovino donde se ubica el locus *FecB* (gen *Booroola*).

Otras regiones asociadas a parámetros reproductivos se encontrarían en el cromosoma 1 (PASZEK *et al.*, 1998), en el cromosoma 4 (WILKIE *et al.*, 1996; RATHJE *et al.*, 1997; PASZEK *et al.*, 1998), en el cromosoma 6 (WILKIE *et al.*, 1996), en el cromosoma 7 (WILKIE *et al.*, 1996; MILAN *et al.*, 1998) y en los cromosomas 13 y 15 (RATHJE *et al.*, 1997).

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

Como ya se indicó en el apartado de *Planteamiento*, el objetivo del presente trabajo es la búsqueda de QTLs con influencia sobre caracteres de producción láctea, en el cromosoma 6 ovino. Los marcadores genéticos utilizados son secuencias de tipo microsatélite, distribuidas uniformemente a lo largo del mapa de ligamiento de este cromosoma, de forma que actúan como puntos de referencia.

De entre los posibles diseños experimentales, descritos en el apartado de *Revisión bibliográfica*, el modelo que se ajusta a la estructura poblacional disponible es el denominado “diseño hija”. Las pautas seguidas para su aplicación aparecen esquematizadas en la Figura 4.

El “diseño hija” implica el análisis de familias constituidas respectivamente por un padre y su descendencia de medio-hermanas. En ellas, se estudia la segregación paterna de los loci marcadores, con la finalidad de detectar una posible asociación entre la transmisión de una determinada región cromosómica y una diferencia cuantitativa, en relación a los caracteres productivos considerados.

De acuerdo con el esquema que se presenta en la Figura 4 podemos diferenciar en el estudio realizado las etapas siguientes:

~ A partir del núcleo de selección de la raza Churra se eligieron ocho sementales, utilizados en el programa de inseminación artificial cuyas hijas se encontraban distribuidas en diferentes explotaciones.

~ Para aquellos marcadores en que los padres resultaron heterocigóticos, se procedió al análisis de la dotación alélica de sus hijas respectivas, y de sus madres, en los casos en que esto fue posible. No se realizó la identificación genotípica de la descendencia para un marcador determinado cuando el padre resultó homocigótico, puesto que dichos genotipos no resultaban informativos en el contexto del presente estudio.

~ Una vez finalizado el análisis laboratorial, fueron excluidas del estudio todas aquellas hembras para las que se detectó una asignación errónea de la paternidad.

~ Además, para cada microsatélite particular, fueron descartadas las hijas cuyo genotipo no era informativo, es decir no permitía conocer con certeza la forma alélica heredada del padre.

~ Para cada familia y para cada marcador genético se distribuyeron los genotipos informativos en dos grupos, en función del alelo paterno heredado.

~ Finalmente se realizó el análisis estadístico para evaluar las diferencias entre ambos grupos de hijas para varios caracteres de producción láctea.

ANIMALES

Todos los animales utilizados en el presente estudio pertenecen a explotaciones inscritas en la Asociación Nacional de Criadores de Raza Churra (ANCHE) y están incluidos en el núcleo de selección.

De acuerdo con el diseño experimental propuesto, se consideraron ocho familias individuales (designadas como 1, 2...8), constituidas respectivamente por un semental y sus hijas. Cada uno de los sementales es un individuo catalogado como mejorante para producción láctea y utilizado en el programa de inseminación artificial desarrollado por el esquema de selección de la raza ovina Churra. Sus hijas respectivas son hembras nacidas en diez explotaciones (designadas como A, B, ...J), pertenecientes al núcleo de selección y sometidas a controles productivos periódicos.

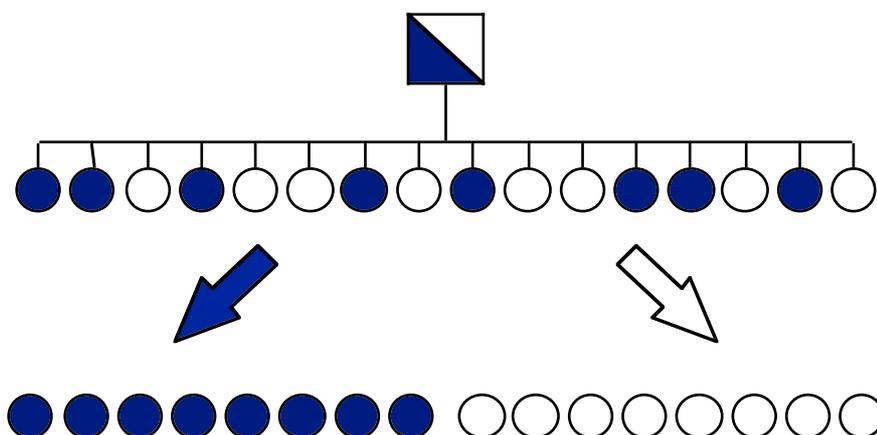
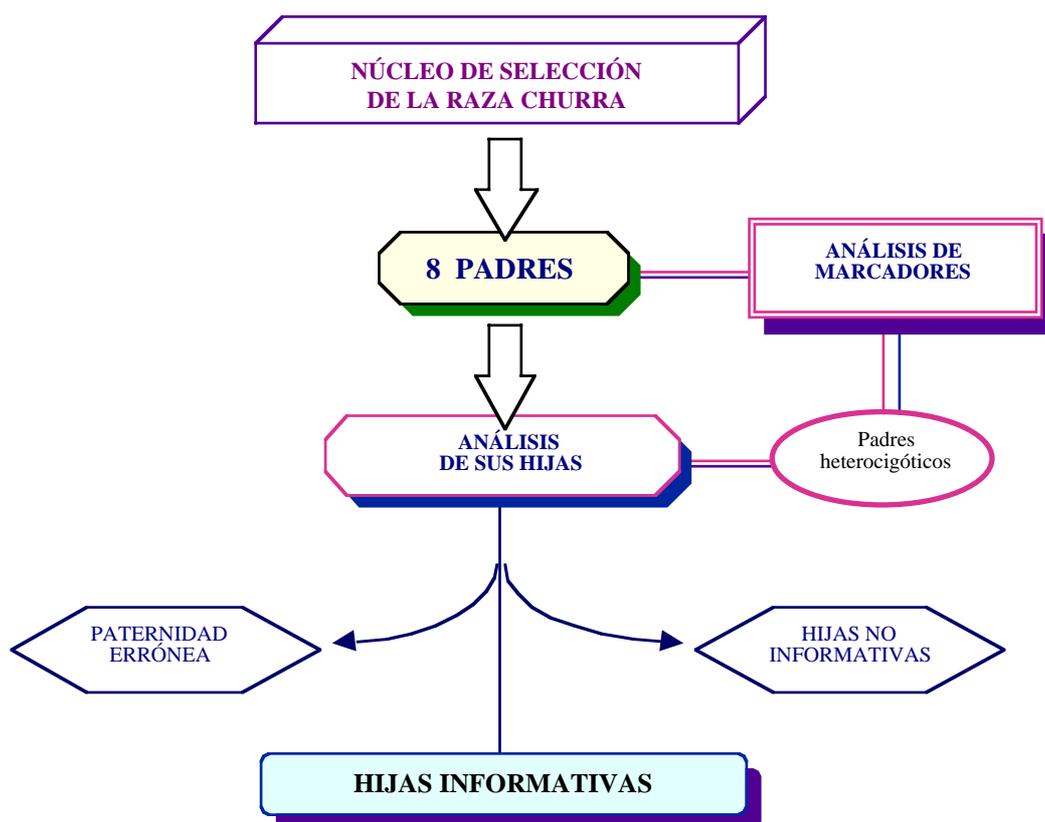
El criterio utilizado para la elección de las familias fue el número de hijas, asignadas a cada semental.

Así, fueron seleccionadas las ocho familias de medio-hermanas que, al inicio del estudio, contaban con un mayor número de miembros. La Tabla 7 refleja el número de hijas por familia, así como su distribución en las explotaciones correspondientes.

Con objeto de facilitar la resolución de los errores en la asignación de paternidad, así como de incrementar el número de genotipos informativos, los análisis fueron extendidos a todas aquellas madres de hembras en estudio que se encontraban disponibles en las explotaciones. El número de madres analizadas por familia y explotación es el que se muestra en la Tabla 8.

En conjunto se analizaron un total de 818 individuos, incluyendo padres, madres e hijas.

Figura 4. Diseño experimental



MARCADORES

El origen y las características de las secuencias analizadas se muestran en la Tabla 9. El microsatélite BM415 (BISHOP *et al.*, 1994), considerado inicialmente, fue descartado con posterioridad, debido a la existencia de alelos silentes para el mismo en la población en estudio. La Figura 5 representa la localización de estos marcadores en el mapa de ligamiento del cromosoma 6 ovino (MADDOX *et al.*, 1996).

Tabla 7. Número total de hijas asignadas a cada familia

Explotación	Familia								Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>A</i>	-	10	-	29	-	11	15	20	85
<i>B</i>	-	17	8	29	-	25	30	-	109
<i>C</i>	17	-	12	-	-	4	9	-	42
<i>D</i>	-	8	21	-	-	-	-	9	38
<i>E</i>	-	-	-	16	14	-	21	-	51
<i>F</i>	12	5	16	13	11	18	8	8	91
<i>G</i>	-	-	4	12	7	-	6	7	36
<i>H</i>	9	-	20	-	11	25	-	-	65
<i>I</i>	14	-	5	-	-	-	6	9	34
<i>J</i>	-	-	-	5	10	6	-	9	30
Total	52	40	86	104	53	89	95	62	581

Tabla 8. Número de madres analizadas por familia y explotación

Explotación	Familia								Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>A</i>	-	2	-	7	-	6	6	22	43
<i>B</i>	-	6	3	8	-	5	7	-	29
<i>C</i>	6	-	5	-	-	-	8	-	19
<i>D</i>	-	0	13	-	-	-	-	3	16
<i>E</i>	-	-	-	3	4	-	11	-	18
<i>F</i>	5	1	4	0	3	7	1	2	23
<i>G</i>	-	-	2	5	0	-	0	4	11
<i>H</i>	5	-	4	-	2	13	-	-	24
<i>I</i>	3	-	1	-	-	-	2	6	12
<i>J</i>	-	-	-	2	5	5	-	6	18
Total	19	9	32	25	14	36	35	43	213

Tabla 9. Origen y características de los marcadores analizados

Marcador	Origen	Repetición	Referencia
OarCP125	genoteca ovina	<i>no publicada</i>	Lord <i>et al.</i> (1996)
McM53	genoteca ovina	(AC) ₂₃	Smith <i>et al.</i> (1995)
OarAE101	genoteca ovina	(TG) ₂₂	Montgomery <i>et al.</i> (1993)
BM143	genoteca bovina	(CA) ₂₁	Bishop <i>et al.</i> (1994)
BMS360	genoteca bovina	(CA) ₂₆	Stone <i>et al.</i> (1995)
BM4621	genoteca bovina	(CA) ₁₄	Bishop <i>et al.</i> (1994)
BM415	genoteca bovina	(GT) ₁₉	Bishop <i>et al.</i> (1994)
BM4311	genoteca bovina	(AC) ₆ A ₂ (AC) ₁₂	Bishop <i>et al.</i> (1994)
CSR293	genoteca ovina	<i>no publicada</i>	Maddox <i>et al.</i> (1996)
OarJMP8	genoteca de células híbridas oveja x hámster	(AC) ₁₈	Lumsden <i>et al.</i> (1996)
McM214	genoteca ovina	(GT) ₂₆	Hulme <i>et al.</i> (1995)
OarJMP12	genoteca de células híbridas oveja x hámster	(AC) ₂₁ TC(AT) ₃ TA ₅ TA ₂ T ₃ A ₂ CTC ₉ A ₈	Lumsden <i>et al.</i> (1996)

El análisis de cada microsatélite se llevó a cabo, únicamente, en aquellas familias en las que el padre resultó ser heterocigótico. En la Tabla 10 se esquematizan los marcadores analizados en las distintas familias.

CARACTERES ESTUDIADOS

Las variables de producción láctea consideradas en el presente estudio pueden clasificarse en dos grupos:

~ *valores fenotípicos*, procedentes de los registros del control lechero de la raza Churra, efectuado bajo la supervisión de la asociación ANCHE.

~ *valores genéticos*, obtenidos mediante el método BLUP, Modelo Animal, en el Departamento de Producción Animal I de la Universidad de León.

En cada uno de estos grupos, se han tenido en cuenta los datos referentes a los siguientes caracteres:

- ~ leche ordeñada (kilogramos), referida al periodo de lactación estándar.
- ~ cantidad de proteína (kilogramos), referida al periodo de lactación estándar.
- ~ porcentaje de proteína, determinado en cada control.

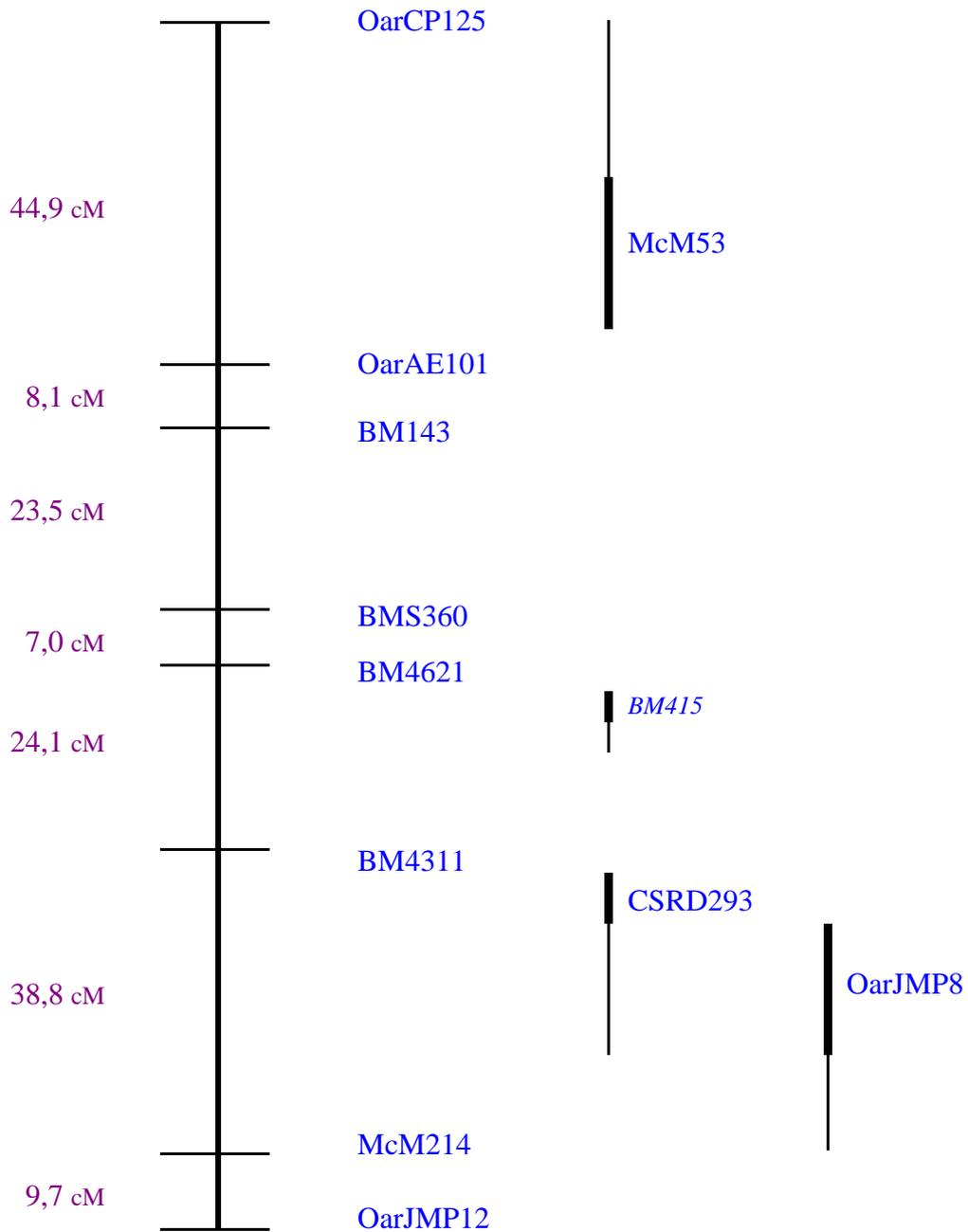


Figura 5. Mapa de ligamiento de los microsatélites analizados (Distancias estimadas a partir de MADDOX *et al.*, 1996)

1. VALORES FENOTÍPICOS

El control lechero de la raza Churra sigue la normativa dictada por el Comité Internacional para el Registro Animal (ICAR), según consta en la Orden de 3 de febrero de 1992 sobre Comprobación del Rendimiento Lechero Oficial del Ganado (BOE nº 55 de 4 de marzo), que modifica a la Orden de 11 de febrero de 1986 (BOE nº 45 de 21 de febrero).

El procedimiento de control que se emplea es el denominado “AF”, que consiste en la medida del volumen de producción, en controles alternos mañana-tarde.

Es obligatorio realizar un mínimo de cuatro controles por oveja, tres si se trata de hembras de primer parto.

En cada uno de ellos se toma una muestra de 50 cc de leche por animal, con objeto de determinar las concentraciones de grasa y proteína de la misma.

Tabla 10 . Marcadores analizados para cada familia

Marcador	Familia							
	1	2	3	4	5	6	7	8
OarCP125	-	•	•	-	•	•	•	•
McM53	•	•	•	-	•	•	•	•
OarAE101	-	•	•	-	•	-	•	•
BM143	-	•	•	•	•	•	•	•
BMS360	•	-	•	•	•	-	•	•
BM4621	•	•	•	•	•	•	•	•
BM4311	•	•	-	•	-	•	-	•
CSRD293	•	•	•	-	-	•	•	•
OarJMP8	•	•	-	•	-	•	-	-
McM214	•	•	•	•	-	-	•	•
OarJMP12	•	-	•	•	-	-	-	•

Dos de las variables analizadas se estiman por lactación, mediante el método de Fleischmann o del “día centrado”.

Son las siguientes:

~ *cantidad de leche ordeñada*, estimada entre los días 30 a 120.

~ *cantidad de proteína*, estimada en los 120 primeros días de lactación, a partir de los datos de porcentaje de proteína y cantidad de leche de los cuatro primeros controles.

La variable *porcentaje de proteína* se determina en cada control.

2. VALORES GENÉTICOS

En el caso de los parámetros estimados por lactación, las valoraciones genéticas se realizan mediante el modelo siguiente:

$$Y = \mu + \text{RAE} + \text{Tp} + \text{Ed} + \text{U} + \text{Ep} + \varepsilon$$

donde Y es el valor fenotípico del carácter, μ es la media poblacional para el carácter, RAE es el efecto rebaño-año-estación, Tp es el tipo de parto, Ed es la edad del individuo, U es el efecto genético del individuo, Ep es el efecto del ambiente permanente del individuo y ε es el efecto residual.

En cuanto al carácter “porcentaje de proteína”, estimado por controles, el modelo de evaluación es el siguiente:

$$Y = \mu + \text{HTD} + \text{Tp} + \text{SL} + \text{U} + \text{Ep} + \varepsilon$$

siendo HTD el efecto rebaño-día de control y SL el efecto de la semana de lactación post-parto.

METODOLOGÍA LABORATORIAL

La determinación de los genotipos individuales, para cada microsatélite, se realizó por medio de las siguientes etapas:

1. Extracción del DNA a partir de muestras de sangre o semen.
2. Amplificación de los microsatélites en estudio, a partir del DNA genómico, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
3. Separación electroforética de los fragmentos amplificados.
4. Identificación de los genotipos individuales para cada microsatélite.

1. EXTRACCIÓN DEL DNA

La extracción del DNA se realizó a partir de dos tipos de muestras: sangre, en el caso de las hembras, y semen en el caso de los sementales. A continuación se describe el proceso de extracción seguido en cada caso:

1.1. EXTRACCIÓN DEL DNA A PARTIR DE SANGRE

Las muestras sanguíneas, obtenidas mediante punción en la vena yugular, fueron recogidas en tubos de vacío de 10 ml con EDTA-K₃ como anticoagulante (Venoject). El procedi-

miento seguido para la obtención del DNA a partir de sangre es el propuesto por GROBET *et al.* (1991) con algunas modificaciones, según se describe a continuación:

A los 10 ml de sangre iniciales se añadieron 30 ml de T₁₀E₁₀ (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 10 mM). La mezcla fue agitada durante 15 segundos con objeto de producir la hemólisis, y centrifugada durante 10 minutos a 2000 rpm para provocar la precipitación de los leucocitos. Tras la decantación del sobrenadante, se procedió al lavado de los leucocitos, utilizando esta vez 40 ml de T₁₀E₁ (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM).

Con el fin de liberar el DNA del interior celular, el precipitado de leucocitos fue sometido a la acción de un tampón de lisis (urea 8 M; Tris-HCl 10 mM pH 8,0; SDS 2%; EDTA 10 mM), en un volumen de 15 ml y en agitación suave durante al menos tres horas. Una vez obtenida una solución homogénea, se procedió a la eliminación de las proteínas contaminantes mediante la realización de dos extracciones consecutivas con 15 ml de una solución de fenol-cloroformo-isoamilalcohol (25:24:1). Seguidamente se practicó una extracción con éter dietílico para eliminar los restos de fenol.

El DNA fue precipitado con dos volúmenes y medio de etanol absoluto, en presencia de NaCl 0,1 M, y recogido con la ayuda de una pipeta Pasteur. Después de un lavado con etanol 70% el precipitado fue resuspendido en 1ml de T₁₀E₁.

La concentración del DNA se calculó en función de su absorbancia a 260 nm. Su grado de pureza se obtuvo a partir de la relación entre los valores de absorbancia obtenidos a 260 y 280 nm.

1. 2. EXTRACCIÓN DEL DNA A PARTIR DE SEMEN

Las muestras de semen, pertenecientes al banco elaborado por el programa de selección de la raza Churra, fueron cedidas para nuestro estudio por el CENSYRA de León.

Para la extracción del DNA se partió de 250×10^6 células, que fueron incubadas durante al menos 2 horas a 50° C en 15 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 10 mM; SDS 0,5%; β mercaptoetanol 2%; proteinasa K 100 mg/ml). La posterior eliminación de las proteínas, precipitación del DNA, resuspensión y medida de la concentración y grado de pureza del DNA, se realizaron siguiendo las pautas anteriormente indicadas para la extracción del DNA a partir de sangre.

2. AMPLIFICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES MEDIANTE PCR

Las reacciones de amplificación de los microsatélites en estudio se efectuaron en un termociclador automático (GeneAmp® PCR System 9600, Perkin-Elmer). Cada amplificación

se desarrolló en un volumen de 10 μ l. La composición de la mezcla de reacción que se empleó de manera sistemática es la siguiente: DNA 100 ng; “primers” 0,8 μ M; dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 200 μ M; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM; Tris-HCl 10 mM pH 9,0; *Taq* DNA polimerasa 0,3 U.

Los sistemas empleados para el marcaje del producto de la PCR fueron de dos tipos, radiactivo y no radiactivo, respectivamente:

~ cuatro de los microsátélites analizados se detectaron por un sistema radiactivo, consistente en la incorporación de 0,8 μ Ci de [³⁵S]dATP α S (500 Ci/ mmol). En este caso, la concentración de dATP de la mezcla base fue reducida a 2,5 μ M.

~ el resto de los microsátélites considerados se detectaron mediante un procedimiento no radiactivo, basado en la introducción de un “primer” marcado con una sustancia emisora de fluorescencia (Cy5).

En todos los casos, los ciclos de temperatura fueron precedidos de un periodo de desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos.

Tanto el número de ciclos como las condiciones de temperatura y tiempo de la reacción fueron optimizados para cada microsátélite. En general, las fases de cada ciclo fueron las siguientes:

~ fase de desnaturalización: 94°C, 20-30 s

~ fase de hibridación de los primers: 50-65°C, 30-60 s

~ fase de extensión: 72°C, 30-60 s

En aquellos casos en los que la temperatura de hibridación resultó ser superior a 60°C, se tomó como temperatura de hibridación-extensión. Finalizado el último ciclo, se realizó una fase de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

La Tabla 11 muestra las secuencias de los “primers” que se han descrito para amplificar cada microsátélite y las características específicas de los ciclos de temperatura utilizados. Los marcadores procesados mediante el sistema radiactivo aparecen señalados.

3. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DEL PRODUCTO AMPLIFICADO

Una vez realizada la amplificación de los microsátélites, su detección se efectuó mediante técnicas de electroforesis.

Para ello, se emplearon dos tipos de soporte: el gel de agarosa con bromuro de etidio y el gel de poliacrilamida.

3. 1. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La electroforesis en gel de agarosa ha sido la técnica utilizada para la visualización rápida del producto de la PCR, durante la optimización de las condiciones particulares de amplificación de cada uno de los microsátélites.

Tabla 11. Secuencias de los “primers” y ciclos de temperaturas empleados para amplificación de los microsátélites.

Marcador	Secuencias de los “primers” (5' → 3')	Ciclos de temperaturas
OarCP125	GCAAATAGCCTCTTGTATGATC ACCAAAACAAGACCTTTATTTTTCATGG	94°C 30 s 50°C 45 s 72°C 45 s 29 ciclos
McM53	CATGGAGTTGTAGAGTCAGACATGA GAGCAAAGGTCATGTCAGGTGT	96°C 30 s 65°C 60 s 27 ciclos
OarAE101 ✖	TAAGAAATATATTTGAAAAAAGTGTATCTCCC TTCTTATAGATGCACTCAAGCTAGG	94°C 20 s 61°C 60 s 30 ciclos
BM143 ✖	ACCTGGGAAGCCTCCATATC CTGCAGGCAGATTCTTTATCG	94°C 30 s 58°C 30 s 72°C 60 s 25 ciclos
BMS360	ACAAAACCACTTTCTTAGCAAACA CTGGGTCTTCATGGTAGGGA	94°C 20 s 56°C 30 s 72°C 30 s 26 ciclos
BM4621 ✖	CAAATTGACTTATCCTTGGCTG TGTAACATATGGGCTGCATC	94°C 20 s 56°C 30 s 72°C 30 s 26 ciclos
BM4311	TCCACTTCTTCCCTCATCTCC GAAGTATATGTGTGCCTGGCC	96°C 30 s 65°C 60 s 27 ciclos
CSR293	GGATCGCAAAGAGTTAAGACATGA CCTGCTTATGAGTTTGACCACCTT	94°C 30 s 55°C 40 s 72°C 40 s 30 ciclos
OarJMP8 ✖	CGGGATGATCTTCTGTCCAAATATGC CATTTGCTTTGGCTTCAGAACCAGAG	94°C 20 s 63°C 60 s 27 ciclos
McM214	AAGCGACTCAGGAGCAGCAG AATGCTTGCATTTATCAAAAGCC	94°C 20 s 63°C 60 s 27 ciclos
OarJMP12	CAAAGAATTGGCCACAAGTGTGAC GCCTGCTTTCTTTGCGTACAAGT	94°C 20 s 63°C 60 s 27 ciclos

✖ sistema de marcaje radiactivo

Las electroforesis fueron realizadas en geles de 15 cm x 10 cm x 0,5 cm, constituidos por un 2% de agarosa y 0,5 mg/ml de bromuro de etidio, en tampón TBE (Tris 90 mM; ácido bórico 90 mM; EDTA 2 mM pH 8,0). El volumen de muestra cargado en cada pocillo del gel, corresponde a los 10 µl procesados en la reacción de amplificación, a los que se añadieron 3 µl de tampón de carga (sacarosa 40%; azul de bromofenol 0,25%; en solución acuosa).

La migración de las muestras de DNA se llevó a cabo en una cubeta de electroforesis horizontal, tras la completa inmersión del gel en tampón TBE. Para ello, se aplicó un voltaje constante de 100 voltios, durante un periodo aproximado de 30 minutos. El producto de la PCR fue analizado en un transiluminador de luz ultravioleta. La reacción se consideró optimizada tras la observación de bandas nítidas del tamaño esperado, utilizando como patrón de tamaño molecular una “escalera de 100 pares de bases”.

3. 2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

El método empleado para la separación de los distintos alelos de cada microsatélite fue la electroforesis vertical en gel de poliacrilamida, en condiciones desnaturizantes. En este sentido, se han utilizado dos variantes: la electroforesis en gel de secuenciación y la electroforesis en equipo de secuenciación automática.

a. Electroforesis en gel de secuenciación

Cuatro de los microsatélites estudiados (ver Tabla 11) fueron analizados mediante electroforesis en geles de secuenciación. El procedimiento implica el marcaje radiactivo del producto de la PCR, que se llevó a cabo, según se ha comentado, mediante la incorporación de [³⁵S] dATPαS.

Las electroforesis se realizaron en geles de 40 cm x 33 cm x 0,4 mm, dispuestos entre dos placas de vidrio. Las placas fueron tratadas previamente por su cara interna, con una solución de etanol: éter dietílico (4:1). Una de ellas recibió además una capa de silano, con objeto de facilitar la recuperación posterior del gel. Una vez vertida la mezcla, se colocó un peine de “dientes de tiburón” por su parte no dentada, invirtiéndose su posición tras la polimerización del gel. La composición de cada gel se detalla a continuación: solución de acrilamida/ bis-acrilamida (19:1) 6%; urea 7 M; tampón TBE 0,5x; persulfato amónico 0,7%; TEMED 0,2%.

Las muestras resultantes de la amplificación se mezclaron con un volumen equivalente de tampón de carga (xilen-cianol 0,25%; azul de bromofenol 0,25%; Ficoll[®]400 15%; EDTA 10 mM; en solución de formamida desionizada). Una vez desnaturizadas a 85°C durante 3 minutos, se cargaron 3 µl de cada muestra en la celdilla correspondiente. La migración del DNA tuvo lugar a 1000 voltios, durante un periodo aproximado de 2 horas. A continuación, se procedió a la recuperación del gel, utilizando una lámina de papel de cromatografía (What-

man). Inmediatamente, fue introducido en un secador de geles, donde permaneció durante una hora a 80°C.

Las bandas de DNA se detectaron a través de la impresión de una película de autorradiografía en contacto con el gel, que fue expuesta durante al menos 48 horas.

b. Electroforesis mediante equipo de secuenciación automática

Siete microsatélites fueron analizados mediante un equipo de secuenciación automática (ALFexpress[®] DNA Sequencer, Pharmacia Biotech). El equipo está basado en un sistema de electroforesis vertical, controlado mediante un ordenador. El conjunto opera mediante la detección de una señal fluorescente, emitida por una sustancia denominada Cy5, al ser excitada por un rayo láser. La incorporación de dicha sustancia como sistema de marcaje de uno de los “primers” permite identificar cada uno de los alelos del microsatélite en cuestión, tras la interpretación de un electroferograma.

La estructura del molde del gel es similar a la descrita para el gel común de secuenciación. Los separadores laterales son de vidrio para permitir el paso del rayo láser a través del gel. La colocación de un peine por su parte dentada, previa a la polimerización del gel, permite la formación de pocillos, donde posteriormente serán cargadas las muestras. Las dimensiones de cada gel fueron 29,7 cm x 14,4 cm x 0,5 mm, y su composición igual a la anteriormente descrita.

De cada muestra, diluida a 1/3 con T₁₀E₁, se tomaron 2 µl, que fueron rediluidos añadiendo 4 µl de la misma solución. Tras la adición de 3 µl de tampón de carga (azul dextrano en formamida desionizada 0,5%), las muestras fueron desnaturalizadas a una temperatura de 85°C durante 3 minutos, y cargadas en el pocillo correspondiente del gel. Cada electroforesis fue desarrollada a 400 voltios, durante un periodo de 1 a 2 horas.

4. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENOTIPOS INDIVIDUALES

La identificación de los genotipos de los animales utilizados en el estudio, para cada uno de los microsatélites, se realizó tal y como se describe a continuación:

~ En el caso de los microsatélites analizados mediante el procedimiento radiactivo, se empleó como patrón la secuencia del fago M13mp18. Para cada alelo, de los distintos microsatélites, se tomó una banda de referencia, generalmente la más intensa. Cada alelo fue designado con el número correspondiente a la base de la secuencia patrón, que se encontraba a la misma altura que la banda de referencia.

~ Para los microsatélites procesados por el método no radiactivo, el análisis genotípico se realizó utilizando el programa informático suministrado con el equipo de secuenciación

automática. Como patrón de tamaño, se empleó una “escalera de 50 pares de bases” marcada con Cy5. Los alelos fueron nombrados de acuerdo con su tamaño molecular, relativo al patrón de referencia.

METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

1. PARÁMETROS CALCULADOS PARA LOS MARCADORES

Las *frecuencias alélicas* de los marcadores, en la población en estudio, se calcularon a partir de los alelos heredados vía materna.

El *contenido de información del polimorfismo (PIC)*, definido para un locus determinado como la probabilidad de conocer el progenitor del que proceden cada uno de los dos alelos de un individuo, fue calculado, para cada uno de los marcadores en estudio, de acuerdo con la fórmula sugerida por BOTSTEIN *et al.* (1980).

La *probabilidad de exclusión de paternidad* (P_{En}) para un locus con n alelos se calculó según la fórmula propuesta por JAMIESON (1994).

2. MAPA DE LIGAMIENTO

En base a la información aportada por los once microsatélites considerados, se elaboró un mapa de ligamiento adaptado a la población en estudio.

El programa empleado para tal fin fue el denominado CRIMAP (LANDER y GREEN, 1987), que utiliza la función de Kosambi para calcular, a partir de las frecuencias de recombinación, la distancia en centimorgans existente entre los marcadores.

Al mismo tiempo, se reconstruyeron los haplotipos más probables de los padres correspondientes a las ocho familias en estudio. Para ello, el programa CRIMAP utiliza una función de máxima verosimilitud asumiendo, como más probables, aquellas fases en las que el número de recombinaciones se hace mínima.

3. ESTUDIO DE DETECCIÓN DE QTLS

En general, y en función del método de análisis utilizado, la metodología estadística puede clasificarse en dos grandes grupos:

1. Análisis de marcadores individuales.
2. Análisis por intervalos (*interval mapping*).

3. 1. ANÁLISIS DE MARCADORES INDIVIDUALES

El estudio de la asociación entre los caracteres y cada uno de los marcadores individuales, consistió en un análisis de varianza (GLM, SAS). Las variables consideradas para cada carácter fueron, el “valor genético” y el “valor fenotípico”. A continuación se describen los modelos estadísticos utilizados en cada caso.

a. Variables de valor genético

El modelo utilizado para las variables de valor genético viene dado por la expresión siguiente:

$$Y = \mu + S_i + M_{j(i)} + \varepsilon_{ijk}$$

donde Y es el valor fenotípico (“valor genético” del individuo estimado para el carácter, mediante el método BLUP, Modelo Animal), μ es la media poblacional para el carácter, S_i es el efecto del semental i, $M_{j(i)}$ es el efecto del marcador j subordinado al semental i, siendo S un efecto aleatorio y M_j un efecto fijo, y ε_{ijk} es el error asociado a cada observación.

En este caso, el tamaño de la muestra coincide con el número de hijas informativas para el conjunto de los marcadores.

b. Variables fenotípicas

En el caso de las variables fenotípicas, se utilizaron dos modelos, uno para los parámetros estimados por lactación, y otro para el estimado por controles, tal y como se indica a continuación:

~ Para los parámetros lactacionales,

$$Y = \mu + RAE_i + np_j + tp_k + S_l + M_{m(l)} + \varepsilon_{ijklm}$$

donde Y es el “valor fenotípico” del carácter, μ es la media poblacional para el carácter, RAE es el efecto rebaño-año-estación i, np_j es el efecto del número de parto j, tp_k es el tipo de parto, S_l es el efecto del semental l, $M_{m(l)}$ es el efecto del marcador m subordinado al semental l y ε_{ijklm} es el error asociado a cada observación.

El tamaño total de la muestra coincide, en este caso, con el número de lactaciones asociadas a las hijas informativas para el conjunto de los marcadores.

~ Para los parámetros estimados por controles,

$$Y = \mu + HTD_i + np_j + tp_k + SL_l + S_m + M_{n(m)} + \varepsilon_{ijklmn}$$

donde Y es el “valor fenotípico” del carácter, μ es la media poblacional para el carácter, HTD es el efecto rebaño-día de control i , SL es el efecto de la semana de lactación l . El resto de los factores se definen de manera similar a las ecuaciones anteriores.

El tamaño total de la muestra coincide con el número de controles productivos asociados a las hijas informativas para el conjunto de los marcadores.

3. 2. ANÁLISIS POR INTERVALOS

En este caso, es necesaria la elaboración previa de un mapa de ligamiento para los marcadores utilizados. Los análisis estadísticos se realizan para posiciones fijas (s) de este mapa, cada 1 cM en nuestro caso, y se desarrollan empleando dos metodologías diferentes:

~ *Método de regresión para marcadores múltiples*, basado en un análisis de mínimos cuadrados y descrito por *KNOTT et al.* (1996).

~ *Método no paramétrico*, basado en el test de rangos de Wilcoxon. Este procedimiento, que no presupone una distribución determinada de los datos, fue descrito por *KRUGLYAK y LANDER* (1995a) para poblaciones obtenidas mediante retrocruzamiento, y adaptado a poblaciones de medio-hermanos por *COPPIETERS et al.* (1998).

Ambos procedimientos realizan un análisis secuencial, que implica las siguientes etapas:

~ En primer lugar, es necesario determinar, en cada intervalo, los haplotipos paternos más probables (A y B), sobre la base de los genotipos de la descendencia. Esto se realiza analizando la cosegregación de los alelos, para cada pareja de marcadores informativos adyacentes. Se acepta como fase de ligamiento más probable, aquella en la que se minimizan los fenómenos de recombinación.

~ A continuación, se calculan las probabilidades de heredar cada uno de los haplotipos paternos, P_A y P_B respectivamente, condicionadas a los genotipos de los marcadores flanqueantes (en la práctica y dado que la suma de probabilidades de haber heredado uno u otro de los haplotipos paternos debe sumar la unidad, solamente se estima una de ellas, P_A). El cálculo de estas probabilidades se lleva a cabo cada 1 cM. El programa informático asume que no hay interferencia entre los sucesos recombinatorios, aplicando la función de Haldane para obtener, a partir de las frecuencias de recombinación, las distancias en cM. En el caso de que ninguno de los marcadores de un grupo de ligamiento sea informativo, la probabilidad de haber heredado el haplotipo A o el B será la misma, es decir 0,5.

~ Por último, se realiza el análisis de detección de QTLs propiamente dicho, utilizando como hipótesis nula (H_0), la no existencia del QTL en ninguno de los puntos del mapa de

ligamiento. Este análisis es diferente para cada uno de los métodos empleados en el análisis por intervalos. A continuación se realiza una breve descripción de los mismos.

a. Método de regresión para marcadores múltiples

En el caso del procedimiento de regresión, en cada posición del mapa de ligamiento la probabilidad condicional P_A para cada hija, es una variable independiente (X), sobre la que se puede regresar el fenotipo como variable dependiente (Y). Para determinar la presencia o ausencia de un QTL en cada posición (s), se calcula el correspondiente estadístico F tomando como H_0 la no existencia de QTL en tal posición, mediante la fórmula:

$$F = \frac{\sum_{i=1}^k SSR_i / k}{\sum_{i=1}^k SSE_i / (n - 2k)}$$

donde n es el número total de observaciones,

k es el número total de familias (padres),

SSR es la suma de cuadrados de la regresión que expresa la variabilidad en el fenotipo, atribuida a la segregación de un hipotético QTL, en la posición (s) y en la familia i ,

SSE es la suma de cuadrados del error, que expresa la variabilidad residual, (o no explicada), en cada familia i .

b. Método no paramétrico

Por lo que se refiere al método no paramétrico, en cada posición (s) del genoma se calcula un estadístico Z_w que se define como:

$$Z_w(s) = \frac{Y_w(s)}{\sqrt{\langle Y_w(s)^2 \rangle}}$$

donde $Y_w(s)$ es un estadístico auxiliar definido como:

$$Y_w(s) = \sum_{i=1}^n [n + 1 - 2 * rank(i)] * [P(g_{i,A}(s) | g_{i,L}, g_{i,R})]$$

n es el número de hijas por cada padre,

$[P(g_{i,A}(s) | g_{i,L}, g_{i,R})]$ se define como la probabilidad de que la hija i de un padre haya heredado el alelo A de un hipotético QTL localizado en la posición (s) del genoma (asumiendo que el semental es AB para dicho locus) dados los genotipos de los marcadores que flanquean a la posición por la izquierda " $g_{i,L}$ " y por la derecha " $g_{i,R}$ ".

$\sqrt{\langle Y_W(s)^2 \rangle}$ es la esperanza de desviación estándar de $Y_W(s)$ bajo la hipótesis nula, es decir, la no existencia de QTL en todos los posibles genotipos. Bajo esta hipótesis, el estadístico Z_W se ajustaría a una distribución normal estándar, con media 0 y varianza 1 pudiendo ser, por lo tanto, fácilmente calculado, su probabilidad en cualquier punto del genoma (s).

Tanto el análisis de regresión, como el no paramétrico, están incluidos en el programa informático "HSQM" (COPPIETERS *et al.*, 1998). Las variables empleadas han sido los "valores genéticos" estimados para las cantidades de leche y de proteína, y para el porcentaje de proteína.

Los valores críticos del test estadístico fueron calculados empíricamente mediante el método de permutaciones sugerido por CHURCHILL y DOERGE (1994). Para ello, se barajaron los fenotipos 10.000 veces, reasignándolos a diferentes genotipos dentro de cada familia. Para cada combinación de datos, se realizó un análisis de la presencia de QTLs. De este modo, se construyó la distribución del test estadístico, para cada uno de los caracteres en estudio.

El nivel de información obtenido a lo largo del mapa de ligamiento (KRUGLYAK y LANDER, 1995b) se calculó de acuerdo con la fórmula descrita por COPPIETERS *et al.* (1998).

$$\text{var}[P(g_{i,A}(s)|g_{i,L},g_{i,R})] - [P(g_{i,B}(s)|g_{i,L},g_{i,R})] = \frac{\sum_{i=1}^n [P(g_{i,A}(s)|g_{i,L},g_{i,R})] - [P(g_{i,B}(s)|g_{i,L},g_{i,R})]}{n-1}$$

cuyos factores han sido previamente definidos.

RESULTADOS

VARIABILIDAD DE LOS MARCADORES

A continuación se describen los resultados referentes a la variabilidad genética de los marcadores incluidos en el presente estudio, reflejados en la Tabla 12 y en las Figuras 6 a 27.

En las figuras impares se puede observar el patrón electroforético de los distintos microsátélites analizados, en forma de autorradiografía o electroferograma, en función de la técnica empleada para su identificación. Cada figura representa a una de las familias en estudio, constituida por el padre correspondiente y una muestra de sus hijas.

Cada electroferograma es la traducción, en forma de picos, de las señales fluorescentes emitidas por el DNA marcado, y que son detectadas por el equipo de secuenciación automática. Cabe señalar que, aun tratándose de DNA duplexo, la señal captada corresponde únicamente a la cadena que ha sido marcada. Como se puede observar, el patrón electroforético más común de cada alelo se caracteriza por un pico alto seguido de uno o varios picos de altura decreciente, y que corresponden a bandas de deslizamiento o “slippage”, originadas durante la reacción de amplificación.

Para la designación de cada alelo se tomó la cifra correspondiente al tamaño en pares de bases del pico más alto. La escala que aparece en la parte inferior de cada electroferograma, elaborada a partir de una “escalera de 50 pares de bases” comercial, nos indica el rango de tamaño aproximado de cada microsátélite.

Las autorradiografías reflejan la imagen electroforética de los microsátélites marcados radiactivamente. Dado que, en este caso, el marcaje se produce en ambas cadenas del DNA, la imagen típica de cada alelo viene representada por dos bandas principales, seguidas de bandas de “slippage” de intensidad decreciente. Una de las bandas principales, generalmente la más intensa, fue utilizada como referencia para la nomenclatura de los alelos, en función de su altura en relación a la secuencia del fago M13mp18, tal y como se muestra en la Figura 11 para el microsátélite OarAE101.

El solapamiento de las bandas de “slippage” con las bandas primarias puede ser problemática a la hora de interpretar el genotipo de un individuo, como sucedió en el caso del microsatélite BM4311. Mientras que la autorradiografía de este marcador mostraba un patrón de bandas relativamente complejo, el patrón de picos derivado de su procesamiento por el sistema no radiactivo (que implica el marcaje de una sola cadena del DNA) pudo ser interpretado fácilmente (Figura 19).

En el caso de uno de los marcadores considerados inicialmente, el microsatélite BM415, se observó un patrón de amplificación irregular, caracterizado por la presencia de un número inusual de individuos homocigóticos. El genotipo de estos individuos mostraba incompatibilidades con el de su supuesto padre, a pesar de que ningún otro marcador había detectado errores en la asignación de la paternidad. Al mismo tiempo, la reacción de amplificación fallaba sistemáticamente para un elevado número de muestras. Todo ello nos llevó a sospechar la presencia de alelos nulos para este marcador, por lo que fue eliminado del estudio.

Las figuras pares reflejan las frecuencias alélicas correspondientes a cada marcador, indicándose en abscisas la denominación asignada a cada alelo. Estas frecuencias se estimaron en base a los alelos de las hijas informativas heredados vía materna, con objeto de eliminar el sesgo debido al padre común. El número de alelos sobre el que se realizó dicho cálculo osciló entre 193 para el marcador OarJMP8 y 412 para BM4621.

Para cada microsatélite se identificaron un número de alelos elevado (Tabla 12), correspondiendo los valores extremos a OarJMP8 (8) y BMS360 (19). No obstante, en la mayoría de los casos, un número reducido de alelos predominó cuantitativamente sobre el resto. Así, solamente 3 ó 4 alelos, según el caso, estuvieron representados en cada marcador con frecuencias superiores a 0,1. Como ejemplo extremo podemos citar el microsatélite OarAE101, para el cual la frecuencia de uno de los alelos estuvo próxima a 0,5, mientras que la frecuencia de los nueve restantes no superó, en ningún caso, el valor de 0,15 (Figura 10). En la situación opuesta y con frecuencias de tipo intermedio, podríamos incluir la secuencia BM4621 (Figura 16), para la cual todos los alelos identificados mostraron frecuencias inferiores a 0,2, presentando 6 de ellos valores no muy alejados entre sí, próximos o superiores a 0,1.

La Tabla 12 incluye, además del número de alelos detectados, la estimación del contenido de información del polimorfismo (PIC) obtenida para cada microsatélite. Este parámetro condensa la información procedente del número de alelos y sus frecuencias en un dato que resulta ser muy indicativo del grado de variabilidad genética de cada marcador.

El PIC alcanzó valores considerables en todos los casos, correspondiendo el mayor de ellos a la secuencia BM4621 (0,88) que presentó también un número de alelos alto (18) y el menor a OarAE101 (0,69) con 10 alelos.

Para algunos de los marcadores, el número de alelos identificados no se correspondió con valores PIC de la misma magnitud, debido a la distribución de sus frecuencias alélicas.

Como ejemplo de esta situación podemos citar la secuencia BM4311, con uno de los mayores números de alelos (18) y un PIC intermedio considerando el rango obtenido (0,77). En este caso, como se puede observar en la Figura 18, una de las variantes alélicas predomina sensiblemente en la población analizada, con una frecuencia próxima a 0,4, correspondiendo al resto unas frecuencias bajas, o incluso una presencia meramente testimonial.

Tabla 12. Número de alelos y valores de PIC para cada marcador

Marcadores	nº de alelos	PIC
OarCP125	12	0,84
McM53	11	0,75
OarAE101	10	0,69
BM143	13	0,75
BMS360	19	0,85
BM4621	18	0,88
BM4311	18	0,77
CSRD293	14	0,85
OarJMP8	8	0,76
McM214	12	0,76
OarJMP12	11	0,79

INDIVIDUOS INFORMATIVOS

El número de ovejas cuya paternidad puede considerarse comprobada, tras eliminar del estudio aquellas que mostraron incompatibilidad genotípica con el padre asignado, queda reflejado en la Tabla 13.

El control de parentesco se llevó a cabo con los microsatélites del cromosoma 6 ovino junto con marcadores de otros cromosomas analizados en nuestro laboratorio. El cálculo de la probabilidad conjunta de exclusión de la paternidad, estimado en base a datos correspondientes a marcadores independientes, nos permite asegurar que las paternidades asignadas son correctas con un nivel de probabilidad superior al 99,8%.

Como puede observarse, el tamaño de las familias de ovejas medio-hermanas, de paternidad comprobada, presentó un amplio rango de variación (entre 34 y 86 animales), contabilizándose finalmente un total de 467 hembras. Las cifras iniciales ponen de manifiesto la dificultad que supuso el disponer de familias grandes en el núcleo de selección del ganado ovino de raza Churra, en el momento de abordar el presente estudio.

En la Tabla 14 se presentan, para cada marcador, las probabilidades de exclusión de paternidad estimadas en base al número de alelos y sus frecuencias. Los valores extremos correspondieron a los microsatélites BM4621 ($P_{En}=77,7\%$) y OarAE101 ($P_{En}=50,8\%$).

OarCP125

Figura 6. Frecuencias alélicas

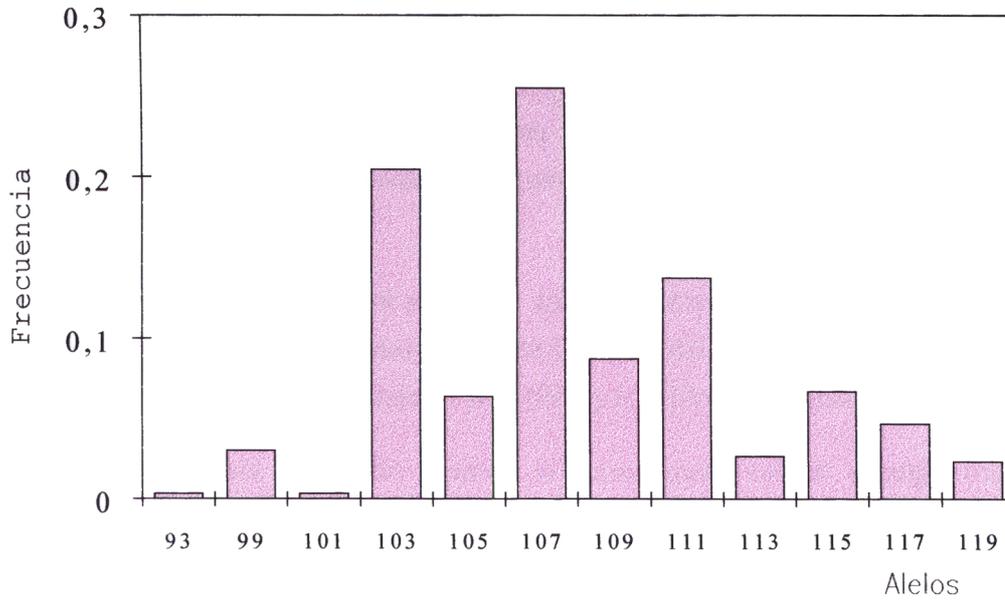
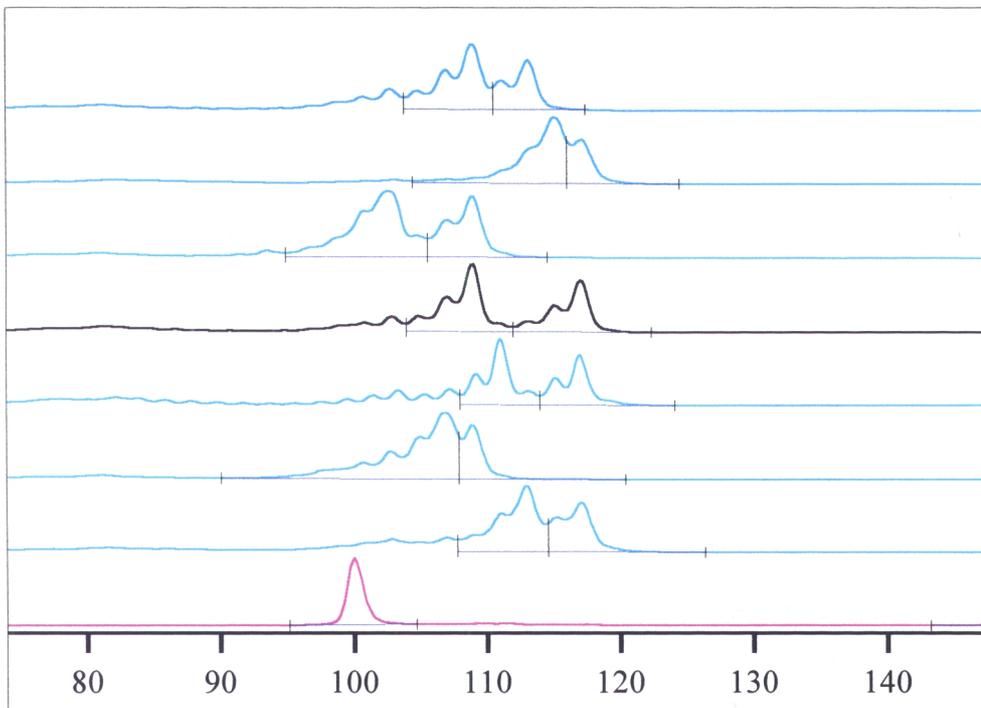


Figura 7. Electroferograma



● padre ● hijas ● patrón de tamaño (escala en pares de bases)

McM53

Figura 8. Frecuencias alélicas

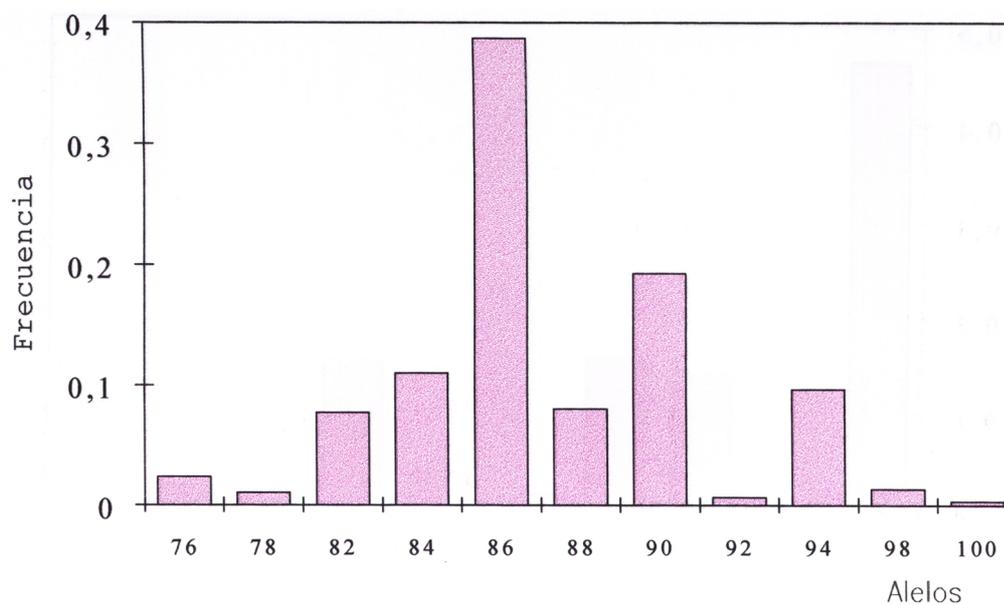
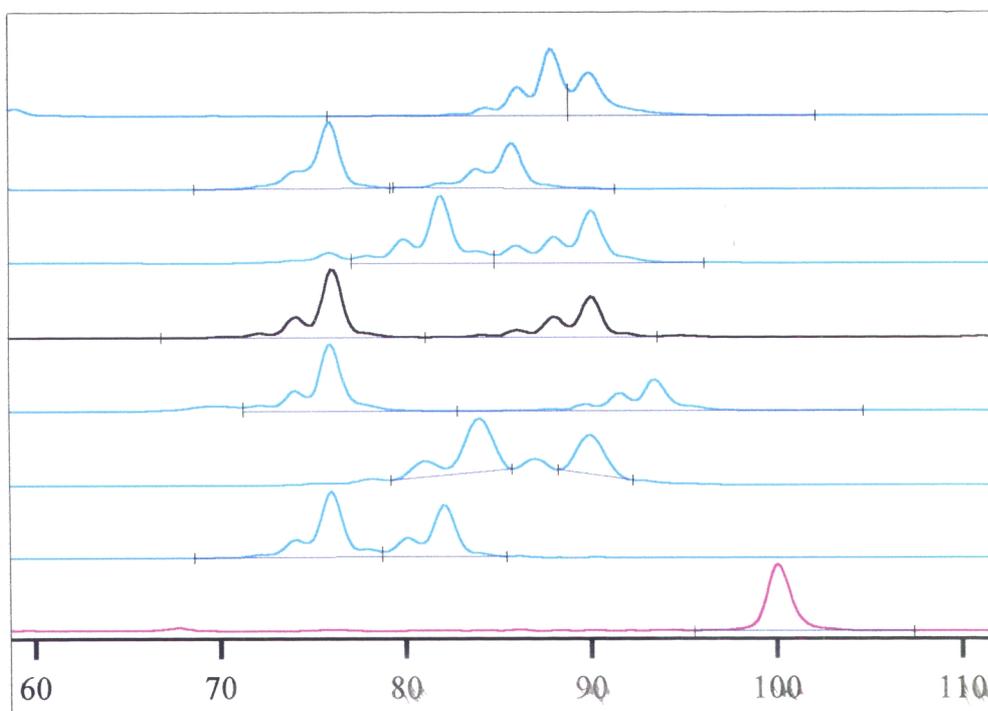


Figura 9. Electroferograma



● padre ● hijas ● patrón de tamaño (escala en pares de bases)

OarAE101

Figura 10. Frecuencias alélicas

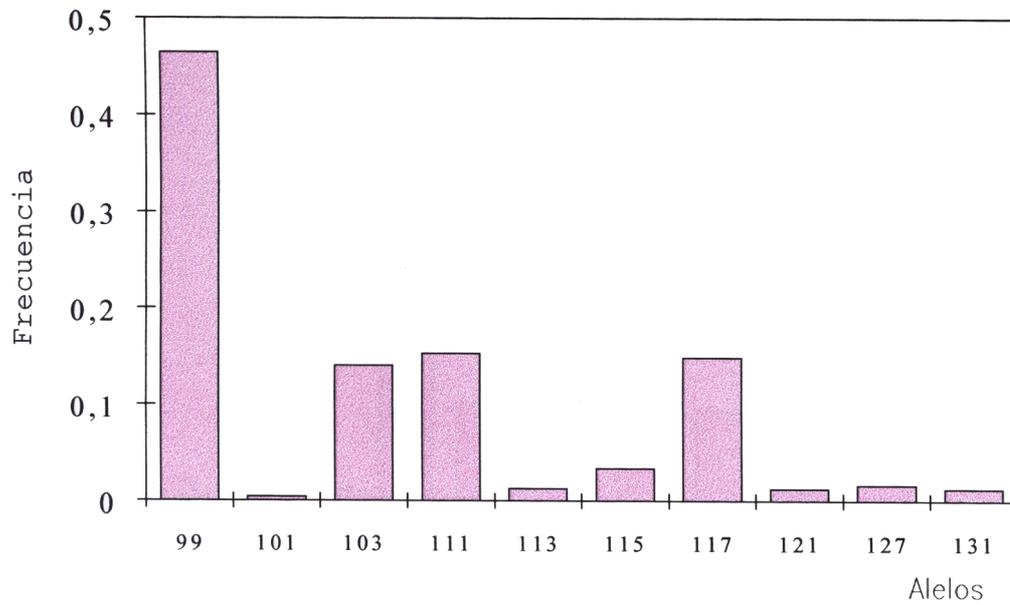
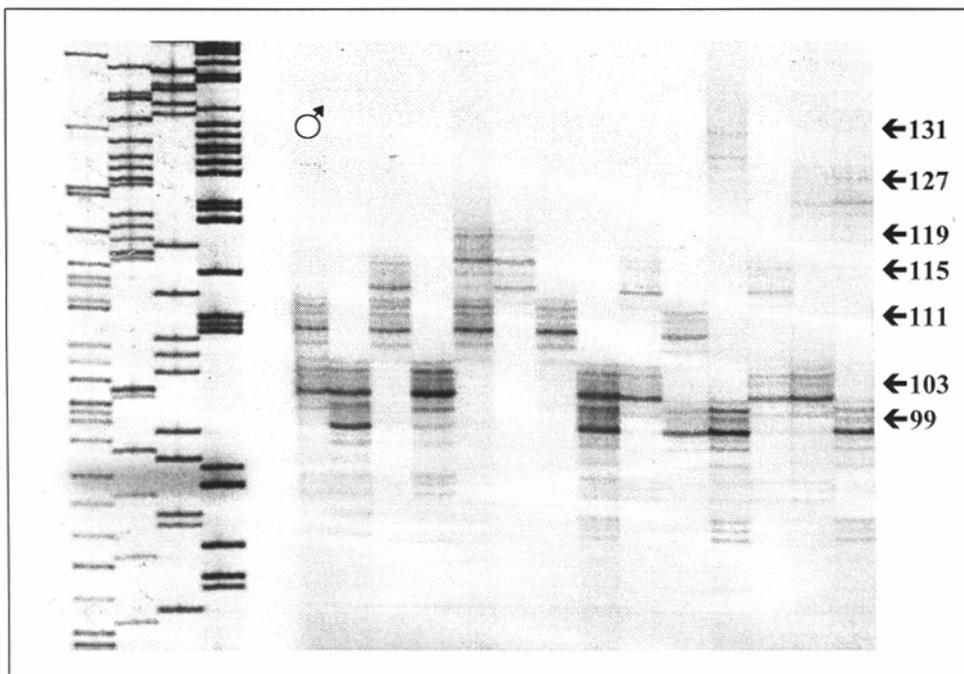


Figura 11. Autorradiografía



A la izquierda se muestra el patrón de tamaño molecular

BM143

Figura 12. Frecuencias alélicas

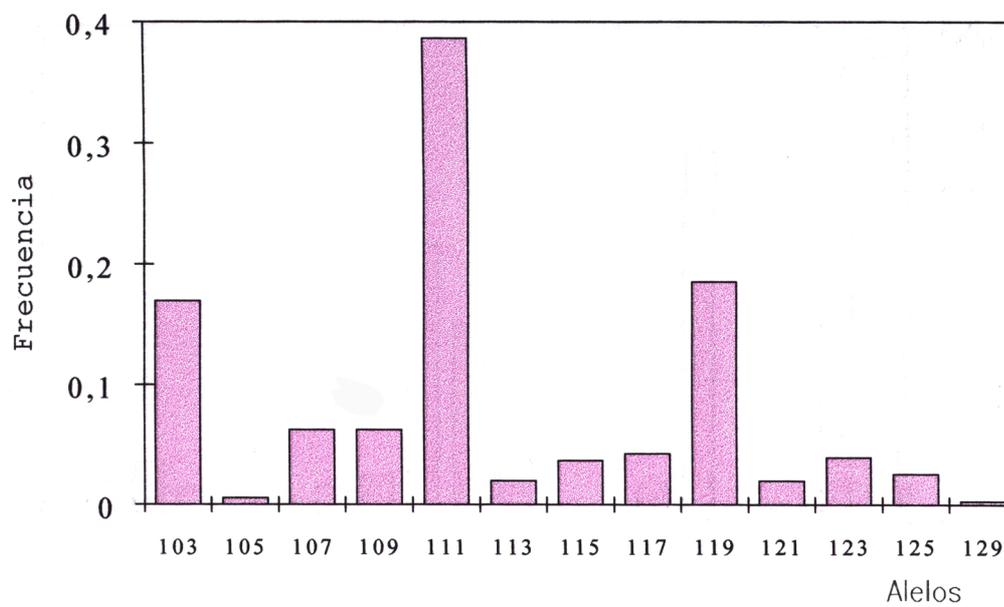
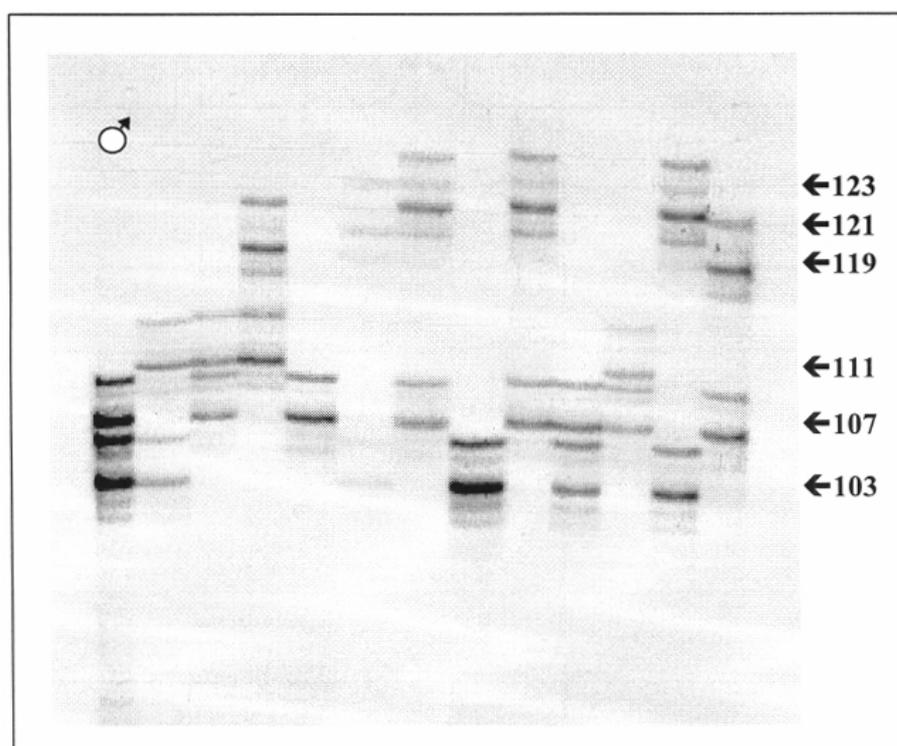


Figura 13. Autorradiografía



BMS360

Figura 14. Frecuencias alélicas

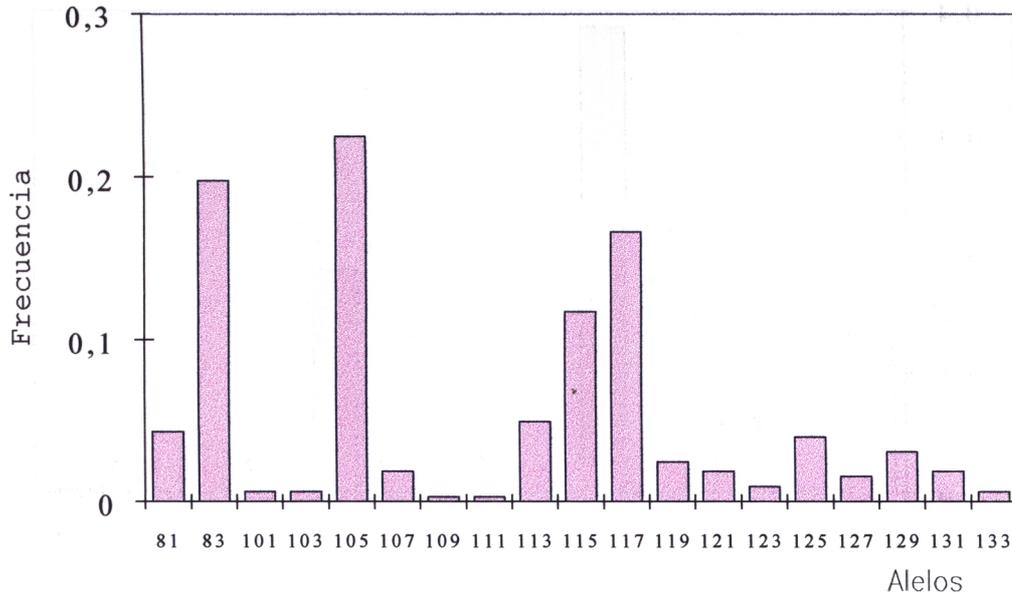
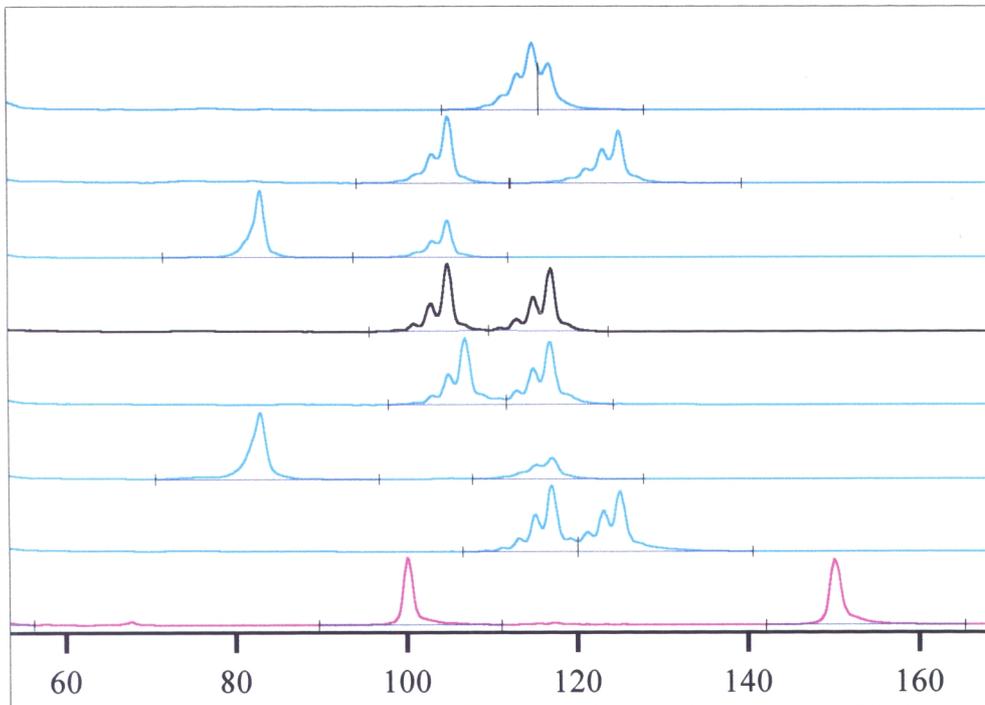


Figura 15. Electroferograma



● padre ● hijas ● patrón de tamaño (escala en pares de bases)

BM4621

Figura 16. Frecuencias alélicas

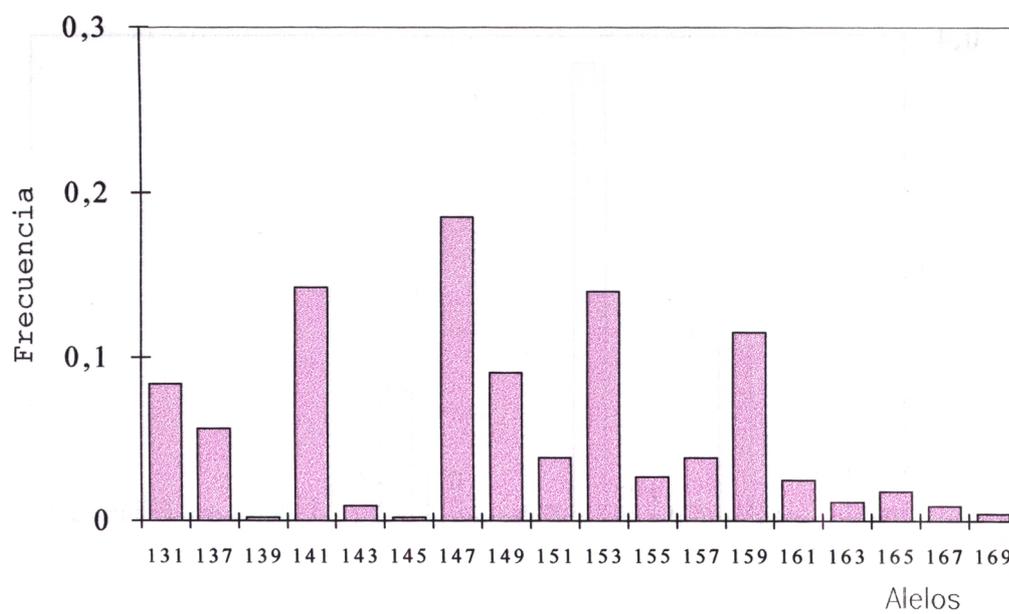
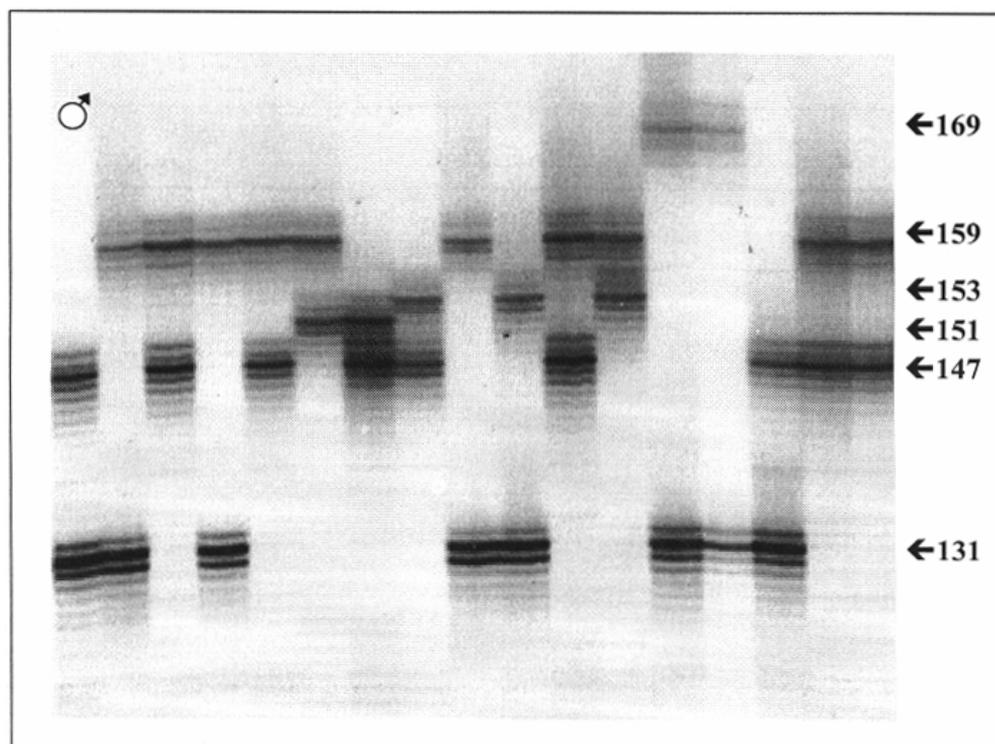
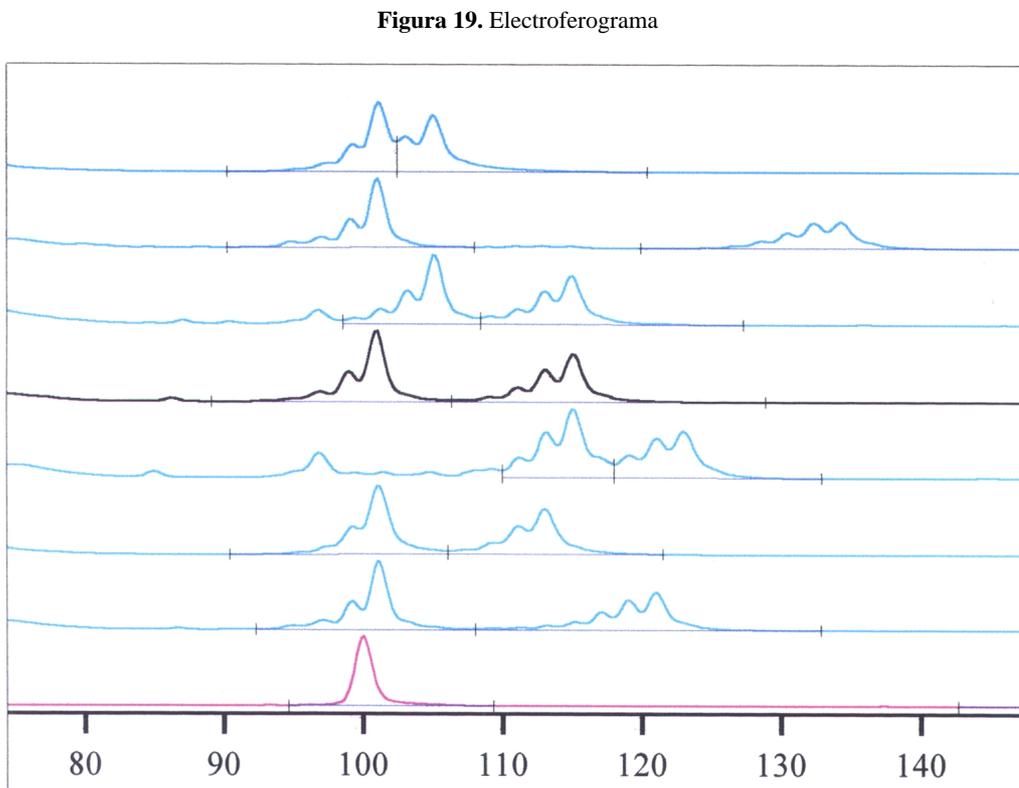
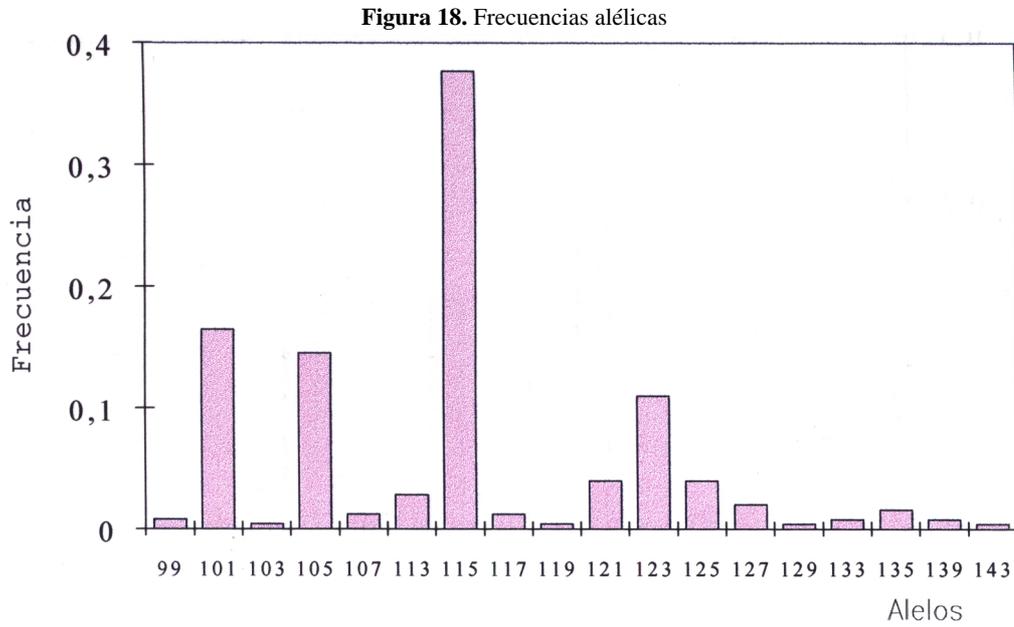


Figura 17. Autorradiografía



BM4311



● padre ● hijas ● patrón de tamaño (escala en pares de bases)

CSRD293

Figura 20. Frecuencias alélicas

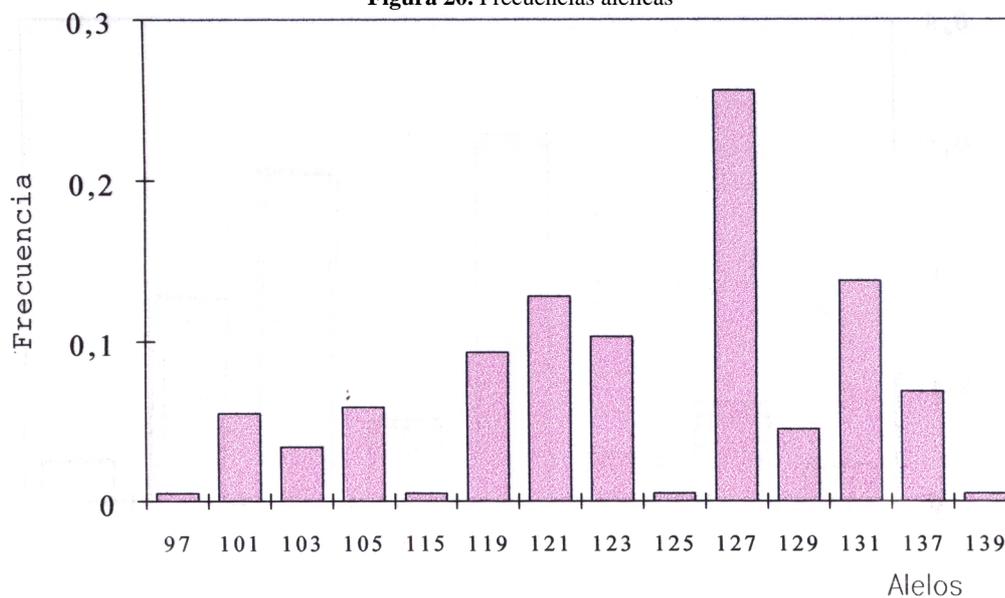
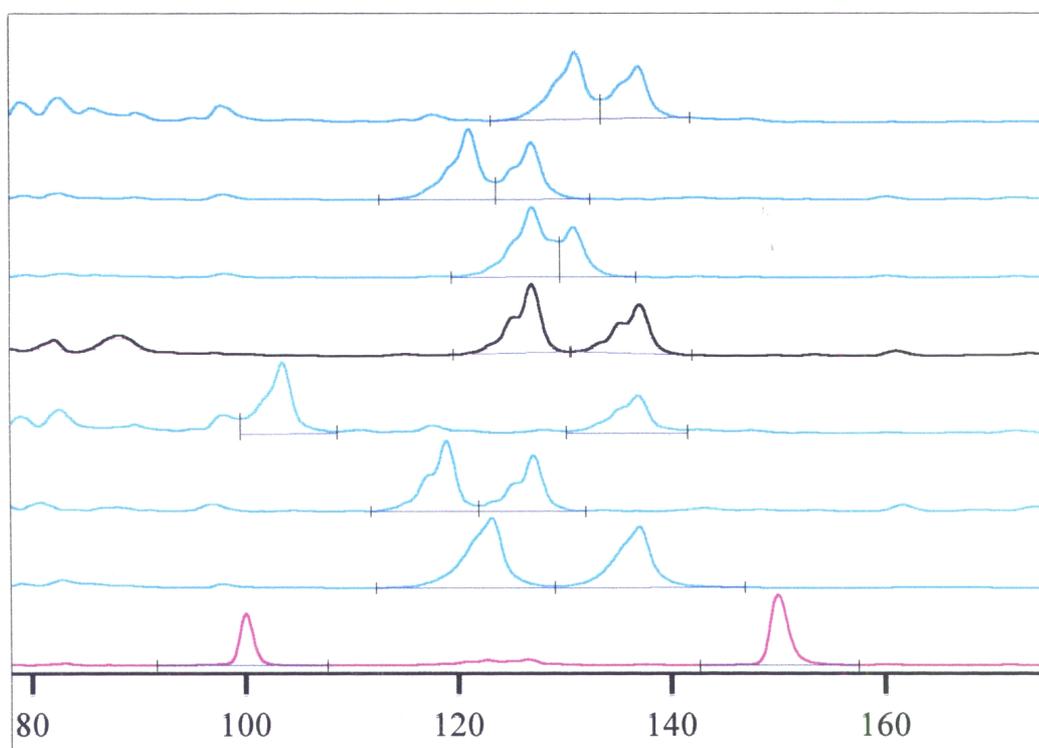


Figura 21. Electroferograma



● padre ● hijas ● patrón de tamaño (escala en pares de bases)

OarJMP8

Figura 22. Frecuencias alélicas

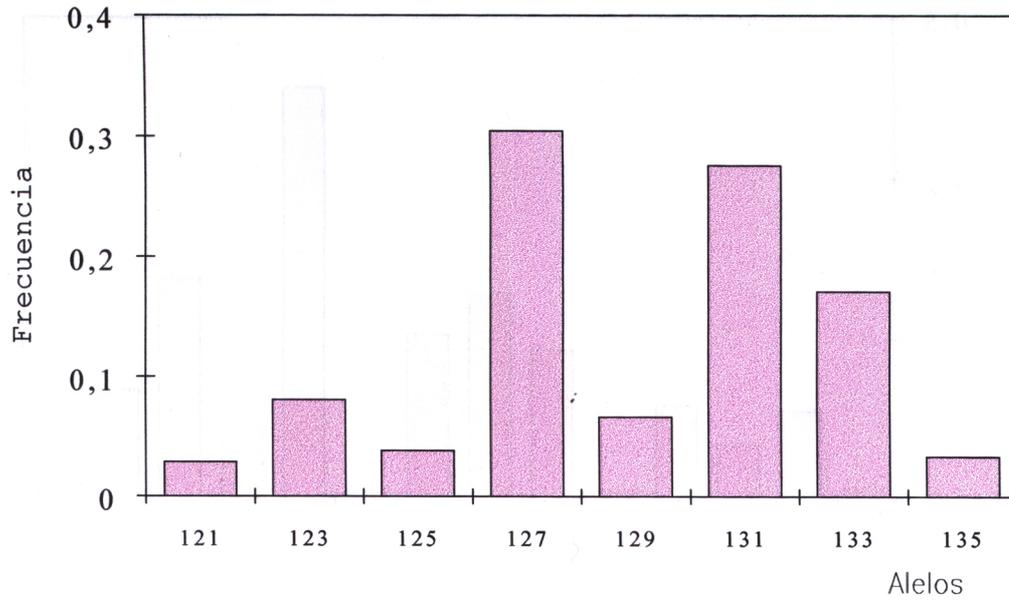
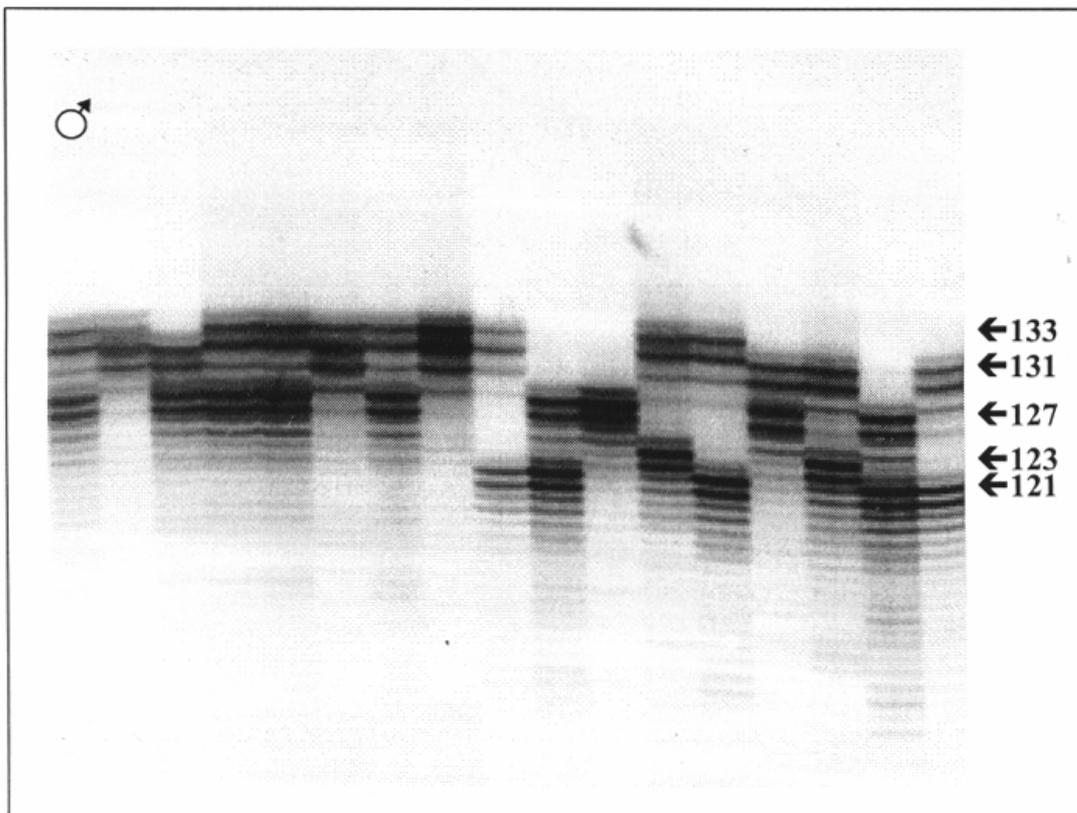


Figura 23. Autorradiografía



McM214

Figura 24. Frecuencias alélicas

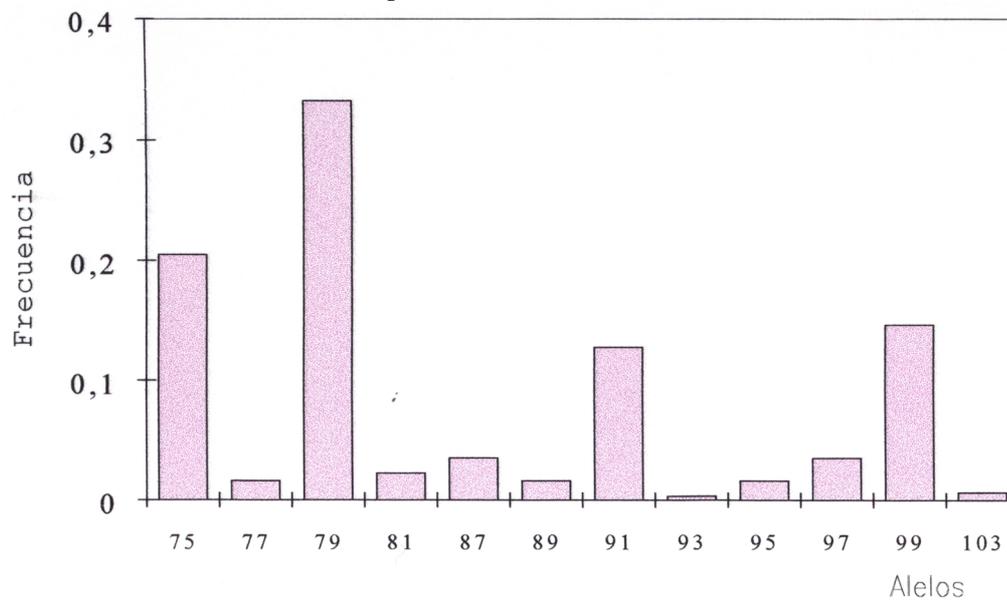
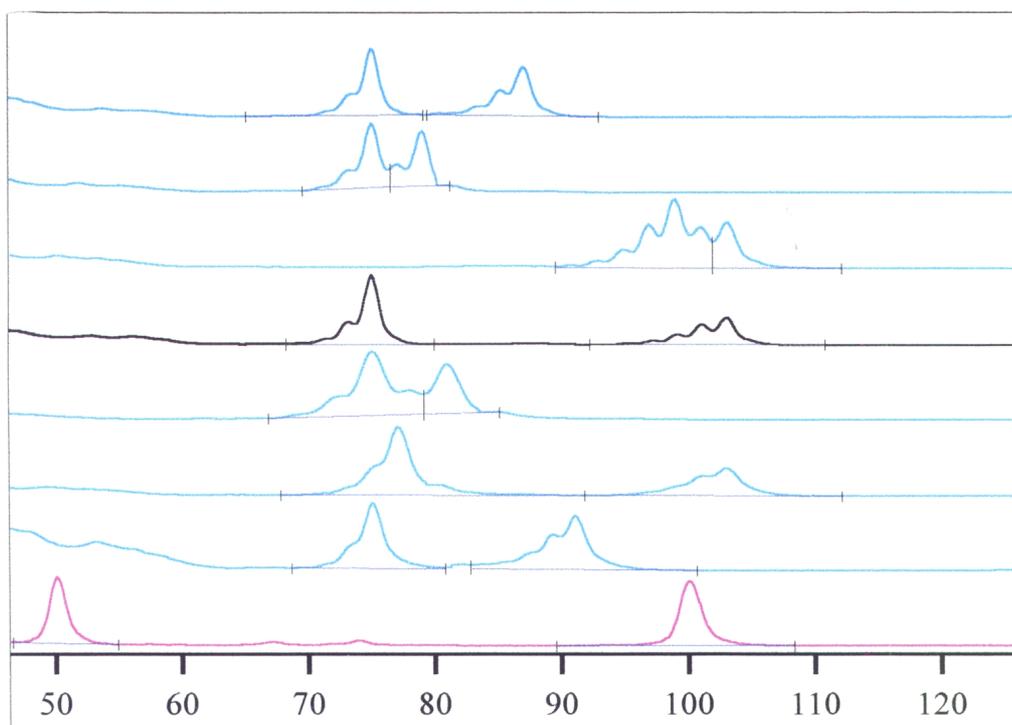


Figura 25. Electroferograma



● padre ● hijas ● patrón de tamaño (escala en pares de bases)

OarJMP12

Figura 26 . Frecuencias alélicas

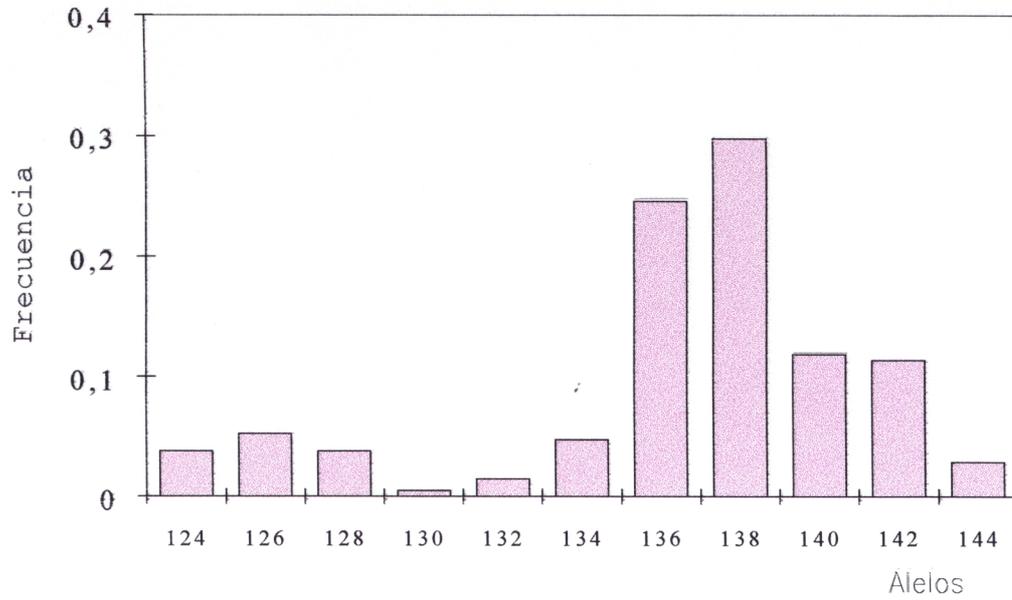
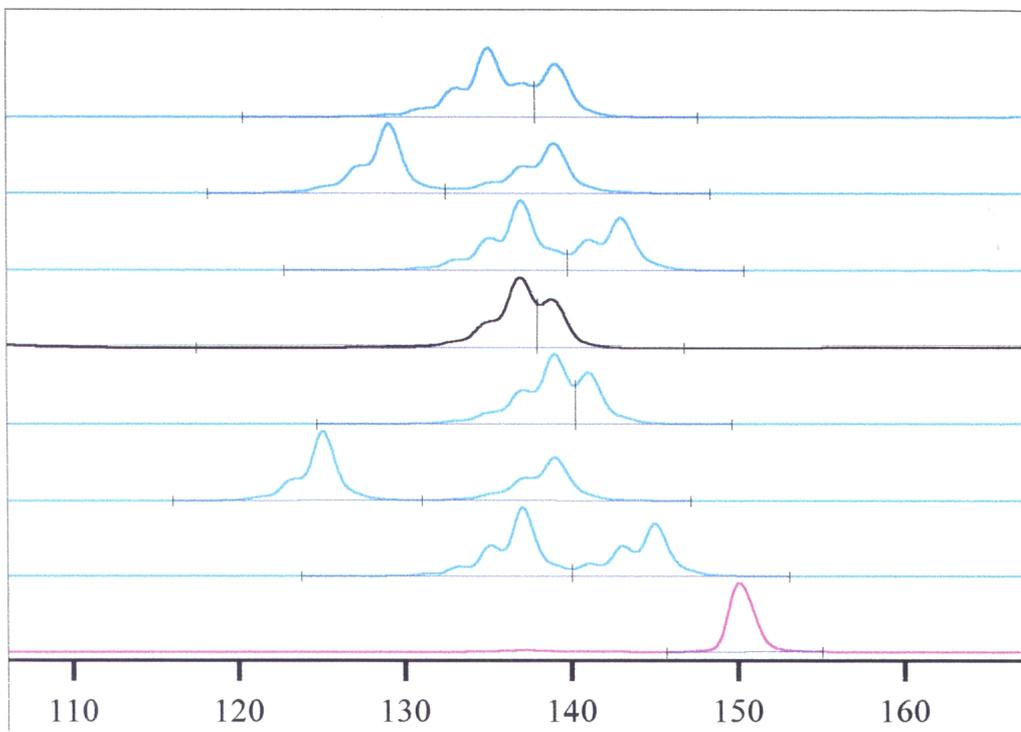


Figura 27. Electroferograma



● padre ● hijas ● patrón de tamaño (escala en pares de bases)

Tabla 13. Número de hijas analizadas en cada familia

n° de hijas	Familia								Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Total analizado	52	40	86	104	53	89	95	62	581
Paternidad comprobada	38	38	73	84	34	73	86	41	467

Se muestran, además, los errores detectados en la práctica por cada marcador, expresados como porcentaje en relación al total de incompatibilidades obtenidas. Estos valores, que oscilaron entre 55,1% (OarCP125) y 19,6% (OarJMP8), son sensiblemente inferiores a los teóricos, representados por el parámetro P_{En} . Tal diferencia se debe, fundamentalmente, a que el diseño experimental destinado a la detección de QTLs no considera para su análisis las hijas de los padres homocigóticos puesto que, en ningún caso, pueden ser informativas en este contexto.

Consecuentemente, el estudio queda restringido a los descendientes de padres heterocigóticos, lo que implica que en esta estimación no se incluyen los casos en los que se obtendría un mayor grado de detección de errores.

Tabla 14. Probabilidad de exclusión de la paternidad (P_{En}) y errores detectados por cada marcador

Marcadores	P_{En} (%)	Errores (%)
OarCP125	75,0	55,1
McM53	59,4	38,0
OarAE101	50,8	28,6
BM143	59,4	26,5
BMS360	72,4	49,5
BM4621	77,7	43,7
BM4311	62,1	37,5
CSRD293	73,5	-
OarJMP8	59,2	19,6
McM214	59,9	34,2
OarJMP12	64,4	38,2

En líneas geneales, se observa que los marcadores que presentaron un mayor valor de P_{En} coinciden con los que detectaron, en la práctica, un mayor número de errores (BM4621, OarCP125 y BMS360). La misma relación se puede establecer para aquellos con menor poder de exclusión de paternidad en términos teóricos y prácticos (OarAE101, OarJMP8 y BM143).

Otro aspecto destacable se refiere al hecho de que todos los padres resultaron homocigóticos para, al menos, uno de los microsátélites. Así, el mayor número de marcadores analizados correspondió a la Familia 8 (10 marcadores) y el menor a la Familia 5 (6 marcadores).

En general, las limitaciones derivadas de la homocigosis de algún marcador fueron obviadas, en parte, por la presencia de otros de localización próxima. No obstante, en el caso de las Familias 4 y 5, los padres correspondientes resultaron homocigóticos para varios microsátélites que cubrían, respectivamente, la zona más próxima y la más alejada del centrómero.

El número de hijas en las que fue posible determinar inequívocamente qué alelo de cada marcador fue heredado vía paterna (hijas informativas), se recoge en la Tabla 15. Estas cifras excluyen, por tanto, a las hembras cuyo genotipo fue idéntico al de su padre para el marcador correspondiente, o al de ambos progenitores en los casos en los que se pudo analizar el genotipo materno.

Las diferencias entre marcadores, en relación al número de hijas informativas, dependen fundamentalmente del número de padres heterocigóticos para cada uno de ellos. Así, las cifras oscilaron entre 193 individuos informativos, para OarJMP8, analizado en tan sólo cuatro familias, y 412 para BM4621, analizado en las ocho familias consideradas.

Por lo que se refiere a los datos individuales, los extremos correspondieron al marcador McM53 en el caso de la Familia 5, con únicamente 25 hijas informativas y a OarAE101 en la Familia 7, con 80.

En la Tabla 15 se muestra también el porcentaje de hijas que resultaron informativas para cada marcador, en relación al número total de hijas analizadas en cada caso. El valor más elevado correspondió al microsátélite BM4621 (88,2%) y el más bajo a McM53 (78,3%).

La información procedente de las madres analizadas en este estudio tuvo un valor limitado, teniendo en cuenta que el número de hijas de genotipo idéntico al paterno fue relativamente bajo.

No obstante, es necesario señalar que en el 80% de las ocasiones en que coincidieron la detección de un genotipo no informativo con la disponibilidad del genotipo materno, fue posible resolver la ambigüedad.

De cualquier forma, tal y como se muestra en la Tabla 16, los valores que indican el porcentaje de hijas en las que se identificó el alelo heredado vía paterna, sin necesidad de recurrir a la dotación alélica transmitida por la madre fueron elevados.

Puede observarse que los valores globales, que superaron en todos los casos el 70%, son sólo ligeramente inferiores a los obtenidos utilizando los genotipos de las madres disponi-

bles (Tabla 15). No obstante, estas diferencias no son absolutamente representativas, teniendo en cuenta que para un gran número de hijas se carecía de información acerca de la dotación alélica materna.

En cuanto a los datos individuales presentados en la Tabla 16, la proporción de hijas informativas, en relación al total de hijas analizadas superó el 80% en la mayor parte de los casos. Los valores máximos se observaron para OarCP125 en la Familia 3 (98%), para McM214 en la Familia 2 (97%) y para BM4621 (97%) en la Familia 5. Los mínimos se estimaron para BM4311 (63%) y para McM214 (66%), ambos en la Familia 8.

La constitución alélica del genotipo paterno es determinante a la hora de interpretar estos resultados.

Así, prácticamente en todas aquellas situaciones en que los valores superaron el 90%, al menos uno de los alelos del padre era relativamente raro en la población.

En relación a los porcentajes mínimos, observados para los microsatélites BM4311 y McM214 en la Familia 8, uno de los alelos del padre aparecía en la población con una frecuencia relativa muy elevada (próxima a 0,4 en ambos casos).

MAPA DE LIGAMIENTO

A partir de las frecuencias de recombinación, estimadas en función de los datos genotípicos obtenidos para cada familia, se realizó un análisis de ligamiento de los 11 microsatélites del cromosoma 6 ovino considerados.

El número de meiosis informativas para cada marcador, en el conjunto de las familias, se corresponde con el parámetro “número de hijas informativas” (Tabla 15). Al igual que en aquel caso, sólo pueden incluirse en el cálculo de la frecuencia de recombinación aquellos genotipos de la descendencia, en los cuales es posible deducir el alelo heredado vía paterna. El menor valor correspondió al marcador OarJMP8 (193) y el mayor al BM4621 (412), siendo la media 285 meiosis informativas.

Los haplotipos más probables de los padres, se corresponden con las combinaciones alélicas más frecuentes transmitidas a sus descendientes.

En la Figura 28 se presentan los haplotipos obtenidos mediante el programa informático utilizado en el estudio de ligamiento, para cada uno de los padres. Las formas alélicas de los microsatélites se designan de acuerdo con la nomenclatura especificada en apartados anteriores. Los genotipos heterocigóticos aparecen resaltados.

Tabla 15. Número de hijas informativas para cada familia y marcador

Marcador	Familia								Total	(%)
	1	2	3	4	5	6	7	8		
OarCP125	-	38	65	-	30	57	68	34	292	<i>(85%)</i>
McM53	31	29	57	-	25	60	66	32	300	<i>(78%)</i>
OarAE101	-	37	57	-	26	-	80	33	233	<i>(86%)</i>
BM143	-	28	61	68	27	62	70	31	347	<i>(81%)</i>
BMS360	35	-	69	59	28	-	75	38	304	<i>(85%)</i>
BM4621	32	31	68	76	33	64	77	31	412	<i>(88%)</i>
BM4311	37	36	-	70	-	65	-	30	238	<i>(87%)</i>
CSRD293	33	31	65	-	-	68	72	30	299	<i>(86%)</i>
OarJMP8	31	28	-	75	-	59	-	-	193	<i>(83%)</i>
McM214	28	37	66	75	-	-	75	31	312	<i>(87%)</i>
OarJMP12	34	-	56	75	-	-	-	35	200	<i>(85%)</i>

Tabla 16. Porcentaje de hijas informativas prescindiendo del genotipo materno.

Marcador	Familia								Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	
OarCP125	-	95%	98%	-	88%	76%	79%	80%	<i>81%</i>
McM53	80%	72%	81%	-	70%	74%	77%	82%	<i>73%</i>
OarAE101	-	95%	74%	-	76%	-	87%	84%	<i>81%</i>
BM143	-	73%	84%	84%	73%	72%	69%	68%	<i>74%</i>
BMS360	92%	-	90%	72%	85%	-	82%	88%	<i>82%</i>
BM4621	91%	78%	90%	89%	97%	94%	86%	76%	<i>86%</i>
BM4311	95%	92%	-	81%	-	85%	-	63%	<i>82%</i>
CSRD293	76%	84%	95%	-	-	95%	83%	71%	<i>81%</i>
OarJMP8	81%	72%	-	89%	-	86%	-	-	<i>79%</i>
McM214	76%	97%	90%	77%	-	-	81%	66%	<i>81%</i>
OarJMP12	86%	-	81%	88%	-	-	-	87%	<i>82%</i>

Figura 28. Haplotipos más probables de los padres

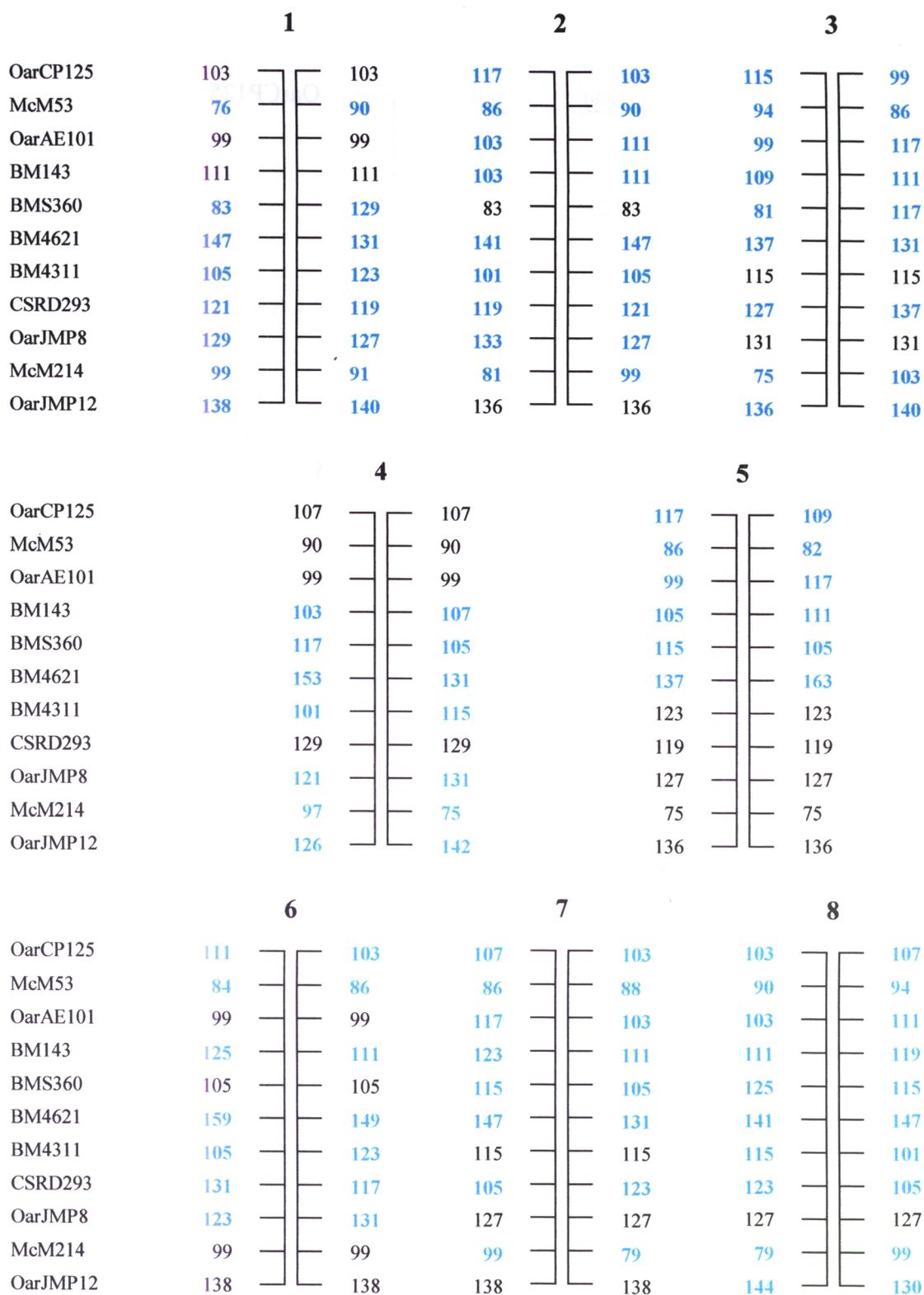
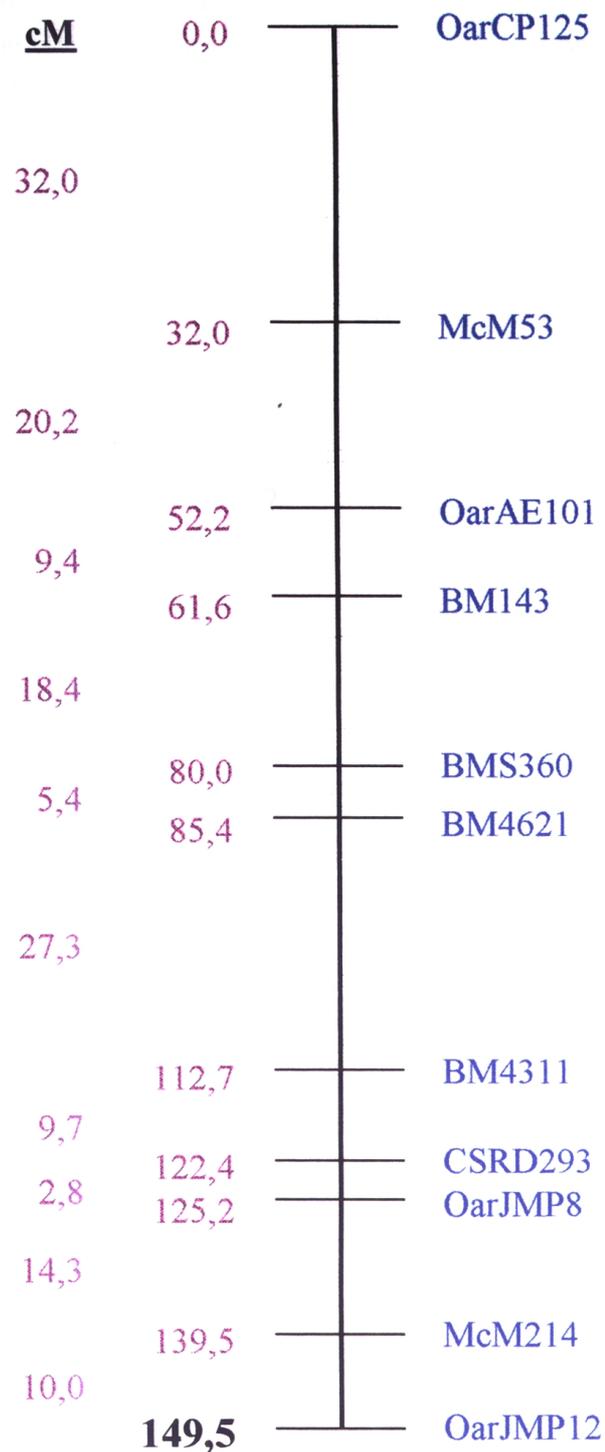


Figura 29. Mapa de ligamento obtenido para el cromosoma 6 ovino

La Figura 29 representa el mapa de ligamento del cromosoma 6 ovino elaborado en base a los datos de nuestro estudio. Es necesario resaltar que las distancias que figuran en este mapa han sido obtenidas a partir de la información procedente, únicamente, de individuos machos.

La extensión total del mapa resultante fue de 149,5 cM. La mayor distancia entre marcadores consecutivos, se observó para el intervalo OarCP125-McM53 (32 cM), seguido de

BM4621-BM4311 (27,3 cM). En el resto de los casos, la separación fue inferior o igual a 20 cM, correspondiendo el mayor grado de ligamiento a los microsatélites CSRD293 y OarJMP8 (2,8 cM).

ESTUDIO DE DETECCIÓN DE QTLS

La exposición de los resultados se realizará por separado para los dos tipos de estudios estadísticos utilizados, que se centraron, respectivamente, en el análisis individual para cada marcador, y en el análisis “por intervalos” empleando marcadores múltiples.

Tal y como se indicó en el apartado de *Material y Métodos*, en el primer caso, que correspondió a un análisis de varianza, se incluyeron como variables tanto el “valor genético” como el “valor fenotípico” de cada uno de los caracteres considerados. Los parámetros productivos considerados en el análisis serán designados como *VGL*, *VGCP*, *VGPP* (“valores genéticos”) y *VFL*, *VFCP* y *VFPP* (“valores fenotípicos”).

Los resultados del análisis de varianza para dos de los caracteres estudiados, “cantidad de leche” (*L*) y “cantidad de proteína” (*CP*) se describen de forma conjunta, debido al paralelismo que se reflejó en los resultados del estudio. De forma independiente, se presentan los datos relativos al carácter “porcentaje de proteína” (*PP*) que no presentó, aparentemente, una relación directa con los anteriores.

El análisis por intervalos engloba, a su vez, dos aplicaciones diferentes que estudian el cromosoma en toda su longitud. La primera consiste en un análisis de regresión y la segunda en un test no paramétrico. En ambos casos, se utilizó como variable el “valor genético”. En este apartado se presentan, de forma conjunta, los datos correspondientes a todos los caracteres considerados.

1. ANÁLISIS DE MARCADORES INDIVIDUALES

1. 1. CARACTERES “CANTIDAD DE LECHE” Y “CANTIDAD DE PROTEÍNA”

Los resultados obtenidos en relación a los caracteres “cantidad de leche” (*L*) y “cantidad de proteína” (*CP*) aparecen resumidos en las Tablas 17 a 20, y detallados en el *Anexo*. En las tablas, se han destacado los valores de probabilidad para aquellos marcadores que mostraron asociaciones estadísticamente significativas en alguna de las familias.

Tanto para *L*, como para *CP*, los resultados más relevantes se obtienen en relación a tres de los marcadores en estudio BM4311, CSRD293 y OarJMP8, que se encuentran muy próximos entre sí en el mapa de ligamiento. El análisis de varianza mostró la asociación entre

cada uno de estos marcadores y los caracteres citados, fundamentalmente en el caso de una de las familias, designada como Familia 6, según se describe a continuación:

Para el carácter *L* (Tablas 17 y 18), todos los valores asociados a los marcadores mencionados resultaron estadísticamente significativos, tanto utilizando el parámetro valor genético (*VGL*) como empleando el valor fenotípico (*VFL*). El nivel de significación obtenido fue del 5% ($P < 0,05$) en todos los casos, con la excepción de la secuencia OarJMP8 para *VGL*, que llegó a alcanzar el 1% ($P < 0,01$).

En cuanto al carácter *CP* (Tablas 19 y 20), fue notable el paralelismo observado en relación a los resultados que se acaban de comentar para *L*, en la misma familia y para las mismas secuencias. Este hecho es más evidente en el caso de la variable *VGCP*, para la cual los tres microsatélites mostraron un efecto significativo asociado ($P < 0,05$). En el caso del parámetro *VFCP*, si bien el efecto correspondiente sólo fue significativo para BM4311, los valores estimados para los otros dos marcadores adyacentes se aproximan al nivel de significación del 5% ($P = 0,0716$ para CSRD293 y $P = 0,0561$ para OarJMP8).

También se obtuvieron resultados paralelos para *L* y *CP* en el caso del marcador BM4621, esta vez en la Familia 5. Los valores de probabilidad resultaron estadísticamente significativos ($P < 0,05$) para *VFL* y *VFCP*. Sin embargo, no lo fueron para *VGL* ni *VGCP*, aunque el valor observado para *VGL* no se aleja mucho del nivel de significación del 5%.

En cuanto al resto de los resultados destacados en las tablas, no se evidenció una correspondencia entre los valores obtenidos para *L* y *CP*. En concreto, se detectaron efectos significativos ($P < 0,05$) asociados respectivamente a los marcadores CSRD293 (Familia 1) y OarJMP8 (Familia 2), para el parámetro *VGL* (Tabla 17). Sin embargo, no se obtuvieron valores comparables para *VFL*, ni tampoco para ninguno de los parámetros del carácter *CP*.

1. 2. CARÁCTER “PORCENTAJE DE PROTEÍNA”

Los resultados del análisis de varianza para el carácter “porcentaje de proteína” (*PP*) aparecen reflejados en las Tablas 21 y 22 y detallados en el *Anexo*. Al igual que en el apartado anterior, los valores de probabilidad destacados en estas tablas indican la detección de asociaciones estadísticamente significativas para los marcadores correspondientes.

En relación a los valores observados, el comportamiento de esta variable no presentó ninguna similitud con los caracteres *L* y *CP* ya comentados. Otro aspecto a señalar, y que contrasta también con la situación anterior es que, en general, no se obtuvieron resultados paralelos para los parámetros *VGPP* y *VFPP*.

Tal vez los datos más interesantes sean los que se refieren a dos microsatélites situados a corta distancia en el mapa de ligamiento, OarAE101 y BM143, teniendo en cuenta que los efectos asociados a los mismos se pusieron de manifiesto para varias de las familias incluidas

en el estudio. Tales efectos aparecen fundamentalmente para la variable *VFPP*, encontrándose sólo en algunos casos, una correspondencia con el parámetro *VGPP*. A continuación se describen los resultados obtenidos para estos marcadores en cada una de las familias.

La Familia 5 fue analizada únicamente para BM143, puesto que para OarAE101 el Padre 5 resultó homocigótico. El nivel de significación alcanzado fue del 1‰ ($P = 0,0009$) para *VFPP*. En el caso de *VGPP*, el valor obtenido no llegó a ser significativo, aunque sí próximo al nivel de significación del 5%.

En la Familia 8, ambos marcadores mostraron una asociación significativa con *VFPP* ($P < 0,05$ para OarAE101 y $P < 0,01$ para BM143). En cuanto al parámetro *VGPP*, sólo el valor asociado a BM143 resultó significativo ($P < 0,05$).

En el caso de la Familia 2, se detectó una asociación significativa para OarAE101 ($P < 0,05$). No obstante, el valor correspondiente a BM143 no se alejó demasiado del nivel de significación del 5%. Estos datos se refieren a la variable *VFPP*. En relación a *VGPP*, no se evidenciaron efectos análogos.

En cuanto a la Familia 3, los valores obtenidos para la variable *VFPP* no llegaron a ser significativos, aunque en el caso de OarAE101 se observó un valor de P relativamente bajo. Algo similar ocurrió en la Familia 4 para BM143.

En esta última familia el microsatélite OarAE101 no fue analizado, debido a que el Padre 5 resultó homocigótico para el mismo.

Por otra parte, en las Tablas 21 y 22 se observan resultados relativos a otros marcadores, que también mostraron asociaciones estadísticamente significativas con el carácter *PP*:

En primer lugar, en la Familia 7, se encontró un efecto asociado a la secuencia OarCP125 ($P < 0,01$) para la variable *VGPP*. Para *VFPP* no se evidenció, sin embargo, ningún efecto similar.

Asimismo, en la Familia 5, los marcadores McM53 y BMS360 mostraron asociaciones significativas ($P < 0,05$) con el parámetro *VFPP*, que no se correspondieron con valores análogos para *VGPP*. Debemos indicar que dentro del intervalo flanqueado por estos marcadores se encuentran las secuencias OarAE101 y BM143, para las cuales, en esta familia, no se detectó ningún efecto asociado.

Por último, en el caso de la Familia 8, resultaron significativos, para *VFPP*, los valores relativos a los microsatélites CSR293 ($P < 0,05$) y McM214 ($P < 0,01$). El valor de probabilidad asociado a BM4311, adyacente a CSR293, fue inferior a 0,10. Al igual que en casos anteriores, estos efectos no se pusieron de manifiesto para la variable *VGPP*.

Tabla 17. Valores de probabilidad (P) obtenidos para el parámetro VGL

Marcador	Familia							
	1	2	3	4	5	6	7	8
OarCP125	-	0,5652	0,5178	-	0,7242	0,3933	0,3749	0,7804
McM53	0,2518	0,7088	0,9625	-	0,2270	0,1374	0,3634	0,2168
OarAE101	-	0,5025	0,6282	-	0,5340	-	0,6534	0,9492
BM143	-	0,5904	0,3816	0,3743	0,4740	0,5911	0,7932	0,3200
BMS360	0,8799	-	0,6925	0,9005	0,5000	-	0,8365	0,8704
BM4621	0,9311	0,7483	0,6060	0,8013	0,0915	0,4847	0,1856	0,2453
BM4311	0,9871	0,1506	-	0,8015	-	0,0145*	-	0,8500
CSRD293	0,8531	0,0353*	0,1117	-	-	0,0314*	0,9300	0,8220
OarJMP8	0,0439*	0,1402	-	0,5316	-	0,0077**	-	-
McM214	0,7896	0,2245	0,6812	0,4979	-	-	0,6007	0,7008
OarJMP12	0,6243	-	0,5443	0,6317	-	-	-	0,5054

Tabla 18. Valores de probabilidad (P) obtenidos para el parámetro VFL

Marcador	Familia							
	1	2	3	4	5	6	7	8
OarCP125	-	0,1599	0,3093	-	0,2621	0,2818	0,2552	0,9747
McM53	0,0775	0,2405	0,9122	-	0,4003	0,0972	0,5374	0,2307
OarAE101	-	0,6743	0,5129	-	0,3263	-	0,9089	0,9875
BM143	-	0,3812	0,4480	0,5410	0,6485	0,4363	0,8925	0,5908
BMS360	0,9784	-	0,4589	0,8110	0,3422	-	0,6287	0,2217
BM4621	0,8479	0,9646	0,4979	0,6870	0,0315*	0,2490	0,8711	0,5147
BM4311	0,9738	0,2775	-	0,1706	-	0,0283*	-	0,9750
CSRD293	0,3445	0,1913	0,0847	-	-	0,0448*	0,5270	0,5651
OarJMP8	0,2164	0,2653	-	0,1956	-	0,0203*	-	-
McM214	0,6445	0,3443	0,4595	0,7953	-	-	0,2560	0,5093
OarJMP12	0,1506	-	0,5108	0,6876	-	-	-	0,8307

* P < 0,05 ** P < 0,01

Tabla 19. Valores de probabilidad (P) obtenidos para el parámetro *VGCP*

Marcador	Familia							
	1	2	3	4	5	6	7	8
OarCP125	-	0,5648	0,2309	-	0,6832	0,6708	0,4299	0,4468
McM53	0,2901	0,5830	0,7089	-	0,4245	0,3030	0,4506	0,6469
OarAE101	-	0,5665	0,7285	-	0,5177	-	0,6552	0,7270
BM143	-	0,7371	0,4885	0,4334	0,5779	0,4777	0,9919	0,4491
BMS360	0,9895	-	0,9123	0,7468	0,4309	-	0,8388	0,6224
BM4621	0,7060	0,9051	0,7753	0,9340	0,1354	0,3955	0,2922	0,4045
BM4311	0,8804	0,2666	-	0,4706	-	0,0159*	-	0,8145
CSR293	0,9490	0,1113	0,1939	-	-	0,0427*	0,6540	0,7503
OarJMP8	0,1111	0,4218	-	0,4676	-	0,0173*	-	-
McM214	0,6354	0,2982	0,7974	0,7098	-	-	0,6262	0,9307
OarJMP12	0,1370	-	0,6655	0,6689	-	-	-	0,4536

Tabla 20. Valores de probabilidad (P) obtenidos para el parámetro *VFCP*

Marcador	Familia							
	1	2	3	4	5	6	7	8
OarCP125	-	0,2287	0,2360	-	0,1622	0,5817	0,3554	0,6047
McM53	0,0576	0,2668	0,7012	-	0,6255	0,2371	0,5037	0,3453
OarAE101	-	0,4991	0,5375	-	0,2709	-	0,6588	0,6540
BM143	-	0,2354	0,6369	0,8112	0,5939	0,3683	0,9162	0,9414
BMS360	0,9011	-	0,5953	0,9442	0,2268	-	0,6791	0,1538
BM4621	0,9204	0,7464	0,5513	0,6848	0,0240*	0,3857	0,8520	0,7282
BM4311	0,7008	0,4567	-	0,1618	-	0,0318*	-	0,6989
CSR293	0,5105	0,4746	0,1962	-	-	0,0716	0,3321	0,6366
OarJMP8	0,1295	0,3323	-	0,1380	-	0,0561	-	-
McM214	0,5565	0,5239	0,5992	0,8720	-	-	0,3196	0,6194
OarJMP12	0,0955	-	0,7088	0,7453	-	-	-	0,8304

* $P < 0,05$

Tabla 21. Valores de probabilidad (P) obtenidos para el parámetro *VGPP*

Marcador	Familia							
	1	2	3	4	5	6	7	8
OarCP125	-	0,8056	0,4727	-	0,2471	0,3089	0,0070**	0,6629
McM53	0,6719	0,6937	0,5217	-	0,3294	0,1902	0,8569	0,7448
OarAE101	-	0,3352	0,3051	-	0,6915	-	0,6033	0,1262
BM143	-	0,6863	0,4027	0,4571	0,4794	0,0787	0,3347	0,0452*
BMS360	0,7408	-	0,9082	0,8860	0,1137	-	0,7025	0,7889
BM4621	0,5633	0,8527	0,4572	0,5877	0,4080	0,1948	0,8510	0,8895
BM4311	0,6158	0,4931	-	0,9611	-	0,4132	-	0,7186
CSRD293	0,3368	0,2606	0,2520	-	-	0,8569	0,6404	0,3547
OarJMP8	0,4313	0,2081	-	0,8639	-	0,6851	-	-
McM214	0,8601	0,4022	0,1001	0,7938	-	-	0,9279	0,1629
OarJMP12	0,8034	-	0,6646	0,8312	-	-	-	0,2106

Tabla 22. Valores de probabilidad (P) obtenidos para el parámetro *VFPP*

Marcador	Familia							
	1	2	3	4	5	6	7	8
OarCP125	-	0,7428	0,4188	-	0,1464	0,5709	0,4926	0,4793
McM53	0,2303	0,6252	0,2024	-	0,0251*	0,7013	0,2205	0,9401
OarAE101	-	0,0218*	0,0763	-	0,5764	-	0,4491	0,0268*
BM143	-	0,0647	0,2082	0,0615	0,5350	0,0009***	0,9498	0,0020**
BMS360	0,4235	-	0,6791	0,7834	0,0279*	-	0,6925	0,8263
BM4621	0,4998	0,2237	0,3804	0,9936	0,2026	0,1165	0,4744	0,3486
BM4311	0,8099	0,9108	-	0,9269	-	0,1898	-	0,0936
CSRD293	0,3609	0,3470	0,1294	-	-	0,7563	0,7703	0,0299*
OarJMP8	0,5640	0,5595	-	0,7516	-	0,9678	-	-
McM214	0,8615	0,6720	0,1345	0,1381	-	-	0,8298	0,0034**
OarJMP12	0,9648	-	0,2851	0,7997	-	-	-	0,4793

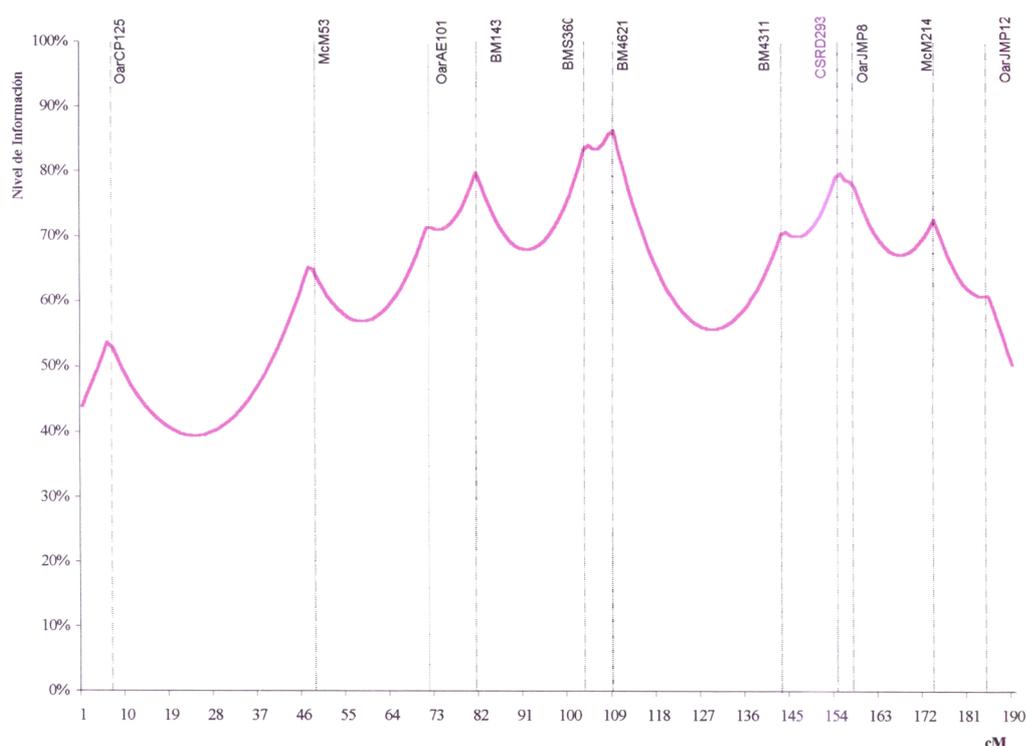
* P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001

2. ANÁLISIS POR INTERVALOS

Como fase preliminar, el análisis por intervalos requiere la elaboración de un mapa de ligamiento, en base a la información aportada por los marcadores incluidos en el estudio. El nivel de información presente en el mapa obtenido se muestra gráficamente en la Figura 30, representándose en abscisas la longitud del mapa en cM. La línea de color indica el porcentaje de información extraída en función de nuestros datos, es decir, la probabilidad de conocer en cada punto del mapa la dotación alélica de origen paterno de los individuos analizados.

Cabe destacar que el nivel de información del mapa, fue elevado para la mayor parte del cromosoma. El mínimo correspondió al intervalo OarCP125-McM53 (39,5%), debido a la gran distancia existente entre ambos marcadores (32 cM). El máximo se observó para el intervalo BMS360-BM4621 (86,4%).

Figura 30. Nivel de información del mapa de ligamiento



Como ya se indicó con anterioridad, el análisis por intervalos contempla, de forma integrada, la información ofrecida por los distintos marcadores del mapa de ligamiento. El resultado de las dos pruebas estadísticas realizadas se representa gráficamente en las Figuras 31 y 32, que corresponden, respectivamente, al método de regresión múltiple (KNOTT *et al.*, 1996) y al método no paramétrico (KRUGLYAK y LANDER, 1995a). Ambas gráficas representan una función de densidad, figurando en abscisas la longitud del mapa de ligamiento en cM, y en ordenadas el $\log_{10}(1/P)$. Los valores críticos fueron determinados mediante un procedimiento de permutaciones fenotípicas (CHURCHILL y DOERGE, 1994).

Los resultados correspondientes a los caracteres “cantidad de leche” y “cantidad de proteína” coinciden, en líneas generales, con lo que se acaba de describir para el análisis de varianza. Sin embargo, debemos subrayar que los valores de probabilidad no alcanzaron el nivel de significación del 5%, aunque sí fueron próximos al mismo. También es necesario recordar, que en el “análisis por intervalos” sólo se utilizaron, como parámetros, los “valores genéticos”.

En la Familia 6 parece existir un efecto para los caracteres *L* y *CP*, tal y como se refleja en las Figuras 31 y 32.

La zona del cromosoma en la que la probabilidad de que exista tal efecto es máxima, aparece representada por un pico en ambas figuras, y corresponde al intervalo entre los marcadores BM4311 y CSRD293.

Este resultado fue más evidente en el análisis no paramétrico (Figura 32), mediante el cual se alcanzaron unos valores de $P = 0,058$ para *VGCP* y $P = 0,103$ para *VGL*. Cuando se emplea el análisis de regresión (Figura 31), los valores de probabilidad que se obtienen son de $P = 0,088$ para *VGCP* y $P = 0,137$ para *VGL*.

Como se puede apreciar en ambas figuras, en el caso del carácter “porcentaje de proteína” no se encontraron resultados que permitieran sugerir la posible existencia de un efecto sobre el mismo en el cromosoma 6, por parte de ninguno de los dos análisis.

Figura 31. Distribución de los valores del $\log_{10}(1/p)$ a lo largo del cromosoma 6 en la Familia 6 (Análisis de regresión)

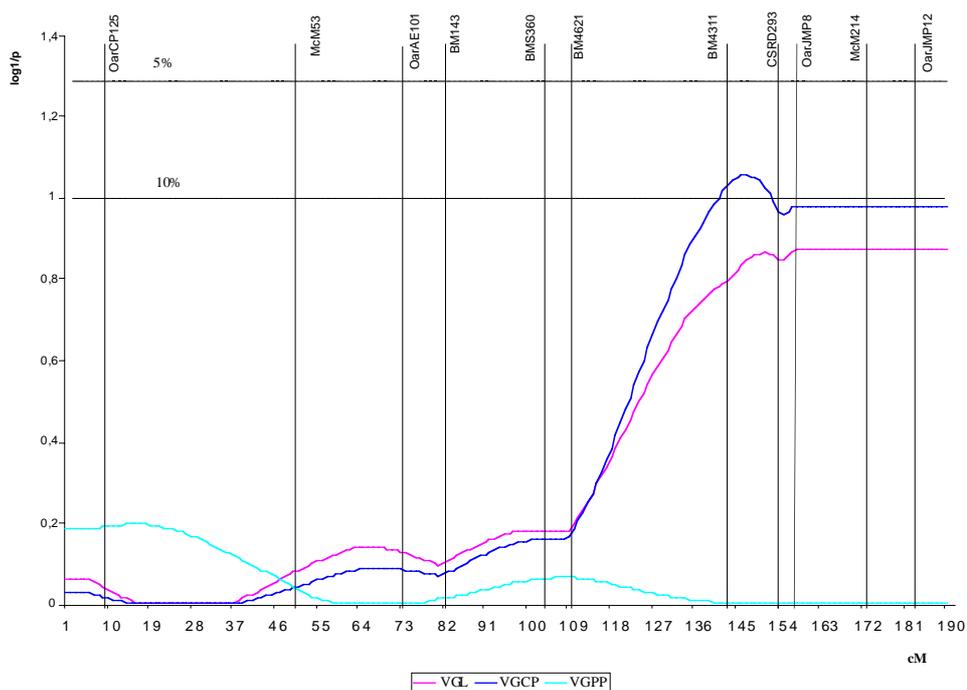
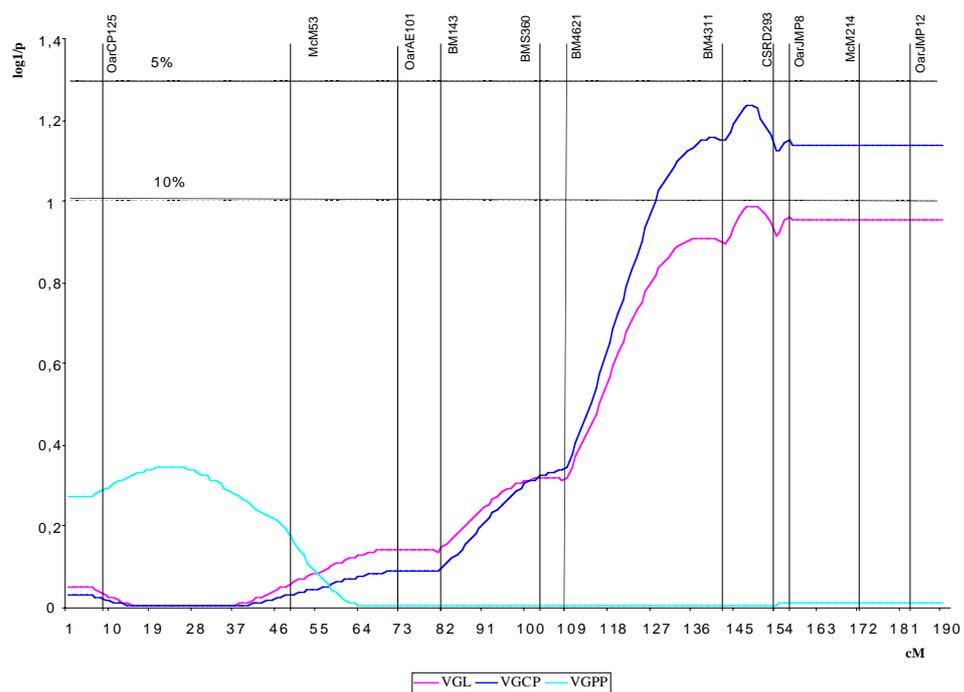


Figura 32. Distribución de los valores del $\log_{10}(1/p)$ a lo largo del cromosoma 6 en la Familia 6 (Análisis no paramétrico)



DISCUSIÓN

MARCADORES

1. VARIABILIDAD

De acuerdo con la clasificación establecida por BOTSTEIN *et al.* (1980), podemos considerar que todos los marcadores utilizados en el presente trabajo son altamente informativos, puesto que presentan valores de PIC superiores a 0,5. Este resultado coincide con lo esperado para secuencias de tipo microsatélite, que se caracterizan por presentar una variabilidad mayor que los marcadores genéticos clásicos.

Además, los valores de PIC obtenidos en nuestro estudio (entre 0,69 y 0,88) pueden considerarse medios o altos, en relación a los citados por otros autores para este mismo tipo de secuencias.

El contraste individual para cada marcador, con los PIC obtenidos por MADDOX *et al.* (1996), permite señalar que los valores obtenidos en la raza Churra son, en líneas generales, semejantes o más elevados a los estimados en el llamado rebaño IMF (*International Mapping Flock*), constituido por diferentes razas ovinas. Por otro lado, el número de alelos identificados en la raza Churra fue sensiblemente superior al citado por estos investigadores para los mismos marcadores. Así, el rango obtenido en nuestro caso fue de 8 a 19 alelos, según el marcador, lo que contrasta con el rango de 5 a 11 alelos identificados por MADDOX *et al.* (1996) para los mismos microsatélites considerados en nuestro estudio.

Es necesario tener en cuenta, que el muestreo efectuado en la raza Churra puede considerarse como muy representativo de la misma, al haberse realizado sobre un número relativamente elevado de alelos (entre 193 y 412, según el marcador). En el estudio de MADDOX *et al.* (1996), aunque el rebaño en estudio estaba constituido por varias razas, lo que implicaría mayor variabilidad genética, el número de individuos fundadores fue muy pequeño y el muestreo se realizó sobre familias de hermanos carnales, obtenidas después de varias generaciones de cruzamientos consanguíneos, lo que limitaría el número de alelos identificados.

Con respecto a las distribuciones alélicas de cada marcador (Figuras pares, 6 a 26), éstas presentaron diferentes modelos, siendo unimodales en algún caso, pero más complejas en general. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores, para las secuencias de tipo microsatélite, en diferentes especies como la humana (EDWARDS *et al.*, 1992) o la bovina (MOAZAMI-GOUDARZI *et al.*, 1994; ARRANZ *et al.*, 1996).

La heterogeneidad propia de las distribuciones alélicas en los microsatélites se puede explicar, en parte, por la complejidad de los mecanismos que determinan su variabilidad.

Algunos autores, como DI RIENZO *et al.* (1994), sugieren que los procesos mutacionales de las secuencias de tipo microsatélite seguirían el llamado modelo de “mutación en dos fases”. Este modelo propone que la mayoría de las mutaciones surgirían mediante cambios pequeños (incrementos o pérdidas de una unidad iterativa), y que un reducido número se debería a cambios grandes, es decir, que afectasen a un elevado número de repeticiones.

Por otra parte, los estudios realizados por WIERDL *et al.* (1997) en levaduras, han demostrado que, tanto las tasas de mutación de los microsatélites, como los modelos que siguen difieren, no sólo en función del tipo de repetición, sino también en función del locus (para repeticiones del mismo tipo) e incluso en función del alelo (dentro de un mismo locus).

En nuestro estudio, para la mayoría de los marcadores, se encontraron uno o un número muy reducido de alelos, que predominaron claramente sobre el resto. CHAKRABORTY *et al.* (1991) sugieren que existiría una relación entre la frecuencia de los alelos y su antigüedad evolutiva, de forma que los más frecuentes serían probablemente los más antiguos, habiendo surgido el resto por mutación, mediante procesos de inserción-delección. Sin embargo, considerando que nuestro análisis se centró en una sola raza, es difícil extraer conclusiones en relación con los posibles orígenes de los alelos.

Además, es necesario tener en cuenta que el manejo reproductivo de las poblaciones ganaderas implica la utilización de un número limitado de sementales, lo que determina un efecto importante de deriva génica. Este efecto es particularmente acusado en el ganado ovino cuando se utiliza monta natural. En el caso concreto de nuestro estudio, la estimación de los parámetros de variabilidad se realizó en base a los alelos procedentes de las madres, en su mayoría hijas de moruecos utilizados en monta natural.

2. INDIVIDUOS INFORMATIVOS

El porcentaje de hijas cuyo alelo paterno pudo ser identificado en la práctica en el estudio de detección de QTLs (hijas informativas), mostró una relación con el valor del contenido de información del polimorfismo (PIC), obtenido para cada marcador.

Este resultado coincide con lo esperado, teniendo en cuenta que el parámetro PIC refleja la variabilidad del microsatélite en la población. Así, el marcador BM4621, cuyo valor de PIC resultó el más elevado (87,9%), fue también el que permitió obtener un mayor porcentaje de hijas informativas (88,2%). En el extremo opuesto, las secuencias McM53, BM143 y OarJMP8 presentaron valores bajos dentro del rango obtenido, para ambos parámetros.

Es necesario indicar que el porcentaje de hijas informativas se encuentra sometido a un efecto de muestreo importante. De esta forma, el hecho de que un padre presente, para un marcador concreto, alelos más o menos comunes en la población, puede incidir de forma muy notable sobre el porcentaje de hijas que resultan ser informativas. Como ejemplo de este efecto de muestreo, podemos citar el caso del microsatélite OarCP125. Tres de los seis padres heterocigóticos para esta secuencia (Familias 6, 7 y 8) presentaban en sus genotipos alelos de elevada frecuencia en la población, mientras que en los otros tres (Familias 2, 3 y 5) al menos un alelo no era muy común. Como consecuencia, los porcentajes de hijas que resultaron informativas en cada familia, fueron claramente superiores en las tres primeras citadas respecto a las últimas.

El porcentaje de hijas que resultaron informativas, prescindiendo de la información procedente de la madre, osciló entre un 73% y un 86%, según el marcador. Si bien estos valores fueron ligeramente inferiores, con respecto a los globales (78%-88%), se pudo observar un paralelismo entre ambos.

No obstante, estos resultados no pueden considerarse representativos, ya que han sido pocos los casos en que se disponía del genotipo de la madre.

Los datos particulares para cada familia y marcador mostraron que, incluso cuando los alelos del padre se encontraban entre los de mayor frecuencia de la población, el porcentaje de hijas en las que se pudo determinar el alelo paterno, sin la ayuda del genotipo materno, nunca fue inferior al 63%, llegando a alcanzar valores superiores al 95% en aquellos casos en que al menos uno de los alelos paternos era poco frecuente.

No obstante, la información procedente de las madres fue útil en el caso concreto de nuestro estudio, considerando el pequeño tamaño de la muestra poblacional disponible. De hecho, del conjunto de las hijas inicialmente no informativas, que poseían el dato genotípico de su madre, cerca del 80% se convirtieron en informativas gracias a esta información.

Teniendo en cuenta que la realización de un proyecto de estas características conlleva un elevado coste, tanto en términos económicos como de tiempo y trabajo, consideramos que, siempre que el tamaño de la población no constituya un factor limitante, la ganancia de información que supone el análisis de los genotipos maternos no compensa las pérdidas mencionadas.

3. MAPA DE LIGAMIENTO

Al comparar el mapa de ligamiento del cromosoma 6 elaborado para los 11 microsatélites incluidos en nuestro estudio, con el obtenido por MADDIX *et al.* (1996), se puede comprobar que el orden de estos 11 marcadores es coincidente y que las distancias alcanzan valores muy próximos en ambos casos.

No obstante, debido al diseño experimental de nuestro trabajo, el mapa obtenido corresponde exclusivamente a procesos meióticos observados en los machos, mientras que MADDIX *et al.* (1996) utilizan información tanto de machos como de hembras, elaborando un mapa promedio entre sexos ("sex averaged").

Es conocido que la frecuencia de sobrecruzamiento presenta variaciones entre ambos sexos en muchas especies. En el caso concreto del ganado ovino, CRAWFORD *et al.* (1995) encuentran un número más elevado de recombinaciones en machos que en hembras, para un 63% de los intervalos examinados, estimando que la longitud total del mapa de ligamiento es de 2413 cM en el caso de los machos y 1907 cM en el de las hembras. No obstante, estos resultados corresponden a un mapa aún incipiente, y pueden mostrar un sesgo, como consecuencia de la falta de homogeneidad en la distribución de los marcadores.

La longitud total del cromosoma 6 estimada en nuestro estudio fue de 149,5 cM. Este valor es comparable con los obtenidos por otros autores, teniendo en cuenta el número de marcadores empleado para su elaboración. Puede comprobarse como, a medida que se incrementa el número de marcadores en un cromosoma, también aumenta la longitud total estimada para el mismo, en virtud de una mayor eficiencia para detectar los fenómenos de recombinación. Por lo que se refiere al cromosoma 6, las longitudes calculadas por CRAWFORD *et al.* (1995), LORD *et al.* (1996) y MADDIX *et al.* (1996) fueron 128 cM, 154 cM y 158,2 cM, respectivamente, siendo 12, 35 y 42 el número de marcadores incluidos en los mapas correspondientes.

Puede apreciarse una diferencia notable de longitud entre el mapa obtenido en el presente estudio y el elaborado por CRAWFORD *et al.* (1995), a pesar de que el número de marcadores empleados es muy similar en ambos. Esta aparente discrepancia es debida a la incorporación en nuestro mapa de un microsatélite en posición centromérica, situado a unos 20 cM del primer marcador que aparece en el mapa de CRAWFORD *et al.* (1995).

En cuanto al número de meiosis informativas observadas en nuestro análisis, el valor medio por marcador fue de 285 (rango 193-412), muy superior a las 140 meiosis de promedio (rango 18-209), obtenidas por CRAWFORD *et al.* (1995), lo que indica que nuestro mapa ha sido elaborado con un número de observaciones muy elevado.

Finalmente, podemos señalar que los datos que reflejan el nivel de información del mapa de ligamiento obtenido, son indicativos de un alto grado de fiabilidad (KRUGLYAK y

LANDER, 1995b). La Figura 30 es ilustrativa a este respecto. En ella, se puede observar que el porcentaje de información supera el 50% en todos los puntos del mapa, a excepción del intervalo flanqueado por los marcadores OarCP125 y McM53, debido a la gran distancia existente entre ambos.

ESTUDIO DE DETECCIÓN DE QTLs

El estudio de detección de QTLs planteado en el presente trabajo ha sido realizado sobre la base de un “diseño hija”. Según las estimaciones realizadas por WELLER *et al.* (1990) la potencia estadística alcanzada mediante el “diseño hija” es muy inferior a la obtenida utilizando el “diseño nieta”, para un mismo número de genotipos analizados. No obstante, también consideran que la elección del diseño experimental depende, en gran medida, de la población de que se disponga para la realización del estudio. Así, en relación a la especie bovina, el “diseño nieta” sería adecuado en los sistemas productivos basados en la existencia de sementales de elite con un gran número de hijos, que son valorados genéticamente mediante pruebas de descendencia. Por otra parte, el “diseño hija” tendría aplicación en los sistemas que evalúan anualmente un número reducido de sementales y que cuentan con grandes rebaños relativamente próximos entre sí.

El ganado ovino de producción lechera se encontraría más próximo a esta última situación por lo que, en general, el “diseño hija” se adapta mejor a las condiciones particulares de las poblaciones, cuando se plantea un experimento de detección de QTLs.

En el caso concreto de nuestro estudio, el “diseño hija” era el único posible, teniendo en cuenta que la población considerada pertenece a una raza ovina, la Churra, cuyo esquema de selección era muy reciente, no siendo posible disponer de abuelos de elite, padres a su vez de sementales con un elevado número de hijas, según requiere la aplicación del “diseño abuelo”.

Las ocho familias empleadas corresponden a las primeras etapas del esquema de selección, lo que ha repercutido de manera sustancial en el número de hijas disponibles por cada semental. Este esquema se inició en 1986, realizándose la primera valoración de sementales en 1991. Siete de los padres analizados, nacidos en 1985 (Padres 1, 2 y 3) o 1986 (Padres 4, 5, 6 y 7), proceden de esta primera valoración. El Padre 8, nacido en 1987, fue evaluado en 1992.

Las diez explotaciones seleccionadas para la realización del presente trabajo, concentraban, en su conjunto, un elevado porcentaje de las hijas de los sementales considerados. En el momento de realizar la toma de muestras, la mayor parte de las hijas correspondientes al periodo de valoración (1987-1990), no se encontraban en el rebaño. De hecho, del total de hijas incluidas en el estudio, menos del 6% nacieron durante el mencionado periodo. Las

hembras restantes son posteriores a la valoración (1991-1994), correspondiendo un 45% del total al año 1992.

El número de registros con que cuentan estas hembras para los caracteres productivos analizados es variable. Las ovejas suelen ser inseminadas entre los 12 y los 16 meses de edad, lo que significa que la primera lactación tendrá lugar entre el año y medio y los dos años. Así, en el caso de las hembras nacidas en 1994, los primeros datos productivos registrados corresponden a los años 1995 y 1996. En el extremo opuesto, un reducido número de ovejas cuentan con datos procedentes de hasta 10 lactaciones.

En cuanto a los caracteres considerados, cabe resaltar que el estudio referente a la cantidad de leche producida, se ha llevado a cabo a partir de los valores calculados para la “leche ordeñada”, y no a partir de los correspondientes a “leche total” (que sumaría la leche mamada y la ordeñada) . De acuerdo con los resultados de un trabajo previo realizado en nuestro departamento (FUERTES, 1997), las pérdidas de precisión, originadas a partir de los datos del control lechero, son mucho más acusadas para la estimación de la “leche total”, producida desde el parto, que para la “leche ordeñada” en el periodo post-destete, por lo que nos hemos decantado en favor de esta última variable a la hora de plantear el presente estudio.

1. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los dos tipos de estudios estadísticos empleados, el análisis de varianza para marcadores individuales y el análisis por intervalos, presentan unas claras diferencias metodológicas, por lo que su aplicación al presente estudio debe ser considerada desde perspectivas diferentes.

El análisis de varianza utiliza, exclusivamente, la información aportada por un marcador cada vez, tratando cada uno de los cálculos de manera independiente. En principio, los resultados obtenidos no han experimentado ningún tipo de corrección para análisis múltiples, lo que supone que sus condiciones son considerablemente permisivas. No obstante, asumiendo que el tamaño de la muestra disponible es reducido y que, por tanto, la potencia esperada en nuestro experimento es necesariamente baja, consideramos que la realización de un estudio de este tipo podría ser de utilidad, a la hora de detectar efectos asociados a los marcadores individuales, que podrían pasar desapercibidos utilizando un análisis más estricto.

Los parámetros empleados en el análisis de varianza incluyen, por un lado, los “valores genéticos” de los animales para cada carácter, obtenidos mediante un método BLUP (Modelo Animal) empleando medidas repetidas y, por otro, los “valores fenotípicos”, estimados en cada control o lactación, según el carácter. En el primer caso, el tamaño de la muestra coincide con el número de hijas informativas para el conjunto de los marcadores. En el segundo, la muestra está constituida por las observaciones individuales de cada control o lactación.

En cualquier caso, los grupos de contraste se establecen en función del alelo paterno heredado por el individuo correspondiente.

En cuanto al análisis por intervalos, el modelo utilizado en el presente estudio emplea unas condiciones más restrictivas. Es necesario subrayar que su diseño está orientado, en principio, a la detección de QTLs en ganado vacuno, especie en la que el tamaño de las familias no es, generalmente, un factor limitante de la potencia estadística del experimento. Los resultados que se obtienen aparecen corregidos para el empleo de un mapa de ligamiento, por lo que el nivel de seguridad en los efectos que resultan significativos es más elevado. Para la realización del análisis por intervalos se han empleado, como variables, los “valores genéticos”.

La comparación entre los resultados procedentes de cada uno de los análisis estadísticos planteados, se encuentra limitada por distintos factores:

En primer lugar, cada una de las pruebas incluye un número de observaciones diferente. En el caso del análisis de varianza, el tamaño muestral varía entre los dos tipos de contrastes realizados, basados respectivamente en la utilización de los “valores genéticos” y de los “valores fenotípicos”.

El análisis de varianza también se diferencia del análisis por intervalos (empleando en ambos casos los datos del “valor genético”), en lo que respecta a la información utilizada por cada uno de ellos. Así, mientras que el primero efectúa una prueba independiente para cada marcador, el segundo incorpora, como referencia, el mapa de ligamiento de los marcadores considerados. De este modo, incluso las hijas de genotipo igual al paterno, aportan un cierto nivel de información que es aprovechada en el análisis por intervalos, pero que no es tenida en cuenta en el análisis de varianza.

Otro factor que afecta a la comparación de resultados se refiere a que el análisis de varianza y el análisis por intervalos son pruebas estadísticas diferentes, cada una de las cuales emplea una distribución de probabilidad particular. Esto significa que los valores críticos, para obtener un nivel de significación determinado, son distintos en cada uno de ellos. En el caso del análisis por intervalos utilizado en nuestro estudio, los valores críticos fueron calculados empíricamente mediante un sistema de permutaciones (CHURCHILL y DOERGE, 1994).

Por último, mientras que en el análisis de varianza se asume que todos los cálculos son independientes, el análisis por intervalos tiene en cuenta la información referente al grado de ligamiento de los marcadores, lo que significa que, en la práctica, los valores obtenidos por este último han experimentado una corrección para el número de marcadores empleados. A excepción de este último caso, los resultados que se presentan no han sido corregidos para el empleo de test múltiples.

Algunos autores, como LANDER y KRUGLYAK (1996), creen que los valores P nominales (o sus equivalentes, valores Z y “lod-scores”) deben ser corregidos para un análisis del genoma completo, independientemente de que este análisis vaya a ser realizado o no. Otros investigadores como WITTE *et al.* (1996) o CURTIS (1996) critican ampliamente estas sugerencias por considerarlas demasiado estrictas. En su opinión, el establecimiento de umbrales tiene sentido únicamente como referencia para interpretar los resultados obtenidos, pero no para aceptarlos o rechazarlos con rotundidad.

A continuación se comentarán los resultados de cada uno de los análisis efectuados, por un lado, para los caracteres “cantidad de leche” y “cantidad de proteína” y, por otro, para el carácter “porcentaje de proteína”.

2. CARACTERES “CANTIDAD DE LECHE” Y “CANTIDAD DE PROTEÍNA”

En nuestro estudio, se evidenció un paralelismo en los datos obtenidos para los caracteres “cantidad de leche” (*L*) y “cantidad de proteína” (*CP*), lo que concuerda con la correlación existente entre ambos.

De acuerdo con los resultados expuestos en las Tablas 17 a 20, el análisis de varianza, realizado para marcadores individuales del cromosoma 6 ovino, puso de manifiesto la asociación entre algunos de estos marcadores y los caracteres *L* y *CP*.

En primer lugar, la secuencia BM4621 mostró una asociación significativa con *VFL* y con *VFCP*, en la Familia 5. Los valores de P obtenidos en el análisis de varianza para *VGL* y *VGCP* no fueron significativos, aunque sí fueron relativamente bajos, especialmente en el caso de *VGL*.

El análisis por intervalos, no evidenció ninguna asociación significativa para este microsatélite, lo que no resulta extraño, teniendo en cuenta que el parámetro considerado en el mismo es el “valor genético”, para el cual el análisis de varianza tampoco ha detectado asociaciones significativas.

Por otra parte, el marcador más cercano a BM4621 es la secuencia BMS360, situado a tan sólo 5,4 cM en posición centromérica, según los datos del mapa elaborado en el presente trabajo (Figura 29), y a 7 cM, en la misma posición, de acuerdo con MADDIX *et al.* (1996) (Figura 5). Parece lógico pensar que los efectos detectados en el análisis de varianza, para BM4621, se deberían reflejar también en el marcador BMS360 lo que, en la práctica, no sucede.

Por lo tanto, los datos obtenidos para BM4621 no muestran una consistencia que nos permita sugerir la posible presencia de un QTL con influencia sobre las cantidades de leche y proteína en la región donde se localiza este marcador.

En segundo lugar, nuestros resultados muestran la existencia de asociaciones significativas para tres marcadores, cuya situación en el mapa de ligamiento es muy próxima. Se trata de las secuencias BM4311, CSRD293, y OarJMP8. Aunque las distancias entre estos microsatélites no aparecen indicadas con valores precisos en el mapa presentado por MADDOX *et al.* (1996) (Figura 5), los cálculos realizados en nuestro estudio indican que BM4311 se encuentra a 9,7 cM de CSRD293, y que entre este último marcador y OarJMP8 la separación es de 2,8 cM (Figura 29). Esto significa que las tres secuencias se hallan en un intervalo de, aproximadamente, 12 cM. Por ello, resulta razonable que cualquier efecto evidenciado en esa región cromosómica aparezca asociado, de forma paralela, a los tres marcadores.

Los resultados del análisis de varianza (Tablas 17 a 20) muestran la existencia de asociaciones significativas con los caracteres *L* o *CP*, para al menos una de las tres secuencias citadas, en las Familias 1, 2 y 6, correspondiendo a esta última los datos más relevantes.

En el caso de las Familias 1 y 2, estos resultados no presentan una elevada consistencia. Por una parte, sólo se detectan asociaciones significativas en casos aislados, que no se reflejan en marcadores adyacentes, y que tampoco muestran un paralelismo entre las variables “valor fenotípico” y “valor genético”. Además, ambas familias tienen un tamaño reducido (tan sólo 38 individuos en cada una de ellas), lo que constituye en sí un factor limitante de la potencia del análisis.

Sin embargo, los obtenidos en la Familia 6, que cuenta con 86 miembros, parecen poner de manifiesto la presencia de un QTL con influencia sobre las cantidades de leche y proteína producidas, en la región donde se ubican los marcadores BM4311, CSRD293 y OarJMP8. Los resultados del análisis de varianza, para los caracteres *L* y *CP*, en la Familia 6, se resumen en la Tabla 23. Como se puede observar, todos los valores obtenidos para las variables de los caracteres *L* y *CP* fueron significativos, o muy próximos al nivel de significación del 5%.

Además, el análisis por intervalos parece corroborar estos resultados. Tal y como reflejan las Figuras 31 y 32, existe un pico en la curva de distribución de los valores del $\log_{10}(1/P)$, a nivel de las secuencias BM4311 y CSRD293.

Es necesario señalar que los valores obtenidos en el análisis por intervalos no llegan a alcanzar en ningún caso el nivel de significación del 5%, ni a partir del análisis de regresión, ni mediante el análisis no paramétrico.

No obstante, la forma de las mencionadas curvas de distribución muestra la tendencia que existe en ambos casos. En relación a los caracteres que nos ocupan, el nivel de significación alcanzado fue ligeramente inferior al 5% para la cantidad de proteína, mientras que para la cantidad de leche no se superó el umbral del 10%.

Tabla 23. Valores de probabilidad (P) para los caracteres “cantidad de leche” (L) y “cantidad de proteína” (CP), en la Familia 6

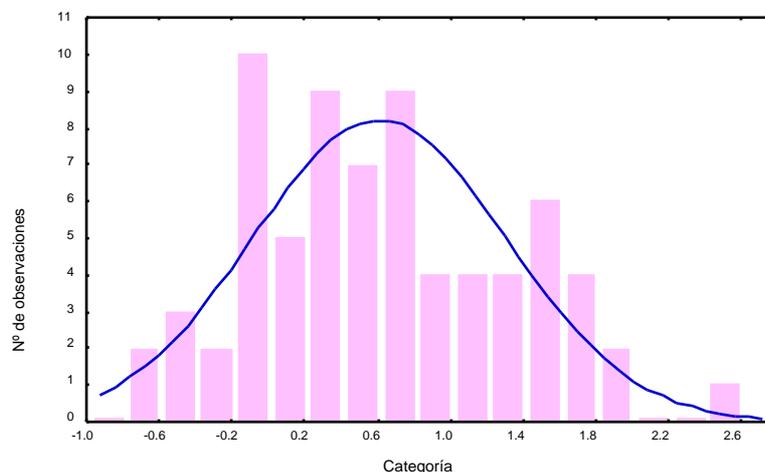
Familia 6			
Parámetro	Marcador	L	CP
<i>Valor genético</i>	BM4311	0,0145*	0,0159*
	CSRD293	0,0314*	0,0427*
	OarJMP8	0,0077**	0,0173*
<i>Valor fenotípico</i>	BM4311	0,0283*	0,0318*
	CSRD293	0,0448*	0,0716
	OarJMP8	0,0203*	0,0561

* P < 0,05 ** P < 0,01

Comparativamente, el análisis no paramétrico parece más eficaz para la detección de un posible efecto en las condiciones particulares de nuestro estudio. Este fenómeno podría estar relacionado con el hecho de que las curvas de distribución de estos caracteres, en cada familia, muestran una cierta desviación con respecto a la normalidad, como pudimos comprobar al observar las representaciones gráficas correspondientes. Como ejemplo ilustrativo, en la Figura 33 se muestra la gráfica obtenida para el carácter CP en la Familia 6. A diferencia del análisis de regresión, el análisis no paramétrico no asume, *a priori*, que las curvas son normales, lo que podría explicar las diferencias obtenidas mediante ambos tipos de análisis.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, creemos que nuestros resultados indican la existencia de un segmento cromosómico con influencia, tanto sobre la cantidad de leche, como sobre la cantidad de proteína producidas, en la región donde se localizan los marcadores BM4311, CSRD293 y OarJMP8.

Figura 33. Distribución del carácter “cantidad de proteína” (CP) en la Familia 6



No se conocen estudios, realizados en la oveja, acerca de la detección de QTLs que afecten a caracteres relacionados con la producción láctea, por lo que no es posible relacionar nuestros resultados, con otras investigaciones similares en la misma especie. No obstante, existen diversos experimentos, realizados en la especie bovina que pueden ser analizados desde un punto de vista comparativo.

De acuerdo con la nomenclatura sugerida por O'BRIEN *et al.* (1993), el establecimiento de homologías entre los mapas genéticos de distintas especies puede realizarse en función de la posición de dos tipos de marcadores, los de Tipo I, que englobarían a los genes codificadores y los de Tipo II, cuyos principales representantes son los microsatélites.

La posición cromosómica de los marcadores de Tipo I muestra un elevado grado de conservación entre especies, incluso evolutivamente distantes. En el caso de los marcadores de Tipo II, esta conservación afecta de un modo preferente a las especies evolutivamente próximas, lo que ha quedado plenamente demostrado en el caso de los bóvidos. De hecho, el denominado mapa de ligamiento ovino de segunda generación (DE GORTARI *et al.*, 1998), ha sido elaborado fundamentalmente mediante microsatélites aislados a partir de genotecas bovinas.

La Figura 34 muestra una comparación de los mapas de ligamiento de los cromosomas 6 ovino y bovino, incluyendo únicamente los marcadores más importantes (LORD *et al.*, 1996). En virtud de la conservación de los microsatélites, cabría esperar que las relaciones de ligamiento entre éstos y los genes se mantuvieran, asimismo, en ambas especies.

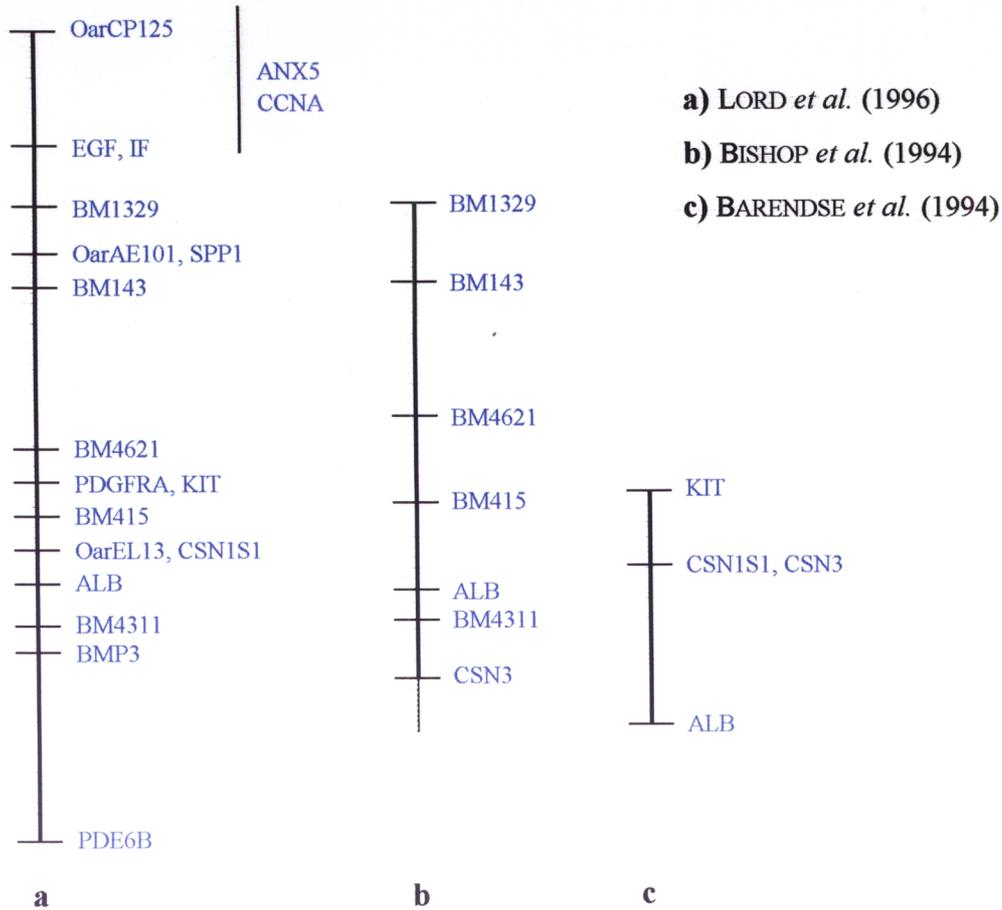
Consecuentemente, cualquier información acerca de la localización de QTLs en el ganado vacuno, constituye una referencia que es necesario considerar a la hora de analizar los resultados obtenidos.

Una de las regiones cromosómicas más interesantes, desde el punto de vista de la producción láctea, es aquella donde se localizan los genes de las caseínas. Al observar la Figura 34 se puede apreciar, en el mapa de ligamiento ovino, la posición del locus *CSN1S1* (caseína α S1), y en el bovino, las estimadas en dos experimentos diferentes para *CSN3* (caseína κ) y *CSN1S1*.

Esta información indica cual es la localización aproximada de todos los genes de las caseínas, puesto que se ha demostrado que, en ambas especies, estos genes se encuentran estrechamente ligados, formando un "cluster". Además, queda patente que estos loci se encuentran próximos a la secuencia BM4311.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, indican la posible asociación de los microsatélites BM4311, CSRD293 y OarJMP8, con los caracteres "cantidad de leche" y "cantidad de proteína", por lo que las caseínas se convierten, a nuestro juicio, en los candidatos principales a producir los efectos detectados.

Figura 34. Comparación de los mapas de ligamiento del cromosoma 6 ovino (**a**) y bovino (**b** y **c**) (Tomado de LORD *et al.*, 1996)



Es necesario comentar que, en lo que se refiere a los caracteres de producción láctea, el papel de las caseínas en el origen de posibles diferencias cuantitativas entre individuos no es bien conocido. En el caso de la especie ovina, aunque han sido detectados polimorfismos de tipo RFLP en las secuencias codificadoras de los genes de las caseínas, no se conocen estudios que relacionen la presencia de una determinada variante con algún carácter productivo particular.

Por otra parte, los resultados de los diferentes estudios llevados a cabo en la especie bovina parecen poco consistentes, incluso contradictorios entre sí, a la hora de relacionar una determinada forma alélica de las caseínas con los parámetros de producción láctea. LIEN *et al.* (1995) estiman que estas diferencias se deben a que las mutaciones responsables de los efectos detectados no se localizan en las regiones codificadoras, sino en las reguladoras.

Otros experimentos, realizados en el ganado vacuno, muestran también la asociación de la región de las caseínas con parámetros de producción láctea. Este es el caso de los estudios llevados a cabo por BOVENHUIS y WELLER (1994) (concentración de grasa de la leche), VELMALA *et al.* (1995) (cantidad de leche y porcentaje de grasa) y MOSIG *et al.* (1998) (porcentaje de proteína).

Por otra parte, la posible existencia de QTLs que afectan simultáneamente a las cantidades de leche y proteína, ha sido descrita en otros cromosomas bovinos, como el cromosoma 9 (GEORGES *et al.*, 1995; VILKKI *et al.*, 1997) y el cromosoma 21 (RON *et al.*, 1994).

Nuestros resultados, que sugieren la presencia de una región, en el cromosoma 6 ovino, con un efecto paralelo sobre las cantidades de leche y proteína muestran, también en este aspecto, una concordancia con los obtenidos en el ganado bovino. Tal y como proponen GEORGES *et al.* (1995), un efecto de estas características podría estar relacionado con una modificación, bien en el número de células secretoras de la glándula mamaria, o bien en la producción media de cada una de estas células.

3. CARÁCTER “PORCENTAJE DE PROTEÍNA”

Los resultados más destacables obtenidos para el carácter *PP* (Tablas 21 y 22) corresponden al análisis de varianza realizado en base al parámetro “valor fenotípico”. Sin embargo, el análisis por intervalos no detectó ningún tipo de efecto sobre el porcentaje de proteína a lo largo del cromosoma 6 (Figuras 31 y 32).

Las diferencias observadas en el análisis de varianza cuando se utilizan los “valores fenotípicos” o los “valores genéticos” pueden explicarse, en parte, teniendo en cuenta el número de observaciones empleadas para cada una de estas variables. Como ya se ha comentado, la estimación del porcentaje de proteína se realiza en cada control productivo. Cada individuo es sometido a varios controles por lactación, lo que significa que el número de controles es más elevado que el número de lactaciones y, obviamente, muy superior al número de individuos. En el caso del “valor genético”, sin embargo, el número de observaciones coincide con el número de individuos informativos para el conjunto de los marcadores.

En este sentido, podría pensarse que los datos resultantes se deben, en mayor medida, a estas diferencias, que a la existencia de verdaderos efectos asociados a los marcadores correspondientes.

Sin embargo, como se comentará a lo largo de este apartado, resulta interesante comprobar que existe, en general, una coincidencia entre los microsatélites implicados, no sólo entre distintas familias incluidas en el estudio, sino también en relación a los resultados de diversos experimentos realizados en la especie bovina.

A continuación nos referiremos a los datos, a nuestro juicio, más interesantes, que aparecen para la variable *VFPP* en el análisis de varianza. En función de los mismos, es posible sospechar la influencia de una determinada región del cromosoma 6 ovino, sobre la expresión del carácter *PP*. Esta región se localizaría en el entorno de los marcadores OarAE101 y BM143, muy próximos entre sí en el mapa de ligamiento.

En la Tabla 24 se recogen los valores de probabilidad (P) obtenidos, tanto para *VFPP*, como para *VGPP*, en las Familias 2, 3, 4, 6 y 8 (los valores de $P < 0,10$ aparecen destacados). En todas estas familias se evidenció alguna asociación significativa o, al menos, algún valor de P próximo al nivel de significación del 5%, para OarAE101, para BM143, o para ambos.

Como se puede comprobar, para *VGPP* sólo se observan valores significativos, o no muy alejados del nivel de significación del 5%, en aquellas situaciones en que se alcanzaron niveles de significación más elevados para *VFPP*. Nos referimos concretamente a las Familias 6 y 8, en el caso de la secuencia BM143.

Destaca la Familia 6, en la cual el efecto asociado a BM143 alcanzó un nivel de significación muy elevado para *VFPP* ($P < 0,001$). No disponemos de información acerca del marcador OarAE101, puesto que el Padre 6 resultó homocigótico para el mismo.

Tabla 24. Valores de probabilidad (P) para el carácter “porcentaje de proteína” (PP)

Parámetro	Marcador	Familia				
		2	3	4	6	8
<i>Valor genético</i>	OarAE101	0,3352	0,3051	-	-	0,1262
	BM143	0,6863	0,4027	0,4571	0,0787	0,0452*
<i>Valor fenotípico</i>	OarAE101	0,0218*	0,0736	-	-	0,0268*
	BM143	0,0647	0,2082	0,0615	0,0009***	0,0020**

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

Tal y como muestra la Figura 34, la posición cromosómica de BM143 aparece conservada en los cromosomas 6 de las especies bovina y ovina. Por otra parte, tanto en el mapa de ligamiento ovino elaborado por MADDOX *et al.* (1996), como en el obtenido en el presente estudio, los marcadores BM143 y OarAE101 se encuentran a una distancia inferior a 10 cM.

Diversos estudios llevados a cabo en el ganado vacuno aportan resultados coincidentes, con respecto a la relación entre la región del cromosoma 6 donde se localiza el microsatélite BM143, y ciertos caracteres de producción láctea. Aunque los efectos detectados en esta zona presentan matices diferentes, los distintos investigadores parecen estar de acuerdo en atribuirlos a un único QTL.

GEORGES *et al.* (1995) encuentran que este QTL afectaría únicamente a la cantidad de leche producida, sin mostrar una influencia sobre las producciones de grasa y proteína. Así, un incremento en la producción de leche, se traduciría en un descenso en los porcentajes de grasa y proteína. Para explicar este efecto, sugirieron que la acción del QTL podría llevar a

una modificación de la presión osmótica de la leche, quizás a través de la secreción de lactosa. Este mismo resultado fue observado por KUHN *et al.* (1996), por MÄKI-TANILA *et al.* (1998) y por GÓMEZ-RAYA *et al.* (1998).

Por otra parte, en el caso de una de las familias analizadas por KUHN *et al.* (1996), el efecto asociado a esa región cromosómica afectaba conjuntamente a las cantidades de leche, grasa y proteína. Además, algunos autores como SPELMAN *et al.* (1996) y MOSIG *et al.* (1998) encuentran una asociación entre la región del marcador BM143 y el carácter porcentaje de proteína de la leche.

Teniendo en cuenta las homologías observadas en el mapa genético del cromosoma 6, entre las especies bovina y ovina, los resultados obtenidos en el ganado vacuno pueden hacer sospechar de la existencia de QTLs de características semejantes en el ganado ovino. Por ello, y a pesar de que el análisis por intervalos no detectó ningún tipo de efecto relacionado con el carácter “porcentaje de proteína” en esta zona, los resultados ofrecidos por el análisis de varianza no deben ser desechados con absoluta rotundidad.

Existe otra región cromosómica que también consideramos de interés, y que tiene como referencia los marcadores McM214 y CSR293. A este respecto, en la Familia 8 se detectaron asociaciones estadísticamente significativas con ambos microsatélites para el parámetro *VFPP* (Tabla 22). En esta familia, el microsatélite de posición intermedia entre los dos citados (OarJMP8) no fue analizado, debido a que el Padre 8 resultó homocigótico para el mismo. Para la secuencia BM4311, situada a unos 10 cM de CSR293 en posición centromérica, el valor de P fue inferior a 0,10. Sin embargo, estos datos no encuentran una correspondencia con los obtenidos para *VGPP* (Tabla 21).

MOSIG *et al.* (1998) sugieren la existencia de una segunda región en el cromosoma 6 bovino, con influencia sobre el carácter porcentaje de proteína. Se encontraría en la zona de localización de las caseínas, con un efecto asociado a los marcadores BM415 y *CSN3*.

Estos datos podrían presentar una relación con los obtenidos en la Familia 8 de nuestro estudio, mediante el análisis de varianza. No obstante, es necesario indicar que la posición de McM214 parece ser más telomérica que la región de las caseínas.

Finalmente, hemos de señalar que el análisis de varianza muestra asociaciones significativas con otros marcadores, situados en regiones cromosómicas distintas a las comentadas anteriormente (Tablas 21 y 22).

Por un lado, en el caso de la variable *VGPP*, se observa un valor significativo asociado al marcador OarCP125, en la Familia 7 (Tabla 21). Sin embargo, no se encontró un resultado paralelo para *VFPP*, y tampoco se evidenció en otras familias un efecto similar. Debido a todo ello, consideramos que pueda corresponder a un resultado del tipo “falso positivo”.

Por otro lado, los microsatélites McM53 y BMS360 mostraron un efecto asociado para *VFPP*, en la Familia 5. Estos datos no se reflejan en ninguno de los marcadores adyacentes, alguno de ellos muy próximo, por lo que creemos que al igual que en el caso anterior, nos encontramos ante “falsos positivos”.

Como **COMENTARIO GENERAL** a la información derivada de nuestro estudio, consideramos que los resultados obtenidos permiten sugerir la presencia de QTLs con influencia sobre la producción láctea, en el cromosoma 6 ovino. Para confirmar estos datos, sería necesario ampliar los análisis, incorporando familias con un número más elevado de individuos, con objeto de incrementar la potencia estadística que ha sido, a nuestro juicio, el principal factor limitante del presente trabajo.

CONCLUSIONES

Primera

Los resultados obtenidos parecen indicar la presencia de un QTL con influencia, tanto sobre la cantidad de leche, como sobre la cantidad de proteína, en el cromosoma 6 ovino. La localización más probable de este QTL sería la región donde se encuentran los loci microsatélites BM4311, CSRD293 y OarJMP8. En esta misma zona han sido ubicados los loci determinantes de las caseínas ovinas, lo que permite sospechar la posible implicación de estos genes en los resultados presentados.

Segunda

El análisis de varianza, realizado para marcadores individuales, parece sugerir la existencia de una región cromosómica, al menos, que podría tener una influencia sobre el porcentaje de proteína de la leche y que se encontraría en la zona de ubicación de los marcadores OarAE101 y BM143.

Aunque estos efectos no fueron evidenciados mediante el análisis por intervalos, sí muestran una coincidencia con lo obtenido por otros autores, en la región homóloga del cromosoma 6 bovino, lo que concuerda con el elevado grado de conservación de las secuencias de DNA entre especies evolutivamente próximas.

RESUMEN

El objetivo planteado en el presente estudio se centró en el análisis de la presencia de QTLs implicados en caracteres de producción láctea, en el cromosoma 6 ovino, utilizando como marcadores genéticos secuencias de tipo microsatélite.

El experimento consistió en la aplicación de un “diseño hija”, utilizando ocho familias de medio-hermanas, pertenecientes a diez explotaciones del núcleo de selección de la raza Churra. Los animales incluidos en el estudio fueron los ocho padres, sus hijas respectivas y, en todos los casos en que fue posible, las madres de éstas. En conjunto, se analizaron 810 animales.

Los marcadores seleccionados fueron doce microsatélites localizados en el cromosoma 6 ovino, uno de los cuales fue descartado debido a la existencia de alelos nulos en la población. En cada familia, se analizó la dotación alélica de todas las hembras cuyo padre resultó heterocigótico para un marcador determinado. Fueron excluidas del estudio aquellas que mostraron incompatibilidad alélica con el padre asignado. El número de hijas de paternidad comprobada ascendió a 467.

Los caracteres analizados fueron la cantidad de leche, la cantidad de proteína y el porcentaje de proteína. Las variables consideradas para cada carácter fueron los “valores genéticos”, estimados mediante el método BLUP (Modelo Animal), y los “valores fenotípicos”, obtenidos a partir de los datos del control lechero oficial.

Se realizaron dos tipos de análisis estadísticos: el primero, un análisis de varianza, empleando marcadores individuales, y el segundo, un análisis por intervalos (*interval mapping*), tomando como base el mapa de ligamiento. Esta última prueba fue efectuada mediante dos aplicaciones diferentes: un análisis de regresión y un análisis no paramétrico.

Nuestros datos muestran una elevada variabilidad de los marcadores utilizados en la población analizada. Esta variación se manifestó, tanto en el número de alelos identificados para cada marcador, como en los valores estimados para el parámetro PIC (contenido de in-

formación del polimorfismo). En cuanto a las distribuciones alélicas de cada marcador, fueron complejas, encontrándose normalmente uno o muy pocos alelos con una frecuencia marcadamente superior a la del resto, lo que podría deberse, en parte, al efecto del número limitado de sementales que suelen emplearse en las poblaciones ganaderas.

El porcentaje de las hijas en las que se identificó el alelo de origen paterno (hijas informativas) osciló entre el 78% y el 88%. El mapa de ligamiento elaborado en base a estos datos, mostró una correspondencia elevada con los obtenidos por otros autores, tanto en el orden de los 11 marcadores, como en las distancias estimadas entre ellos.

En cuanto al estudio de detección de QTLs, los resultados de los dos tipos de análisis estadísticos realizados, indican la posible segregación de un QTL, con influencia sobre las cantidades de leche y proteína, en una de las familias analizadas. Los marcadores asociados a los efectos detectados (BM4311, CSRD293 y OarJMP8), se encuentran en la región donde han sido ubicados los genes de las caseínas, lo que sugiere la posible implicación de los mismos en los efectos mencionados.

Por otra parte, el análisis de varianza señala la posible existencia de una relación entre el porcentaje de proteína y la región cromosómica donde se ubican los marcadores OarAE101 y BM143. Estos resultados se observan para varias familias, y se obtienen, fundamentalmente, cuando se emplea como parámetro el “valor fenotípico”. La región mencionada es homóloga a la descrita por diversos autores, en la especie bovina, como implicada en la expresión de caracteres de producción láctea.

SUMMARY

The purpose of this study was the detection of QTLs affecting milk production on ovine chromosome 6, using microsatellite markers.

The experiment was carried out following a daughter design, using eight half-sib families from the selection nucleus of Churra dairy sheep. 810 animals, including the eight sires, their daughters and, whenever possible, their dams were analysed.

Twelve microsatellite markers, located on chromosome 6 were studied. One of them was discarded due to the presence of null alleles in the population. Within each family, ewes from heterozygous sires for a specific marker were genotyped. All the females showing allelic incompatibilities with their putative sire were excluded from the study. The total number of paternity tested daughters was 467.

The traits analysed were milk yield, protein yield and protein percentage. For each trait, “estimated breeding values” (BLUP values predicted using the animal model) as well as “phenotypic values”, obtained from the official control records, were considered.

Two different statistical analyses were performed. The first one was an analysis of variance, using one marker at a time. The second one was an “interval mapping” procedure, using a linkage map. Interval mapping was performed by means of two applications: a multi-marker regression analysis and a non parametric approach.

Our data indicated a high variability of the markers in the population, evidenced by both, the high number of alleles identified and the high polymorphism information content (PIC) values estimated.

The allelic distributions for each marker, were complex, showing usually one or a few alleles with a frequency clearly higher than the others. Those patterns might be partially attributed to the limited number of sires normally used in livestock populations.

The allele inherited from the sire could be unequivocally identified in a high proportion of the daughters (78%-88%). The linkage map constructed on the basis of this data was similar to the maps reported by other authors both in the order of the 11 markers as well as in the distances among them.

Results from the two statistical approaches used showed the possible segregation of a QTL, affecting milk and protein yield, in one of the families analysed. These effects are associated to three markers (BM4311, CSRD293 and OarJMP8), located in the same region than the casein genes, suggesting their possible implication.

Furthermore, the variance analysis indicated the possible relationship between protein percentage and the markers OarAE101 and BM143. These results were obtained in several families, especially when the variable used was the "phenotypic value". Other authors have implicated the homologous bovine region in the expression of different milk traits.

BIBLIOGRAFÍA

ANDERSSON, L. (1996). Mapping genes influencing meat characteristics in pigs. En: *XXth Biotechnology's role in the genetic improvement of farm animals (Beltsville Symposia in Agricultural Research)*, 276-281. Ed. R. H. Miller, V. G. Pursel & H. D. Norman. American Society of Animal Science. Savoy. Illinois. USA.

ANDERSSON, L., HALEY, C. S., ELLEGREN, H., KNOTT, S. A., JOHANSSON, M., ANDERSSON, K., ANDERSSON-EKLUND, L., EDFORS-LILJA, I., FREDHOLM, M., HANSSON, I., HÅKANSSON, J. & LUNDSTRÖM, K. (1994). Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science* **263**: 1771-1774.

ANDERSSON-EKLUND, L. & RENDEL, J. (1993). Linkage between amylase-1 locus and a major gene for milk fat content in cattle. *Anim. Genet.* **24**: 101-103.

ANSARI, H. A., PEARCE, P. D., MAHER, D. W., MALCOM, A. A., WOOD, N. J., PHUA, S. H. & BROAD, T. E. (1992). Resolving ambiguities in the sheep karyotype: a molecular cytogenetic approach. En: *Proceedings of the 10th European Colloquium on the Cytogenetics of Domestic Animals*, 21-25. Utrech.

ARCHIBALD, A. L., HALEY, C. S., ANDERSSON, L., GUSTAVSSON, I., BOSMA, A., DAVIES, W., FREDHOLM, M., GELDERMANN, H., GELLIN, J., GROENEN, M., OLLIVIER, L., TUCKER, E. M. & VAN DE WEGHE, A. (1991a). PigMap: an European initiative to map the porcine genome. *Anim. Genet.* **22**: 82-83.

ARCHIBALD, A. L., HALEY, C. S., BROWN, J. F., COUPERWHITE, S., MCQUEEN, H. A., NICHOLSON, D., COPPIETERS, W., VAN DE WEGHE, A., STRATIL, A., WINTERO, A. K., FREDHOLM, M., LARSEN, N. J., NIELSEN, V. H., MILAN, D., WOLOSZYN, N. ROBIC, A., DALENS, M., RIQUET, J., GELLIN, J., CARITEZ, J. -C., BURGAUD, G., OLLIVIER, L., BIDANEL, J. P., VAIMAN, M., RENARD, C., GELDERMANN, H., DAVOLI, R., RUYTER, D., VERSTEGE, E. J. M., GROENEN, M. A. M., DAVIES, W., HEYHEIM, B., KEISERUD, A., ANDERSSON, L., ELLEGREN, H., JOHANSSON, M., MARKLUND, L., MILLER, J. R., ANDERSON DEAR, D. V., SIGNER, E., JEFFREYS, A. J., MORAN, C., LE TISSIER MULADNO, P., ROTHSCHILD, M. F., TUGGLE, C. K., VASKE, D., HELM, J., LIU, H. - C., RAHMAN, A., YU, T. -P., LARSON, R. G. & SCHMITZ, C. B. (1991b). The PigMap consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*). *Mamm. Genome* **6**: 157-175.

ARRANZ, J. J., BAYÓN, Y. & SAN PRIMITIVO, F. (1996). Genetic variation at five microsatellite loci in four breeds of cattle. *J. Agric. Sci.* **127**: 533-538.

ASHWELL, M. S., REXROAD, C. E. JR, MILLER R. H., VANRADEN, P. M. & DA, Y. (1997). Detection of loci affecting milk production and health traits in an elite US Holstein population using microsatellite markers. *Anim. Genet.* **28**: 216-222.

BARENDSE, W., ARMITAGE, S. M., KOSSAREK, L. M., SHALOM, A., KIRKPATRICK, B. W., RYAN, A. M., CLAYTON, D., LI, L., NEIBERGS, H. L., ZHANG, N., GROSSE, W. M., WEISS, J., CREIGHTON, P., MCCARTHY, F., RON, M., TEALE, A. J., FRIES, R., MCGRAW, R. A., MOORE, S. S., GEORGES, M., SOLLER, M., WOMACK, J. E. & HETZEL D. J. S. (1994). A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genet.* **6**: 227-235.

BECKMANN, J. S. & SOLLER, M. (1983). Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theor. Appl. Genet.* **67**: 35-43.

BECKMANN, J. S. & SOLLER, M. (1988). Detection of linkage between marker loci and loci affecting quantitative traits in crosses between segregating populations. *Theor. Appl. Genet.* **76**: 228-236.

BECKMANN, J. S. & SOLLER, M. (1990). Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Biotechnology* **8**: 930-932.

BECKMANN, J. S. & WEBER, J. L. (1992). Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* **12**: 627-631.

BEEVER, J. E., GEORGE, P. D., FERNANDO, R. L., STORMONT, C. J. & LEWIN, H. A. (1990). Associations between genetic markers and growth and carcass traits in a paternal half-sib family of Angus cattle. *J. Anim. Sci.* **68**: 337-344.

BISHOP, M. D., KAPPES, S. M., KEELE, J. W., STONE, R. T., SUNDEN, S. L. F., HAWKINS, G. A., SOLINAS TOLDO, S., FRIES, R., GROSZ, M. D., YOO, J. & BEATTIE, C. W. (1994). A genetic linkage map for cattle. *Genetics* **136**: 619-639.

BLAIR, H. T. (1990). Inheritance of a major gene for excessively lustrous wool in sheep. *J. Hered.* **81**: 220-222.

BLATTMAN, A. N., KIRKPATRICK, B. W. & GREGORY, K. E. (1996). A search for quantitative trait loci for ovulation rate in cattle. *Anim. Genet.* **27**: 157-162.

BOTSTEIN, D., WHITE, R. L., SKOLNICK, M. & DAVIS, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in human using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* **32**: 314-331.

BOVENHUIS, H. & WELLER, J. I. (1994). Mapping and analysis of dairy cattle quantitative trait loci by maximum likelihood methodology using milk protein genes as genetic markers. *Genetics* **137**: 267-280.

BREESE, E. L. & MATHER, K. (1957). The organisation of polygenic activity within a chromosome in *Drosophila*. I. Hair characters. *Heredity* **11**: 373-395.

BROAD, T. E., ANSARI, H. A., BURKIN, D. J., CAMBRIDGE, L. M., CARPENTER, M.A., GLEESON, A. J., JONES, C., LEWIS, P. E., MAHER, D. W., & PEARCE, P. D. (1994a). Physical mapping of the sheep genome: six new chromosomal assignments by in situ hybridization, and sixteen more loci mapped using an expanded panel of sheep x hamster cell hybrids. *Anim. Genet.* **25 (Supl. 2)**: 45.

BROAD, T. E., BURKIN, D. J., CAMBRIDGE, L. M., MAHER, D. W., LEWIS, P. E., ANSARI, H. A., PEARCE, P. D. & JONES, C. (1994b). Seven loci from human chromosome 4 map onto sheep chromosome 6: a proposal to restore the original nomenclature of this chromosome. *Mamm. Genome* **5**: 429-433.

BROAD, T. E., BURKIN, D. J., JONES, C., LEWIS, P. E., ANSARI, H. A. & PEARCE, P. D. (1993). Mapping of MIF5, CIR, MYHL, TPI1, IAPP, A2MR and RNR onto sheep chromosome 3q. *Anim. Genet.* **24**: 415-419.

BROAD, T. E., HAYES, H. & LONG, S. E. (1997). Cytogenetics: Physical chromosome maps. En: *The genetics of sheep*, pp. 241-295. Ed. L. Piper & A. Ruvinski. CAB International. Wallingford. U.K.

BURKIN, D. J., BROAD, T.E. & JONES, C. (1991). Isolation and characterization of sheep x hamster somatic cell hybrids selectively retaining a sheep translocation chromosome. *Cytogen. Cell Genet.* **58**: 21-24.

BURKIN, D. J., MORSE, H. G., BROAD, T.E. PEARCE, P. D., ANSARI, H. A., LEWIS, P. E. & JONES, C. (1993). Mapping the sheep genome: production of characterized sheep x hamster cell hybrids. *Genomics* **16**: 466-472.

BURT, D. W., BUMSTEAD, N., BITGOOD, J. J., PONCE DE LEON, F. A. & CRITTENDEN, L. B. (1995). Chicken genome mapping: A new era in avian genetics. *Trends Genet.* **11**: 190.

CALLEN, D. F., THOMPSON, A. D., SHEN, Y., PHILLIPS, H. A., RICHARDS, R. I., MULLEY, J. C. & SUTHERLAND, G. R. (1993). Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *Am. J. Hum. Genet.* **52**: 922-927.

CHAKRABORTY, R., FORNAGE, M. GUEGUEN, R. & BOERWINKLE, E. (1991). Population genetics of five hypervariable loci: analysis of PCR based VNTR polymorphism within a population. En: *DNA fingerprinting: approaches and applications*, pp. 125-143. Ed. T. Burke, G. Dolf, A. J. Jeffreys & R. Wolff. Birkhäuser Verlag. Basel. Suiza.

CHAPMAN, H. M. & BRUÈRE, A. N. (1977). Chromosome morphology during meiosis of normal and Robertsonian translocation-carrying rams (*Ovis aries*). *Can. J. Genet. Cytol.* **19**: 93-102.

CHARLIER, C., COPPIETERS, W., FARNIR, F., GROBET, L., LEROY, P. L., MICHAUX, C., MNI, M., SCHWERS, A., VANMANSHOVEN, P., HANSET, R. & GEORGES, M. (1995). The *mh* gene causing double-muscling in cattle maps to bovine chromosome 2. *Mamm. Genome* **6**: 788-792.

CHURCHILL, G. A. & DOERGE, R. W. (1994). Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* **138**: 963-971.

CLAMP, P. A., BEEVER, J. E., FERNANDO, R. L., MCLAREN, D. G. & SHOOK, L. B. (1992). Detection of linkage between genetic markers and genes that affect growth and carcass traits in pigs. *J. Anim. Sci.* **70**: 2695-2706.

COCKETT, N. E., JACKSON, S. P., SHAY, T. L., NIELSEN, D., MOORE, S. S., STEELE, M. R., BARENDSE, W., GREEN, R. D. & GEORGES, M. (1994). Chromosomal localization of the callipyge gene in sheep (*Ovis aries*) using bovine DNA markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 3019-3023.

COCKETT, N. E., JACKSON, S. P., SHAY, T. L., FARNIR, F., BERGHMANS, S., SNOWDER, G. D., NIELSEN, D. M. & GEORGES, M. (1996). Polar overdominance at the ovine *callipyge* locus. *Science* **273**: 236-238.

COPPIETERS, W., KVASZ, A., ARRANZ, J. J., GRISART, B., FARNIR, F., MACKINNON, M. & GEORGES, M. (1998). A rank-based non parametric method to map QTL in outbred half-sib pedigrees: application to milk production in a grand-daughter design. (Enviado).

COWEN, N. M. (1988). The use of replicated progenies in marker-based mapping of QTL's. *Theor. Appl. Genet.* **75**: 857-862.

CRAWFORD, A.M., DODDS, K.G., PIERSON, C.A., EDE, A.J., MONTGOMERY, G.W., GARMONSWAY, H.G., BEATTIE, A.E., DAVIES, K., MADDOX, J.F., KAPPES, S.W., STONE, R.T., NGUYEN, T.C., PENTY, J.M., LORD, E.A., BROOM, J.E., BUITKAMP, J., SCHWAIGER, W., EPPLER, J.T., MATTHEW, P., MATTHEWS, M.E., HULME, D.J., BEH, K.J., MCGRAW, R.A. & BEATTIE, C.W. (1995). An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics* **140**: 703-724.

CRAWFORD, A.M., MONTGOMERY, G.W., PIERSON, C. A., BROWN, T., DODDS, K.G., SUNDEN, S. L. F., HENRY, H. H., EDE, A. J., SWARBRICK, P. A., BERRYMAN, T., PENTY, J. M. & HILL, D. F. (1994). Sheep linkage mapping: nineteen linkage groups derived from the analysis of paternal half-sib families. *Genetics* **137**: 573-579.

DARVASI, A. & SOLLER, M. (1992). Selective genotyping for determination of linkage between a marker locus and a quantitative trait locus. *Theor. Appl. Genet.* **85**: 353-359.

DARVASI, A. & SOLLER, M. (1994a). Optimum spacing of genetic markers for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci. *Theor. Appl. Genet.* **89**: 351-357.

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

DE GORTARI, M. J., FREKING, B. A., CUTHBERTSON, R. P., KAPPES, S. M., KEELE, J. W., STONE, R. G., LEYMASTER, K. A., DODDS, K. G., CRAWFORD, A. M. & BEATTIE, C. W. (1998). A second generation linkage map of the sheep genome. *Mamm. Genome* **9**: 204-209.

DI GREGORIO, P., RANDO, A., PIERAGOSTINI, E. & MASINA, P. (1991). DNA polymorphism at the casein loci in sheep. *Anim. Genet.* **22**: 21-30.

- DI RIENZO, A., PETERSON, A. C., GARZA, J. C., VALDES, A. M., SLATKIN, M. & FREIMER, N. B. (1994). Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 3166-3170.
- DRY, F. W. (1955). The dominant N gene in New Zealand Romney sheep. *Aust. J. Agric. Research* **6**: 725-769. Citado por Blair (1990).
- EDWARDS, A., HAMMOND, H. A., JIN, L., CASKEY, C. T. & CHAKRABORTY, R. (1992). Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* **12**: 241-253.
- EDWARDS, M. D., STUBER, C. W. & WENDEL J. F. (1987). Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution and types of gene action. *Genetics* **116**: 113-125.
- EGGEN, A. & FRIES, R. (1995). An integrated cytogenetic and meiotic map of the bovine genome. *Anim. Genet.* **26**: 215-236.
- ELLEGREN, H. (1993). Abundant $(A)_n \bullet (T)_n$ mononucleotide repeats in the pig genome: linkage mapping of the porcine APOB, FSA, ALOX12, PEPN and RLN loci. *Anim. Genet.* **24**: 367-372.
- ELLEGREN, H., CHOWDHARY, B. P., JOHANSSON, M., MARKLUND, L., FREDHOLM, M., GUSTAVSSON, I. & ANDERSSON, L. (1994). A primary linkage map of the porcine genome reveals a low rate of genetic recombination. *Genetics* **137**: 1089-1100.
- ELSEN, J. M. (1993). Detection and use of marker genes in farm animals. *International Course on DNA polymorphisms* Lieja.
- ELSEN, J. M. (1994). Recherche e identification de gènes à effets quantitatifs chez les animaux domestiques. *VII Reunión Nacional sobre Mejora Genética Animal*. Lleida.
- ESTRADE, M., VIGNON, X. & MONIN, G. (1993a). Effect of the RN⁻ gene on ultrastructure and protein fractions in pig muscle. *Meat Sci.* **35**: 313.
- ESTRADE, M., VIGNON, X., ROCK, E. & MONIN, G. (1993b). Glycogen hyperaccumulation in the white muscle fibres of RN⁻ carrier pigs. A biochemical and ultrastructural study. *Comp. Biochem. Physiol.* **104B** (2): 321.
- FALCONER, D. S. & MACKAY, T. F. C. (1996). *Introduction to Quantitative Genetics*. Ed. Longman. Essex. U. K.
- FERRETI, L., LEONE, P. & SGARAMELLA, V. (1990). Long range restriction analysis of the bovine casein genes. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6829-6833.

FUERTES, J. A. (1997). *Estudio de la producción, composición, recuento celular de la leche y de la morfología mamaria en el ganado ovino de raza Churra: aplicación al control lechero oficial*. Tesis Doctoral. Universidad de León.

FUJII, J., OTSU, K., ZORZATO, F., DE LEON, S., KHANNA, V. K., WEILER, J. E., O' BRIEN P. J. & MACLENNAN, D. H. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hypertermia. *Science* **253**: 448-451.

GELDERMANN, H. (1975). Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. *Theor. Appl. Genet.* **46**: 319-330.

GELDERMANN, H., PIEPER, U. & ROTH, B. (1985). Effects of marked chromosome sections on milk performance in cattle. *Theor. Appl. Genet.* **70**: 138-146.

GEORGES, M. & MASSEY, J. M. (1991). Velogenetics, or the synergistic use of marker assisted selection and germ-line manipulation. *Theriogenology* **35**: 151-159.

GEORGES, M., DIETZ, A. B., MISHRA, A., NIELSEN, D., SARGEANT, L. S., SORENSEN, A., STEELE, M. R., ZHAO, X., LEIPOLD, H., WOMACK, J. E. & LATHROP, M. (1993). Microsatellite mapping of gene causing Weaver disease in cattle will allow the study of an associated quantitative trait locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 1058-1062.

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

GÓMEZ-RAYA, L., KLUNGLAND, H., VÅGE, D. I., OLSAKER, I., FIMLAND, E., KLEMETSDAL, G., RØNNINGEN, K. & LIEN, S. (1998). Mapping QTL for milk production traits in Norwegian cattle. En: *Proceedings of the 6th world congress on genetics applied to livestock production*. Armidale. **26**: 429-432.

GONYON, D. S., MATHER, R. E., HINES, H. C., HAENLEIN, G. F. W., ARAVE, C. W. & GAUNT, N. (1987). Associations of bovine blood and milk polymorphisms with lactation traits: Holsteins. *J. Dairy Sci.* **70**: 2585-2598.

GROBET, L. , SCHWERS, A. , ROUPAIN, J. & HANSET, R. (1991). Les empreintes génétiques et autres marqueurs dans les contrôles de filiation chez les animaux domestiques. *Ann. Méd. Vét.* **135**: 245-253.

GROBET, L., ROYO MARTÍN, L. J., PONCELET, D., PIROTTIN, D., BROUWERS, B., RIQUET, J., SCHOEBERLEIN, A., DUNNER, S., MÉNISSIER, F., MASSABANDA, J., FRIES, R., HANSET, R. & GEORGES, M. (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nature Genet.* **17**: 71-74.

HAENLEIN, G. F. W., GONYON, D. S., MATHER, R. E. & HINES, H. C. (1987). Associations of bovine blood and milk polymorphisms with lactation traits: Guernseys. *J. Dairy Sci.* **70**: 2599-2609.

HALEY, C. S. & KNOTT, S. A. (1992). A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* **69**: 315-324.

HAMADA, H., PETRINO, M. G. & KAKUNAGA, T. (1982). A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionary diverse eukariotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 6465-6469.

HAYES, H., PETIT., E., BOUNIOL, C. & POPESCU, P. (1993). Localization of the alpha-S2-casein genes (CASAS2) to the homoeologous cattle, sheep and goat chromosomes 4 by *in situ* hybridization. *Cytogen. Cell. Genet.* **64**: 281-285.

HAYES, H., PETIT., E. LEMIEUX, N. & DUTRILLAUX, B. (1992). Chromosomal localization of ovine beta-casein gene by non isotopic *in situ* hybridization and R-banding. *Cytogen. Cell. Genet.* **61**: 286-288.

HENRY, H. M., DODDS, K. G., WULIJI, T., JENKINS, Z. A., BEATTIE, A. E. & MONTGOMERY, G. W. (1998). A genome screen for QTL for wool traits in a Merino x Romney backcross flock. En: *Proceedings of the 6th world congress on genetics applied to livestock production*. Armidale. **26**: 433-436.

HOESCHELE, I. & MEINERT, T. R. (1990). Association of genetic defects with yield and type traits: the Weaver locus effect on yield. *J. Dairy Sci.* **73**: 2503-2515.

HOZIER, J. C. & DAVIS, L. M. (1992). Cytogenetic approaches to genome mapping. *Anal. Biochem.* **200**: 205-217.

HULME, D. J., SMITH, A. J., SILK, J. P., REDWIN, J. M. & BEH, K. J. (1995). Polymorphic sheep microsatellites at the McM2, McM131, McM135, McM136, McM140, McM200, McM214, McM373, McM505, McM507 and McM512 loci. *Anim. Genet.* **26**: 369-370.

IMAM-GHALI, M., SAIDI-MEHTAR, N. & GUERIN, G. (1991). Sheep gene mapping: additional DNA markers included (CASB, CASK, LALBA, IGF-1 and AMH). *Anim. Genet.* **22**: 165-172.

JAMIESON, A. (1994). The effectiveness of using co-dominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members. *Anim. Genet.* **25 (Suppl. 1)**: 37-44.

JANSEN, R. C. (1993). Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* **135**: 205-211.

JEFFREYS, A. J., WILSON, V. & THEIN, S. L. (1985). Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* **314**: 67-73.

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

KEARSEY, M. J. & HYNE, V. (1994). QTL analysis: a simple "marker regression" approach. *Theor. Appl. Genet.* **89**: 698-702.

KEARSEY, M. J. & POONI, S. (1996). *The genetical analysis of quantitative traits*. Ed. Chapman & Hall. Londres. U. K.

KHATIB, H., DARVASI, A., PLOTSKI, Y. & SOLLER, M. (1994). Determining relative microsatellite allele frequencies in pooled DNA samples. *PCR Methods Applic.* **4**: 13-18.

KNOTT, S. A., ELSÉN, J. M. & HALEY, C. S. (1996). Methods for multiple-marker mapping of quantitative trait loci in half-sib populations. *Theor. Appl. Genet.* **93**: 71-80.

KNOTT, S. A. & HALEY C. S. (1992). Maximum likelihood mapping of quantitative trait loci using full-sib families. *Genetics* **132**: 1211-1222.

KRUGLYAK, L. & LANDER, E.S. (1995a). A non parametric approach for mapping quantitative trait loci. *Genetics* **139**: 1421-1428.

KRUGLYAK, L. & LANDER, E.S. (1995b). Complete multipoint sib-pair analysis of qualitative and quantitative traits. *Am. J. Hum. Genet.*, **57**: 439-454.

LANDE, R. & THOMPSON, R. (1990). Efficiency of Marker-Assisted Selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* **124**: 743-756.

LANDER, E. S. & BOTSTEIN, D. (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* **121**: 185-199.

LANDER, E. S. & GREEN, P. (1987). Construction of multilocus genetic linkage maps in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 2363-2367.

LEBOWITZ, R. J., SOLLER, M. & BECKMANN, J. S. (1987). Trait-based analyses for the detection of linkage between marker loci and quantitative trait loci in crosses between inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* **73**: 556-562.

LEVÉZIEL, H. MÉTÉNIER, L., GUERIN, G., CULLEN, P., PROVOT, C., BERTAUD, M. & MERCIER J. C. (1991). Restriction fragment length polymorphism of ovine casein genes: close linkage between the α_{s1} -, α_{s2} -, β - and κ -casein loci. *Anim. Genet.* **22**: 1-10.

LIEN, S., KAMINSKI, S., ALESTROM, P. & ROGNE, S. (1993). A simple and powerful method for linkage analysis by amplification of DNA from single sperm cells. *Genomics* **16**: 41-44.

LORD, E. A., LUMSDEN, J. M., DODDS, K. G., HENRY, H. M., CRAWFORD, A. M., ANSARI, H. A., PEARCE, P. D., MAHER, D. W., STONE, R. T., KAPPES, S. M., BEATTIE, C. W. & MONTGOMERY, G. W. (1996). The linkage map of sheep Chromosome 6 compared with orthologous regions in other species. *Mamm. Genome* **7**: 373-376.

LUMSDEN, J. M., LORD, E. A. & MONTGOMERY, G. W. (1996). Characterization and linkage mapping of ten sheep microsatellite markers derived from a sheep x hamster cell hybrid. *Anim. Genet.* **27**: 203-206.

LUMSDEN, J., VAN STIJN, T., LORD, E., BROOM, M. & MONTGOMERY, G. (1995). A YAC contig of the ADH2 region on sheep chromosome 6. En: *Proceedings of the 6th Australasian gene mapping workshop and New Zealand Genetic Society*. Dunedin. Abstract 73. Citado por Broad *et al.* (1997).

LUO, Z. W. & KEARSEY, M. J. (1989). Maximum likelihood estimation of linkage between a marker gene and a quantitative locus. *Heredity* **63**: 401-408.

MA, R. Z., BEEVER, J. E., DA, Y., GREEN, C. A., RUSS, I., PARK, C., HEYEN, D. W., EVERTS, R. E., FISHER, S. R., OVERTON, K. M., TEALE, A. J., KEMP, S. J., HINES, H. C., GUÉRIN, G. & LEWIN, H. A. (1996). A male linkage map of the cattle (*Bos taurus*) genome. *J. Hered.* **87**: 261-271.

MADDOX, J. F., DAVIES, K. P., CUTHBERTSON, R., HULME, D. J., HENRY, H., HAWKEN, R. J., DRINKWATER, R., DODDS, K. G. & CRAWFORD, A. M. (1996). Updating the sheep linkage map. *Proceedings of the 25th International Conference on Animal Genetics (ISAG)*. Tours. *Anim. Genet.* **27 (Supl. 2)**: 85-86.

MÄKI-TANILA, A., DE KONING, D.-J., ELO, K., MOISIO, S., VELMALA, R. & VILKKI J. (1998). Mapping of multiple quantitative trait loci by regression in half sib designs. En: *Proceedings of the 6th world congress on genetics applied to livestock production*. Armidale. **26**: 269-272.

MARIANI, P., LUNDSTRÖM, K., GUSTAFSSON, U., ENFÄLT, A. -C., JUNEJA, R. K. & ANDERSSON, L. (1996). A major locus (RN) affecting muscle glycogen content is located on pig chromosome 15. *Mamm. Genome* **7**: 52-54.

MARKLUND, L., NYSTRÖM, P.-E., STERN, S. & ANDERSSON, L. (1996). Further characterization of a major QTL for fatness on pig chromosome 4. *Proceedings of the 25th International Conference on Animal Genetics (ISAG)*. Tours. *Anim. Genet.* **27 (Supl. 2)**: 114.

MARTÍNEZ, O. & CURNOW, N. (1992). Estimating the locations and the sizes of the effects of quantitative trait loci using flanking markers. *Theor. Appl. Genet.* **85**: 480-488.

MILAN, D., BIDANEL, J. P., LE ROY, P., CHEVALET, C., WOLSZYN, N., CARITEZ, J. C., GRUAND, J., BONNEAU, M., LAFAUCHEUR, L., RENARD, C., VAIMAN, M., MORMÈDE, P., DÉSAUTÉS, C., GELLIN, J. & OLLIVIER, L. (1998). Current status of QTL detection in Large White x Meishan crosses in France. En: *Proceedings of the 6th world congress on genetics applied to livestock production*. Armidale. **26**: 414-417.

MILAN, D., LE ROY, P., WOLOSZYN, N., CARITEZ, J. C., ELSEN, J. M., SELIER, P. & GELLIN, J. (1995). The RN locus for meat quality maps to pig chromosome 15. *Genet. Sel. Evol.* **65**: 195-199.

MOAZAMI-GOUDARZI, K., VAIMAN, D., MERCIER, D., GROHS, C., FURET, J. P., LEVEZIEL, H. & MARTIN, P. (1994). Emploi de microsatellites pour l'analyse de la diversité génétique des races bovines françaises: premiers résultats. *Genet. Sel. Evol.* **26**: 155s-165s.

MONTGOMERY, G. W. & CRAWFORD, A. M. (1997). The sheep linkage map. En: *The genetics of sheep*, pp. 297-351. Ed. L. Piper & A. Ruvinski. CAB International. Wallingford. U. K.

MONTGOMERY, G. W., CRAWFORD, A. M., PENTY, J. M., DODDS, K. G., EDE, A.J., HENRY, H. M., PIERSON, C. A., LORD, E. A., GALLOWAY, S. M., SCHMACK, A. E., SISE, J. A., SWARBRICK, P. A., HANRAHAN, V., BUCHANAN, F. C. & HILL, D. F. (1993). The ovine Booroola fecundity gene (*FecB*) is linked to markers from a region of human chromosome 4q. *Nature Genet.* **4**: 410-414.

MONTGOMERY, G. W., LORD, E. A., PENTY J. M., DODDS, K. G., BROAD, T.E., CAMBRIDGE, L., SUNDEN, S. L. F. ,STONE, R. T. & CRAWFORD, A. M. (1994). The Booroola Fecundity (*FecB*) gene maps to sheep chromosome 6. *Genomics* **22**: 148-153.

MONTGOMERY, G. W., PENTY J. M., HENRY, H. M., SISE, J. A., LORD, E. A., DODDS, K. G. & HILL, D. F. (1995). Sheep linkage mapping: RFLP markers for comparative mapping studies. *Anim. Genet.* **26**: 249-259.

MOORE, S. S., SARGEANT, L. L., KING, T. J., MATTICK, J. S., GEORGES, M. & HETZEL, J. S. (1991). The conservation of dinucleotide microsatellite among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics* **10**: 654-660.

MORENO-GONZÁLEZ, J. (1992). Genetic models to estimate additive and non-additive effects of marker-associated QTL using multiple regression techniques. *Theor. Appl. Genet.* **85**: 435-444.

MOSIG, M. O., LIPKIN, E., DARVASI, A., EZRA, E., FRIEDMANN, A. & SOLLER, M. (1998). Mapping QTL affecting milk protein percent in Israel Holstein dairy cattle by selective DNA pooling with dinucleotide microsatellite markers. En: *Proceedings of the 6th world congress on genetics applied to livestock production*. Armidale. **26**: 253-256.

MOTRO, U. & SOLLER, M. (1993). Sequential sampling in determining linkage between marker loci and quantitative trait loci. *Theor. Appl. Genet.* **85**: 658-664.

NEIMANN-SORENSEN, A. & ROBERTSON, A. (1961) The association between blood groups and several production characteristics in three Danish cattle breeds. *Acta Agric. Scand.* **11**: 163-196.

NGUYEN, T. C. & BUNCH, T. D. (1980). Blood groups and evolutionary relationships among domestic sheep, domestic goat, Aoudad and European Mouflon. *Ann. Genet. Sel. Anim.* **12**: 169-180.

O' BRIEN, S. J., WOMACK, J. E., LYONS L.A., MOORE, K. J., JENKINS, N.A. & COPELAND, N.G. (1993). Anchored reference loci for comparative genome mapping in mammals. *Nature Genet.* **3**: 103-112.

OLSON, M., HOOD, L., CANTOR, C. & BOTSTEIN, D. (1989). A common language for physical mapping of the human genome. *Science* **245**: 1434-1435.

PASZEK, A. A., BEATTIE, C. W., FLICKINGER, G. W., WILKIE, P. J. & SHOOK, L. B. (1998). Genomic scan for quantitative trait locus in swine. En: *Proceedings of the 6th world congress on genetics applied to livestock production*. Armidale. **26**: 418-421.

PEARCE, P. D., ANSARI, H. A., MAHER, D. W., BROAD, T. E., CAMBRIDGE, L. M., LEWIS, P. E., BURKIN, D. J. & JONES, C. (1994). The assignment of fourteen new loci to ovine chromosomes. En: *Proceedings of the 5th Australasian Gene Mapping Workshop*. Armidale. Citado por Broad *et al.* (1997).

PEMBERTON, J. M., SLATE, J., BANCROFT, D. R & BARRET, J. A. (1995). Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Mol. Ecol.* **4**: 249-252.

PHUA, S. H., COLLINS, L., LEWIS, P., WOOD, N., MCNABB, L., BROAD, T. & PEARCE, P. (1992). An EcoRI restriction fragment length polymorphism at the ovine α s2-casein (CASAS2) locus. *Anim. Genet.* **23**: 475.

RATHJE, T. A., ROHRER, G. A. & JOHNSON, R. K. (1997). Evidence for quantitative trait loci affecting ovulation rate in pigs. *J. Anim. Sci.* **75**: 1486-1494.

ROHRER, G. A., ALEXANDER, L. J., KEELE, J. W. SMITH, T. P., & BEATTIE, C. W. (1994). A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics* **136**: 231-245.

ROHRER, G. A., ALEXANDER, L. J., HU, Z., SMITH, T. P. L., KEELE, J. W. & BEATTIE, C. W. (1996). A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Res.* **6**: 371-391.

RON, M., BAND, M., YANAI, A. & WELLER, J. I. (1994). Mapping quantitative trait loci with DNA microsatellites in a commercial dairy cattle population. *Anim. Genet.* **25**: 259-264.

ROTHSCHILD, M. F (1998). Identification of quantitative trait loci and interesting candidate genes in the pig: progress and prospects. En: *Proceedings of the 6th world congress on genetics applied to livestock production*. Armidale. **26**: 403-409.

ROYLE, N. J., CLARKSON, R. E., WONG, Z. & JEFFREYS, A. J. (1988). Clustering of hypervariable minisatellites in the proterminal regions of human autosomes. *Genomics* **3**: 352-360.

SAX, K. (1923). The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* **8**: 552-560. Citado por Soller (1990).

SINGER, M. F. (1982). Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int. Rev. Cytol.* **76**: 67-112.

SINGER, M. F & BERG, P. (1993). *Genes y genomas, una perspectiva cambiante*. Ed. Omega. Barcelona. España.

SMITH, A. J., HULME, D. J., SILK, J. P., REDWIN, J. M. & BEH, K. J. (1995). Thirteen polymorphic ovine microsatellites. *Anim. Genet.* **26**: 277-278.

SOLLER, M. (1990). Genetic mapping of the bovine genome using deoxyribonucleic acid-level markers to identify loci affecting quantitative traits of economic importance. *J. Dairy. Sci.* **73**: 2628-2646.

SOLLER, M. (1991). Mapping quantitative trait loci affecting traits of economic importance in animal populations using molecular markers. En: *Gene mapping: strategies, techniques and applications*, pp. 21-49. Ed. L. B. Shook, H. A. Lewin & D. G. McLaren. Marcel Dekker. New York. USA.

SOLLER, M. & BECKMANN, J. S. (1983). Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. *Theor. Appl. Genet.* **67**: 25-33.

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

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

SOLLER, M. & PLOTKIN-HAZAN, J. (1977) The use of marker alleles for the introgression of linked quantitative alleles. *Theor. Appl. Genet.* **51**: 133-137.

SPELMAN, R. J., COPPIETERS, W., KARIM, L., VAN ARENDONK, J. A. M. & BOVENHUIS, H. (1996). Quantitative Trait Loci analysis for five milk production traits on chromosome Six in the Dutch Holstein-Friesian population. *Genetics* **144**: 1799-1808.

STALLINGS, R. L., FORD, A. F., NELSON, D., TORNEY, D. C., HILDEBRAND, C. E. & MOYZIS, R. K. (1991). Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* **10**: 807-815.

STONE, R. T., PULIDO, J. C., DUYK, G. M., KAPPES, S. M., KEELE, J. W & BEATTIE, C. W. (1995). A small-insert bovine genomic library highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Mamm. Genome* **6**: 714-724.

STUBER, C. W., MOLL, R. H., GOODMAN, M. M., SCHAFFER, H. E. & WEIR, B. S. (1980). Allozyme frequency changes associated with selection for increased grain yield in maize (*Zea mays* L.). *Genetics* **95**: 225-236.

TAUTZ D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* **17**: 6463-6471.

TAUTZ D. & RENZ, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* **12**: 4127-4138.

THIEVEN, U., SOLINAS-TOLDO, S., FRIEDL, R., MASABANDA, J., FRIES, R., BARENDSE, W., SIMON, D. & HARLIZIUS, B. (1997). Polymorphic CA-microsatellites for the integration of the bovine genetic and physical map. *Mamm. Genome* **8**: 52-55.

THODAY, J. M. (1961). Location of polygenes. *Nature* **191**: 368-370.

- THREADGILL, D. W. & WOMACK, J. E. (1990). Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6935-6942.
- TROYER, D. L., GOAD, D. W., XIE, H., ROHRER, G. A., ALEXANDER, L. J. & BEATTIE, C. W. (1994). Use of direct in situ single-copy (DISC) PCR to physically map five porcine microsatellites. *Cytogenet. Cell Genet.* **67**: 199-204.
- VAIMAN, D., SCHIBLER, L., OURGEOIS, F., OUSTRY, A., AMIGUES, Y. & CRIBIU, E. P. (1996). A genetic linkage map of the male goat genome. *Genetics* **144**: 279-305.
- VELMALA, R., VILKKI, J., ELO, K. & MÄKI-TANILA, A. (1995). Casein haplotypes and their association with milk production traits in the Finnish Ayrshire cattle. *Anim. Genet.* **26**: 419-425.
- VERGNAUD, G. (1989). Polymers of random short oligonucleotides detect polymorphic loci in the human genome. *Nucleic Acids Res.* **17**: 7623-7630.
- VILKKI, H. J., DE KONING, D.-J., ELO, K., VELMALA, R. & MÄKI-TANILA, A. (1997). Multiple marker mapping of quantitative trait loci of Finnish dairy cattle by regression. *J. Dairy Sci.* **80**: 198-204.
- WEBER, J. L. (1990). Informativeness of human (dC-dA)_n • (dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* **7**: 523-530.
- WEBER, J. L. & MAY, P. E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* **44**: 388-396.
- WELLER, J. I. (1986). Maximum likelihood techniques for the mapping and analysis of quantitative trait loci with the aid of genetic markers. *Biometrics.* **42**: 627-640.
- WELLER, J. I. (1987). Mapping and analysis of quantitative trait loci in *Lycopersicon*. *Heredity* **59**: 413-421.
- WELLER, J. I. (1990). Experimental designs for mapping quantitative trait loci in segregating populations. En: *Proceedings of the 4th. world congress on genetics applied to livestock production*. Edimburgo. **13**: 113. Citado por Soller (1990).
- WELLER, J. I. (1996). Introduction to QTL detection and Marker-Assisted Selection. En: *XXth Biotechnology's role in the genetic improvement of farm animals (Beltsville Symposia in Agricultural Research)* 259-275. Ed. R. H. Miller, V. G. Pursel & H. D. Norman. American Society of Animal Science. Savoy, Illinois, USA.
- WELLER, J. I. & FERNANDO, R. L. (1991). Strategies for the improvement of animal production using Marker-Assisted Selection. En: *Gene mapping: strategies, techniques and applications*, pp. 305-328. Ed. L. B. Shook, H. A. Lewin & D. G. McLaren. Marcel Dekker. New York. USA.

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

WELLER, J. I., SOLLER, M. & BRODY, T. (1988). Linkage analysis of quantitative traits in an interspecific cross of tomato (*Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon pimpinellifolium*) by means of genetic markers. *Genetics* **118**: 329-339.

WELLER, J. I., SOLLER, M. & KOROL, A. B. (1997). Course notes and abstracts. *International course on detection of quantitative trait loci and Marker-Assisted Selection*. Jerusalem.

WELLER, J. Y. & WYLER, A. (1992). Power of different sampling strategies to detect quantitative trait loci variance effects. *Theor. Appl. Genet.* **83**: 582-588.

WIERDL, M., DOMINSKA, M. & PETES, T. D. (1997). Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite. *Genetics* **146**: 769-779.

WILKIE, P. J., PASZEK, A. A., FLICKINGER, G. H., ROHRER, G. A., ALEXANDER, L. J., BEATTIE, C. W. & SHOOK, L. (1996). Scan of eight porcine chromosomes for growth, carcass and reproductive traits reveals two likely quantitative trait loci. *Proceedings of the 25th International Conference on Animal Genetics (ISAG)*. Tours. *Anim. Genet.* **27 (Supl. 2)**: 117.

WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids. Res.* **18**: 6531-6535.

WOODALL, C. J., MCLAREN, L. J. & WATT, N. J. (1994). Sequence and chromosomal localisation of the gene encoding ovine latent transforming growth factor- β 1. *Gene* **150**: 371-373.

YERLE, M., LAHBIB-MANSAIS, Y., MELLINK, C., GOUREAU, A., PINTON, P., ECHARD, G., GELLIN, J., ZIJLSTRA, C., DE HAAN, N., BOSMA, A. A., CHOWDHARY, B., GU, F., GUSTAVSSON, I., THOMSEN, P. D., CHRISTENSEN, K., RETTENBERGER, G., HAMEISTER, H., SCHMITZ, CHAPUT, B. & FRELAT, G. (1995). The Pig-Map consortium cytogenetic map of the domestic pig (*Sus scrofa domestica*). *Mamm. Genome* **6**: 176-186.

YU, T. -P., TUGGLE, C. K., SCHMITZ, C. B. & ROTHSCHILD, M. F. (1995). Association of PIT1 polymorphisms with growth and carcass traits in pigs. *J. Anim. Sci.* **73**: 1282-1288.

ZENG, Z. -B. (1993). Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 10972-10976.

ANEXO

OarCP125

Familia	Alelo	N	VGL			VGCP			VGPP		
			Media	F	P	Media	F	P	Media	F	P
2	103	18	5,87 ± 2,17	0,33	0,5652	0,36 ± 0,17	0,33	0,5648	0,14 ± 0,06	0,06	0,8056
	119	18	7,51 ± 2,18			0,49 ± 0,18			0,12 ± 0,06		
3	99	26	7,84 ± 1,88	0,42	0,5178	0,26 ± 0,15	1,44	0,2309	-0,14 ± 0,05	0,52	0,4727
	115	42	9,24 ± 1,47			0,47 ± 0,12			-0,10 ± 0,04		
5	109	14	-1,01 ± 2,45	0,12	0,7242	-0,19 ± 0,19	0,17	0,6832	0,07 ± 0,06	1,35	0,2471
	117	16	-2,15 ± 2,32			-0,30 ± 0,19			-0,03 ± 0,06		
6	103	30	13,86 ± 1,70	0,73	0,3933	0,74 ± 0,14	0,18	0,6708	0,06 ± 0,04	1,04	0,3089
	111	25	11,88 ± 1,85			0,66 ± 0,15			0,00 ± 0,05		
7	103	34	9,50 ± 1,64	0,79	0,3749	0,48 ± 0,13	0,62	0,4299	0,06 ± 0,04	7,39	0,0070
	107	32	7,58 ± 1,68			0,34 ± 0,14			-0,09 ± 0,04		
8	103	17	10,06 ± 2,21	0,08	0,7804	0,76 ± 0,18	0,58	0,4468	0,17 ± 0,06	0,19	0,6629
	107	17	9,22 ± 2,22			0,57 ± 0,18			0,20 ± 0,06		

OarCP125

Familia	Alelo	VFL				VFCP			VFPP			
		N	Media	F	P	Media	F	P	N	Media	F	P
2	103	68	92,80 ± 4,17	1,98	0,1599	7,28 ± 0,30	1,45	0,2287	98	5,88 ± 0,08	0,11	0,7428
	119	69	100,37 ± 4,20			7,74 ± 0,30			101	5,84 ± 0,08		
3	99	83	94,77 ± 4,11	1,03	0,3093	7,23 ± 0,29	1,41	0,2360	161	5,63 ± 0,07	0,65	0,4188
	115	130	99,36 ± 3,27			7,62 ± 0,23			217	5,70 ± 0,06		
5	109	36	89,13 ± 5,68	1,26	0,2621	6,89 ± 0,40	1,96	0,1622	74	5,86 ± 0,09	2,11	0,1464
	117	56	80,97 ± 4,88			6,16 ± 0,34			95	5,68 ± 0,09		
6	103	87	109,10 ± 3,82	1,16	0,2818	8,06 ± 0,27	0,30	0,5817	163	5,82 ± 0,07	0,32	0,5709
	111	66	103,62 ± 4,33			7,86 ± 0,31			102	5,77 ± 0,08		
7	103	112	100,41 ± 3,57	1,30	0,2552	7,62 ± 0,25	0,86	0,3554	168	5,69 ± 0,07	0,47	0,4926
	107	96	95,06 ± 3,83			7,31 ± 0,27			162	5,63 ± 0,07		
8	103	36	99,53 ± 6,42	0,00	0,9747	7,82 ± 0,46	0,27	0,6047	62	5,99 ± 0,11	0,50	0,4793
	107	44	99,28 ± 5,47			7,54 ± 0,39			63	6,09 ± 0,11		

McM53

Familia	Alelo	N	VGL			VGCP			VGPP		
			Media	F	P	Media	F	P	Media	F	P
1	76	17	6,32 ± 2,11	1,32	0,2518	0,23 ± 0,17	1,12	0,2901	-0,12 ± 0,06	0,18	0,6719
	90	14	9,63 ± 2,29			0,47 ± 0,19			-0,08 ± 0,07		
2	86	17	6,90 ± 2,07	0,14	0,7088	0,47 ± 0,17	0,30	0,5830	0,10 ± 0,06	0,16	0,6937
	90	12	5,78 ± 2,42			0,34 ± 0,19			0,14 ± 0,07		
3	86	34	9,36 ± 1,49	0,00	0,9625	0,37 ± 0,12	0,14	0,7089	-0,14 ± 0,04	0,41	0,5217
	94	20	9,25 ± 1,91			0,44 ± 0,15			-0,10 ± 0,05		
5	82	9	-4,43 ± 2,74	1,47	0,2270	-0,37 ± 0,22	0,64	0,4245	0,08 ± 0,08	0,95	0,3294
	86	16	-0,32 ± 2,14			-0,15 ± 0,17			-0,02 ± 0,06		
6	84	30	14,56 ± 1,57	2,22	0,1374	0,77 ± 0,13	1,06	0,3030	-0,04 ± 0,05	1,72	0,1902
	86	28	11,43 ± 1,61			0,60 ± 0,13			0,03 ± 0,05		
7	86	34	5,99 ± 1,50	0,83	0,3634	0,21 ± 0,12	0,57	0,4506	-0,03 ± 0,04	0,03	0,8569
	88	31	7,81 ± 1,54			0,34 ± 0,13			-0,04 ± 0,04		
8	90	13	6,28 ± 2,33	1,53	0,2168	0,50 ± 0,19	0,21	0,6469	0,22 ± 0,07	0,11	0,7448
	94	19	9,84 ± 1,97			0,61 ± 0,16			0,19 ± 0,06		

McM53

Familia	Alelo	VFL				VFCP			VFPP			
		N	Media	F	P	Media	F	P	N	Media	F	P
1	76	50	88,99 ± 5,02	3,13	0,0775	6,74 ± 0,36	3,62	0,0576	146	5,56 ± 0,07	1,44	0,2303
	90	41	100,43 ± 5,43			7,64 ± 0,39			126	5,66 ± 0,07		
2	86	67	97,60 ± 4,32	1,38	0,2405	7,58 ± 0,31	1,23	0,2668	112	5,85 ± 0,08	0,24	0,6252
	90	49	90,72 ± 4,67			7,11 ± 0,34			68	5,90 ± 0,09		
3	86	103	95,90 ± 3,54	0,01	0,9122	7,27 ± 0,26	0,15	0,7012	193	5,64 ± 0,06	1,63	0,2024
	94	67	96,43 ± 4,23			7,41 ± 0,31			109	5,74 ± 0,08		
5	82	21	79,21 ± 7,18	0,71	0,4003	6,28 ± 0,52	0,24	0,6255	39	5,98 ± 0,12	5,03	0,0251
	86	52	86,12 ± 4,95			6,57 ± 0,36			91	5,67 ± 0,09		
6	84	78	109,05 ± 3,97	2,76	0,0972	8,03 ± 0,29	1,40	0,2371	115	5,79 ± 0,07	0,15	0,7013
	86	82	100,98 ± 3,83			7,61 ± 0,28			150	5,82 ± 0,07		
7	86	103	92,02 ± 3,64	0,38	0,5374	7,08 ± 0,26	0,45	0,5037	168	6,17 ± 0,12	1,50	0,2205
	88	94	94,75 ± 3,67			7,30 ± 0,27			139	6,16 ± 0,10		
8	90	28	89,94 ± 6,45	1,44	0,2307	7,14 ± 0,47	0,89	0,3453	40	0,22 ± 0,06	0,01	0,9401
	94	47	98,68 ± 5,27			7,64 ± 0,38			76	0,18 ± 0,05		

OarAE101

Familia	Alelo	N	VGL			VGCP			VGPP		
			Media	F	P	Media	F	P	Media	F	P
2	103	16	5,10 ± 2,31	0,45	0,5025	0,26 ± 0,19	0,33	0,5665	0,15 ± 0,06	0,93	0,3352
	111	21	7,02 ± 2,06			0,40 ± 0,16			0,07 ± 0,05		
3	99	26	8,86 ± 1,87	0,24	0,6282	0,39 ± 0,15	0,12	0,7285	-0,14 ± 0,05	1,06	0,3051
	117	31	9,98 ± 1,68			0,45 ± 0,13			-0,20 ± 0,04		
5	99	17	1,65 ± 2,25	0,39	0,5340	-0,00 ± 0,18	0,42	0,5177	-0,04 ± 0,06	0,16	0,6915
	117	9	3,87 ± 2,94			0,18 ± 0,23			-0,01 ± 0,08		
7	103	36	8,55 ± 1,58	0,20	0,6534	-0,39 ± 0,13	0,20	0,6552	-0,01 ± 0,04	0,27	0,6033
	117	44	7,69 ± 1,46			-0,32 ± 0,12			-0,04 ± 0,04		
8	103	14	8,26 ± 2,40	0,00	0,9492	0,59 ± 0,19	0,12	0,7270	0,12 ± 0,06	2,36	0,1262
	111	19	8,06 ± 2,16			0,50 ± 0,17			0,25 ± 0,06		

OarAE101

Familia	Alelo	VFL				VFCP			VFPP			
		N	Media	F	P	Media	F	P	N	Media	F	P
2	103	57	97,45 ± 4,72	0,18	0,6743	7,61 ± 0,34	0,46	0,4991	90	6,01 ± 0,08	5,28	0,0218
	111	85	95,14 ± 3,84			7,35 ± 0,27			118	5,78 ± 0,07		
3	99	85	98,67 ± 4,13	0,43	0,5129	7,49 ± 0,30	0,38	0,5375	160	5,71 ± 0,07	1,10	0,0736
	117	99	101,88 ± 3,70			7,71 ± 0,26			168	5,56 ± 0,06		
5	99	51	92,26 ± 5,02	0,96	0,3263	7,03 ± 0,36	1,21	0,2709	95	5,75 ± 0,09	0,18	0,5764
	117	31	99,50 ± 6,26			7,61 ± 0,45			55	5,82 ± 0,11		
7	103	110	98,47 ± 3,61	0,01	0,9089	7,57 ± 0,26	0,20	0,6588	167	5,66 ± 0,07	0,03	0,4491
	117	138	98,01 ± 3,27			7,44 ± 0,23			231	5,72 ± 0,06		
8	103	35	94,79 ± 5,94	0,00	0,9875	7,34 ± 0,42	0,20	0,6540	54	5,93 ± 0,11	1,37	0,0268
	111	46	94,91 ± 5,59			7,57 ± 0,40			80	6,24 ± 0,11		

BM143

Familia	Alelo	N	VGL			VGCP			VGPP		
			Media	F	P	Media	F	P	Media	F	P
2	103	17	8,36 ± 2,21	0,29	0,5904	0,53 ± 0,18	0,11	0,7371	0,06 ± 0,04	0,16	0,6863
	111	11	6,55 ± 2,66			0,44 ± 0,23			0,08 ± 0,05		
3	109	18	7,43 ± 2,15	0,77	0,3816	-0,30 ± 0,17	0,48	0,4885	-0,07 ± 0,04	0,70	0,4027
	111	43	9,58 ± 1,42			-0,44 ± 0,12			-0,10 ± 0,02		
4	103	39	6,18 ± 1,51	0,79	0,3743	0,24 ± 0,12	0,62	0,4334	-0,00 ± 0,03	0,55	0,4571
	107	29	8,05 ± 1,71			0,38 ± 0,14			-0,03 ± 0,03		
5	105	13	1,97 ± 2,49	0,51	0,4740	0,02 ± 0,20	0,31	0,5779	-0,03 ± 0,04	0,50	0,4794
	111	14	-0,43 ± 2,38			-0,13 ± 0,19			0,01 ± 0,04		
6	111	28	11,02 ± 1,71	0,29	0,5911	0,51 ± 0,14	0,51	0,4777	-0,04 ± 0,03	3,11	0,0787
	125	34	12,19 ± 1,59			0,64 ± 0,13			0,03 ± 0,03		
7	111	36	8,38 ± 1,52	0,07	0,7932	0,40 ± 0,13	0,00	0,9919	-0,00 ± 0,03	0,93	0,3347
	123	34	8,92 ± 1,58			0,40 ± 0,13			-0,04 ± 0,03		
8	111	17	10,87 ± 2,18	0,99	0,3200	0,74 ± 0,18	0,57	0,4491	0,05 ± 0,04	4,04	0,0452
	119	14	7,70 ± 2,38			0,55 ± 0,19			0,16 ± 0,04		

BM143

Familia	Alelo	VFL				VFCP			VFPP			
		N	Media	F	P	Media	F	P	N	Media	F	P
2	103	70	97,97 ± 4,07	0,77	0,3812	7,51 ± 0,29	1,41	0,2354	98	5,72 ± 0,08	3,42	0,0647
	111	30	104,13 ± 6,09			8,11 ± 0,43			48	5,95 ± 0,11		
3	109	53	94,22 ± 4,85	0,58	0,4480	7,25 ± 0,35	0,22	0,6369	106	5,73 ± 0,08	1,59	0,2082
	111	130	98,23 ± 3,20			7,42 ± 0,23			237	5,62 ± 0,05		
4	103	115	94,05 ± 3,48	0,37	0,5410	7,19 ± 0,25	0,06	0,8112	135	5,75 ± 0,07	3,50	0,0615
	107	95	96,75 ± 3,68			7,27 ± 0,26			138	5,59 ± 0,07		
5	105	34	92,12 ± 5,87	0,21	0,6485	7,06 ± 0,42	0,28	0,5939	70	5,88 ± 0,09	0,39	0,5350
	111	46	88,71 ± 5,02			6,78 ± 0,36			93	5,80 ± 0,08		
6	111	85	100,66 ± 3,78	0,61	0,4363	7,46 ± 0,27	0,81	0,3683	163	5,66 ± 0,06	11,13	0,0009
	125	96	104,34 ± 3,62			7,76 ± 0,26			137	5,92 ± 0,06		
7	111	107	97,52 ± 3,52	0,02	0,8925	7,45 ± 0,25	0,01	0,9162	152	5,69 ± 0,07	0,00	0,9498
	123	108	98,11 ± 3,45			7,41 ± 0,25			202	5,69 ± 0,06		
8	111	41	100,07 ± 5,50	0,29	0,5908	7,67 ± 0,39	0,01	0,9414	60	5,86 ± 0,10	9,55	0,0020
	119	35	96,01 ± 5,91			7,71 ± 0,42			56	6,29 ± 0,11		

BMS360

Familia	Alelo	N	VGL			VGCP			VGPP		
			Media	F	P	Media	F	P	Media	F	P
1	83	23	8,31 ± 1,96	0,02	0,8799	0,45 ± 0,16	0,00	0,9895	-0,10 ± 0,05	0,11	0,7408
	129	12	7,85 ± 2,60			0,45 ± 0,22			-0,07 ± 0,07		
3	81	32	9,46 ± 1,65	0,16	0,6925	0,40 ± 0,14	0,01	0,9123	-0,14 ± 0,04	0,01	0,9082
	117	37	8,64 ± 1,57			0,38 ± 0,13			-0,15 ± 0,04		
4	105	27	6,60 ± 1,82	0,02	0,9005	0,24 ± 0,15	0,10	0,7468	0,00 ± 0,05	0,02	0,8860
	117	32	6,88 ± 1,67			0,30 ± 0,14			-0,00 ± 0,04		
5	105	14	1,64 ± 2,37	0,46	0,5000	0,08 ± 0,19	0,57	0,4309	0,09 ± 0,06	2,52	0,1137
	115	14	-0,57 ± 2,36			-0,14 ± 0,19			-0,05 ± 0,06		
7	105	43	8,42 ± 1,45	0,04	0,8365	0,39 ± 0,12	0,04	0,8388	-0,01 ± 0,04	0,15	0,7025
	115	32	8,01 ± 1,67			0,35 ± 0,14			-0,03 ± 0,04		
8	115	22	9,71 ± 1,93	0,03	0,8704	0,71 ± 0,16	0,24	0,6224	0,16 ± 0,05	0,07	0,7889
	125	16	9,25 ± 2,20			0,60 ± 0,18			0,18 ± 0,06		

BMS360

Familia	Alelo	VFL				VFCP			VFPP			
		N	Media	F	P	Media	F	P	N	Media	F	P
1	83	67	100,49 ± 4,57	0,00	0,9784	7,68 ± 0,33	0,02	0,9011	203	5,63 ± 0,06	0,64	0,4235
	129	32	100,30 ± 6,09			7,75 ± 0,44			91	5,70 ± 0,08		
3	81	100	100,73 ± 3,77	0,55	0,4589	7,63 ± 0,27	0,28	0,5953	196	5,72 ± 0,06	0,17	0,6791
	117	117	97,56 ± 3,51			7,47 ± 0,25			174	5,69 ± 0,06		
4	105	81	98,13 ± 4,15	0,06	0,8110	7,42 ± 0,30	0,00	0,9442	109	5,73 ± 0,07	0,08	0,7834
	117	86	96,97 ± 4,08			7,39 ± 0,30			94	5,76 ± 0,08		
5	105	45	95,46 ± 5,09	0,90	0,3422	7,38 ± 0,37	1,46	0,2268	96	5,96 ± 0,08	4,85	0,0279
	115	46	88,91 ± 5,06			6,77 ± 0,37			77	5,72 ± 0,08		
7	105	130	97,27 ± 3,44	0,23	0,6287	7,43 ± 0,25	0,17	0,6791	205	5,70 ± 0,06	0,16	0,6925
	115	106	99,32 ± 3,65			7,55 ± 0,26			175	5,73 ± 0,06		
8	115	48	107,46 ± 5,23	1,50	0,2217	8,42 ± 0,38	2,04	0,1538	64	6,12 ± 0,10	0,05	0,8263
	125	40	99,24 ± 5,56			7,72 ± 0,40			76	6,10 ± 0,09		

BM4621

Familia	Alelo	N	VGL			VGCP			VGPP		
			Media	F	P	Media	F	P	Media	F	P
1	131	12	8,37 ± 2,64	0,01	0,9311	0,58 ± 0,22	0,14	0,7060	-0,06 ± 0,07	0,33	0,5633
	147	20	8,65 ± 2,01			0,48 ± 0,16			-0,11 ± 0,05		
2	141	15	6,21 ± 2,26	0,10	0,7483	0,42 ± 0,19	0,01	0,9051	0,06 ± 0,06	0,03	0,8527
	147	16	7,18 ± 2,20			0,39 ± 0,18			0,07 ± 0,06		
3	131	37	8,29 ± 1,50	0,27	0,6060	0,38 ± 0,12	0,08	0,7753	-0,17 ± 0,04	0,55	0,4572
	137	31	9,36 ± 1,63			0,42 ± 0,13			-0,13 ± 0,04		
4	131	36	7,20 ± 1,54	0,06	0,8013	0,28 ± 0,13	0,01	0,9340	-0,02 ± 0,04	0,29	0,5877
	153	40	6,71 ± 1,44			0,30 ± 0,12			0,01 ± 0,04		
5	137	18	-1,86 ± 2,07	2,86	0,0915	-0,23 ± 0,17	2,24	0,1354	-0,02 ± 0,05	0,69	0,4080
	163	15	3,23 ± 2,27			0,14 ± 0,19			0,05 ± 0,06		
6	149	27	11,06 ± 1,72	0,49	0,4847	0,55 ± 0,14	0,72	0,3955	-0,07 ± 0,04	1,69	0,1948
	159	37	12,55 ± 1,48			0,69 ± 0,12			-0,00 ± 0,04		
7	131	40	10,35 ± 1,42	1,76	0,1856	0,50 ± 0,12	1,11	0,2922	-0,02 ± 0,04	0,04	0,8510
	147	37	7,78 ± 1,49			0,33 ± 0,12			-0,01 ± 0,04		
8	141	11	12,13 ± 2,65	1,35	0,2453	0,82 ± 0,22	0,70	0,4045	0,18 ± 0,07	0,02	0,8895
	147	20	8,40 ± 1,98			0,60 ± 0,16			0,17 ± 0,05		

BM4621

Familia	Alelo	VFL				VFCP				VFPP			
		N	Media	F	P	Media	F	P	N	Media	F	P	
1	131	35	100,46 ± 5,89	0,04	0,8479	7,79 ± 0,43	0,01	0,9204	109	5,65 ± 0,08	0,46	0,4998	
	147	55	101,79 ± 4,57			7,74 ± 0,33			162	5,59 ± 0,06			
2	141	52	95,46 ± 4,50	0,00	0,9646	7,44 ± 0,33	0,10	0,7464	73	5,87 ± 0,08	1,48	0,2237	
	147	66	95,20 ± 4,00			7,31 ± 0,29			103	5,74 ± 0,07			
3	131	114	97,66 ± 3,22	0,46	0,4979	7,43 ± 0,23	0,36	0,5513	194	5,60 ± 0,06	0,77	0,3804	
	137	101	100,51 ± 3,42			7,62 ± 0,25			181	5,67 ± 0,06			
4	131	119	94,39 ± 3,21	0,16	0,6870	7,22 ± 0,23	0,16	0,6848	160	5,73 ± 0,06	0,00	0,9936	
	153	117	95,99 ± 3,21			7,34 ± 0,23			149	5,73 ± 0,06			
5	137	56	85,95 ± 4,40	4,63	0,0315	6,59 ± 0,32	5,11	0,0240	102	5,76 ± 0,07	1,62	0,2026	
	163	46	99,71 ± 4,90			7,64 ± 0,36			95	5,89 ± 0,07			
6	149	71	100,71 ± 3,94	1,33	0,2490	7,61 ± 0,29	0,75	0,3857	112	5,72 ± 0,07	2,47	0,1165	
	159	109	106,08 ± 3,26			7,91 ± 0,24			199	5,84 ± 0,05			
7	131	126	98,21 ± 3,07	0,03	0,8711	7,51 ± 0,22	0,03	0,8520	212	5,70 ± 0,05	0,51	0,4744	
	147	119	97,57 ± 3,18			7,46 ± 0,23			186	5,75 ± 0,06			
8	141	28	102,41 ± 6,22	0,42	0,5147	7,95 ± 0,45	0,12	0,7282	48	6,21 ± 0,11	0,88	0,3486	
	147	45	97,57 ± 4,97			7,76 ± 0,36			64	6,08 ± 0,09			

BM4311

Familia	Alelo	N	VGL			VGCP			VGPP		
			Media	F	P	Media	F	P	Media	F	P
1	105	19	8,18 ± 2,33	0,00	0,9871	0,45 ± 0,19	0,02	0,8804	-0,11 ± 0,06	0,25	0,6158
	123	18	8,23 ± 2,43			0,48 ± 0,20			-0,08 ± 0,06		
2	101	14	9,02 ± 2,58	2,08	0,1506	0,55 ± 0,21	1,24	0,2666	0,07 ± 0,07	0,47	0,4931
	105	22	4,64 ± 2,03			0,27 ± 0,17			0,12 ± 0,05		
4	101	33	7,68 ± 1,67	0,06	0,8015	0,40 ± 0,13	0,52	0,4706	0,02 ± 0,04	0,00	0,9611
	115	37	7,16 ± 1,61			0,28 ± 0,13			0,02 ± 0,04		
6	105	33	14,65 ± 1,69	6,08	0,0145	0,86 ± 0,13	5,91	0,0159	0,01 ± 0,04	0,67	0,4132
	123	31	9,28 ± 1,72			0,42 ± 0,14			-0,04 ± 0,04		
8	101	13	10,11 ± 2,49	0,04	0,8500	0,72 ± 0,20	0,06	0,8145	0,15 ± 0,06	0,13	0,7186
	115	17	10,71 ± 2,24			0,78 ± 0,18			0,18 ± 0,06		

BM4311

Familia	Alelo	VFL				VFCP				VFPP			
		N	Media	F	P	Media	F	P	N	Media	F	P	
1	105	50	95,68 ± 5,73	0,00	0,9738	7,22 ± 0,42	0,15	0,7008	155	5,60 ± 0,08	0,06	0,8099	
	123	55	95,89 ± 5,74			7,39 ± 0,42			164	5,62 ± 0,08			
2	101	64	98,21 ± 4,72	1,18	0,2775	7,47 ± 0,34	0,55	0,4567	96	5,80 ± 0,09	0,01	0,9108	
	105	77	92,21 ± 4,21			7,17 ± 0,31			109	5,79 ± 0,08			
4	101	90	99,31 ± 4,03	1,88	0,1706	7,52 ± 0,29	1,96	0,1618	121	5,68 ± 0,07	0,01	0,9269	
	115	123	93,11 ± 3,61			7,06 ± 0,26			170	5,69 ± 0,06			
6	105	99	109,53 ± 3,83	4,83	0,0283	8,09 ± 0,28	4,63	0,0318	180	5,79 ± 0,07	1,72	0,1898	
	123	79	98,89 ± 4,14			7,33 ± 0,30			147	5,68 ± 0,07			
8	101	34	98,02 ± 6,20	0,00	0,9750	7,57 ± 0,45	0,15	0,6989	50	5,96 ± 0,11	2,82	0,0936	
	115	37	97,79 ± 6,10			7,79 ± 0,44			59	6,19 ± 0,11			

CSR293

Familia	Alelo	N	VGL			VGCP			VGPP		
			Media	F	P	Media	F	P	Media	F	P
1	119	15	9,59 ± 2,30	0,03	0,8531	0,58 ± 0,19	0,00	0,9490	-0,01 ± 0,06	0,93	0,3368
	121	16	9,04 ± 2,21			0,56 ± 0,19			-0,09 ± 0,06		
2	119	13	10,49 ± 2,46	4,47	0,0353	0,61 ± 0,20	2,55	0,1113	0,07 ± 0,07	1,27	0,2606
	121	18	3,98 ± 2,07			0,21 ± 0,17			0,16 ± 0,06		
3	127	33	10,66 ± 1,62	2,54	0,1117	0,52 ± 0,13	1,69	0,1939	-0,18 ± 0,04	0,32	0,2520
	137	31	7,24 ± 1,63			0,29 ± 0,13			-0,11 ± 0,04		
6	117	31	9,61 ± 1,60	4,67	0,0314	0,45 ± 0,13	4,14	0,0427	0,02 ± 0,04	0,03	0,8569
	131	35	14,07 ± 1,51			0,79 ± 0,12			0,01 ± 0,04		
7	105	34	7,79 ± 1,53	0,01	0,9300	0,29 ± 0,13	0,20	0,6540	-0,04 ± 0,04	0,22	0,6404
	123	38	7,62 ± 1,48			0,36 ± 0,12			-0,02 ± 0,04		
8	105	13	10,10 ± 2,38	0,05	0,8220	0,76 ± 0,19	0,10	0,7503	0,12 ± 0,06	0,86	0,3547
	123	15	11,71 ± 2,26			0,85 ± 0,18			0,20 ± 0,06		

CSR293

Familia	Alelo	VFL				VFCP				VFPP			
		N	Media	F	P	Media	F	P	N	Media	F	P	
1	119	37	101,92 ± 5,03	0,89	0,3445	7,89 ± 0,36	0,43	0,5105	136	5,82 ± 0,06	0,84	0,3609	
	121	46	108,32 ± 5,60			8,21 ± 0,40			114	-0,08 ± 0,06			
2	119	59	99,35 ± 4,30	1,71	0,1913	7,52 ± 0,31	0,51	0,4746	84	0,04 ± 0,06	0,88	0,3470	
	121	65	92,09 ± 4,05			7,23 ± 0,29			92	0,14 ± 0,05			
3	127	103	102,35 ± 3,63	2,98	0,0847	7,71 ± 0,26	1,67	0,1962	194	-0,16 ± 0,04	2,30	0,1294	
	137	98	94,56 ± 3,44			7,28 ± 0,25			142	-0,11 ± 0,04			
6	117	84	99,89 ± 3,64	4,04	0,0448	7,50 ± 8,26	3,25	0,0716	158	0,03 ± 0,04	0,10	0,7563	
	131	105	108,94 ± 3,35			8,09 ± 0,24			188	-0,01 ± 0,04			
7	105	106	95,24 ± 3,42	0,40	0,5270	7,18 ± 0,24	0,94	0,3321	172	-0,06 ± 0,04	0,09	0,7703	
	123	113	97,86 ± 3,29			7,48 ± 0,24			183	-0,04 ± 0,04			
8	105	31	110,91 ± 5,89	0,33	0,5651	8,64 ± 0,42	0,22	0,6366	43	0,13 ± 0,06	4,72	0,0299	
	123	33	106,45 ± 5,95			8,37 ± 0,43			57	0,24 ± 0,06			

OarJMP8

Familia	Alelo	VGL			VGCP			VGPP			
		N	Media	F	P	Media	F	P	Media	F	P
1	127	12	10,89 ± 2,93	4,12	0,0439	0,61 ± 0,24	2,58	0,1111	-0,03 ± 0,08	0,62	0,4313
	129	19	4,65 ± 2,51			-0,20 ± 0,21			-0,10 ± 0,07		
2	127	15	3,82 ± 2,41	2,20	0,1402	0,22 ± 0,22	0,65	0,4218	0,12 ± 0,07	1,60	0,2081
	133	13	8,55 ± 2,64			0,44 ± 0,23			0,01 ± 0,07		
4	121	40	8,98 ± 1,66	0,39	0,5316	0,37 ± 0,12	0,53	0,4676	-0,01 ± 0,05	0,03	0,8639
	131	35	7,76 ± 1,74			0,26 ± 0,13			-0,01 ± 0,05		
6	123	30	14,30 ± 1,78	7,27	0,0077	0,77 ± 0,16	5,86	0,0173	-0,04 ± 0,04	0,17	0,6851
	131	29	8,43 ± 1,82			0,32 ± 0,16			-0,01 ± 0,05		

OarJMP8

Familia	Alelo	VFL				VFCP			VFPP			
		N	Media	F	P	Media	F	P	N	Media	F	P
1	127	35	101,98 ± 7,46	1,53	0,2164	7,79 ± 0,53	2,31	0,1295	108	5,62 ± 0,10	0,33	0,5640
	129	54	92,74 ± 6,38			6,98 ± 0,46			163	5,57 ± 0,09		
2	127	54	92,29 ± 5,60	1,25	0,2653	7,31 ± 0,40	0,94	0,3323	76	5,89 ± 0,09	2,34	0,5595
	133	55	99,99 ± 5,81			7,79 ± 0,42			85	5,82 ± 0,09		
4	121	116	97,55 ± 3,30	1,68	0,1956	7,47 ± 0,24	2,20	0,1380	143	-0,02 ± 0,04	0,10	0,7516
	131	116	92,37 ± 3,23			7,04 ± 0,23			155	-0,02 ± 0,04		
6	123	89	110,66 ± 4,73	5,45	0,0203	8,21 ± 0,34	3,68	0,0561	158	5,78 ± 0,07	0,00	0,9672
	131	76	98,38 ± 4,93			7,48 ± 0,35			125	5,78 ± 0,08		

McM214

Familia	Alelo	N	VGL			VGCP			VGPP		
			Media	F	P	Media	F	P	Media	F	P
1	91	13	6,40 ± 2,54	0,07	0,7896	0,32 ± 0,21	0,23	0,6354	-0,06 ± 0,07	0,03	0,8601
	99	15	7,26 ± 2,36			0,44 ± 0,19			-0,07 ± 0,06		
2	81	17	8,13 ± 2,20	1,48	0,2245	0,49 ± 0,18	1,09	0,2982	0,10 ± 0,06	0,70	0,4022
	99	20	4,73 ± 2,04			0,25 ± 0,17			0,16 ± 0,05		
3	75	44	7,54 ± 1,50	0,17	0,6812	0,30 ± 0,12	0,07	0,7974	-0,05 ± 0,05	2,72	0,1001
	103	22	8,46 ± 1,92			0,35 ± 0,16			-0,15 ± 0,04		
4	75	35	8,06 ± 1,59	0,46	0,4979	0,33 ± 0,13	0,14	0,7098	-0,00 ± 0,04	0,07	0,7938
	97	30	6,61 ± 1,67			0,27 ± 0,14			0,01 ± 0,04		
7	79	44	8,63 ± 1,45	0,27	0,6007	0,40 ± 0,12	0,24	0,6262	0,01 ± 0,04	0,01	0,9279
	99	30	7,58 ± 1,68			0,32 ± 0,14			0,01 ± 0,04		
8	79	21	9,84 ± 1,96	0,15	0,7008	0,66 ± 0,16	0,01	0,9307	0,23 ± 0,05	1,96	0,1629
	99	10	11,10 ± 2,76			0,68 ± 0,22			0,11 ± 0,07		

McM214

Familia	Alelo	VFL				VFCP				VFPP			
		N	Media	F	P	Media	F	P	N	Media	F	P	
1	91	40	93,80 ± 5,51	0,21	0,6445	7,17 ± 0,39	0,35	0,5565	117	5,65 ± 0,07	0,03	0,8615	
	99	41	97,02 ± 5,36			7,46 ± 0,38			122	5,67 ± 0,07			
2	81	65	99,18 ± 4,20	0,90	0,3443	7,60 ± 0,30	0,41	0,5239	105	5,93 ± 0,07	0,18	0,6720	
	99	72	94,15 ± 4,04			7,36 ± 0,29			96	5,89 ± 0,08			
3	75	76	97,89 ± 3,93	0,55	0,4595	7,42 ± 0,28	0,28	0,5992	222	5,80 ± 0,07	2,24	0,1345	
	103	128	94,40 ± 3,51			7,24 ± 0,25			146	5,69 ± 0,06			
4	75	112	96,78 ± 3,46	0,07	0,7953	7,32 ± 0,25	0,03	0,8720	159	5,69 ± 0,06	2,20	0,1381	
	97	83	97,97 ± 3,99			7,37 ± 0,29			108	5,81 ± 0,08			
7	79	133	100,80 ± 3,29	1,29	0,2560	7,62 ± 0,23	0,99	0,3196	207	5,77 ± 0,06	0,05	0,8298	
	99	90	95,99 ± 3,83			7,32 ± 0,27			138	5,75 ± 0,07			
8	79	51	98,72 ± 5,04	0,44	0,5093	7,72 ± 0,36	0,25	0,6194	69	6,35 ± 0,10	8,58	0,0034	
	99	20	104,06 ± 7,34			8,00 ± 0,53			33	5,94 ± 0,13			

OarJMP12

Familia	Alelo	N	VGL			VGCP			VGPP		
			Media	F	P	Media	F	P	Media	F	P
1	138	15	8,78 ± 2,62	0,24	0,6243	0,59 ± 0,22	2,23	0,1370	-0,07 ± 0,07	0,06	0,8034
	140	18	7,26 ± 2,41			0,21 ± 0,22			-0,09 ± 0,06		
3	136	36	7,98 ± 1,68	0,37	0,5443	0,33 ± 0,15	0,19	0,6655	-0,17 ± 0,04	0,19	0,6646
	140	20	9,43 ± 2,13			0,42 ± 0,18			-0,15 ± 0,05		
4	126	32	7,18 ± 1,73	0,23	0,6317	0,36 ± 0,15	0,18	0,6689	0,01 ± 0,04	0,05	0,8312
	142	43	6,19 ± 1,67			0,29 ± 0,15			0,02 ± 0,04		
8	130	17	10,29 ± 2,17	0,45	0,5054	0,67 ± 0,18	0,56	0,4536	0,08 ± 0,06	1,58	0,2160
	144	18	12,24 ± 2,25			0,85 ± 0,18			0,18 ± 0,06		

OarJMP12

Familia	Alelo	VFL				VFCP				VFPP			
		N	Media	F	P	Media	F	P	N	Media	F	P	
1	138	49	103,78 ± 5,68	2,07	0,1506	8,03 ± 0,41	2,79	0,0955	152	5,70 ± 0,08	0,00	0,9648	
	140	51	94,53 ± 5,83			7,25 ± 0,42			148	5,69 ± 0,09			
3	136	113	99,91 ± 4,20	0,43	0,5108	7,56 ± 0,31	0,14	0,7088	211	5,67 ± 0,07	1,14	0,2851	
	140	63	103,12 ± 4,74			7,70 ± 0,35			101	5,75 ± 0,08			
4	126	108	94,41 ± 4,11	0,16	0,6876	7,17 ± 0,30	0,11	0,7453	157	5,69 ± 0,07	0,06	0,7997	
	142	127	96,08 ± 4,40			7,27 ± 0,32			155	5,67 ± 0,07			
8	130	36	109,18 ± 5,51	0,05	0,8307	8,46 ± 0,40	0,05	0,8304	62	5,99 ± 0,11	0,50	0,4793	
	144	44	110,63 ± 5,78			8,56 ± 0,42			63	6,09 ± 0,11			