

# Métodos de mapeo de *loci* de rasgos cuantitativos y sus aplicaciones potenciales en la industria lechera

## Quantitative trait *loci* mapping methods and potential applications in the dairy cattle industry

José Moro-Méndez<sup>a</sup>, John F. Hayes<sup>a</sup>

### RESUMEN

En todos los autosomas bovinos se han detectado *loci* con efecto sobre producción de leche, grasa y proteína (kilos y porcentaje), resistencia a mastitis, y conteo de células somáticas. La detección de *loci* de rasgos cuantitativos (QTL) depende de la presencia de desequilibrio de ligamiento (DL) entre los marcadores genéticos y los QTL en la población bajo estudio. Debido a que diferentes poblaciones pueden tener diferentes frecuencias alélicas y cantidades de DL, es posible que marcadores asociados específicamente con un QTL con efecto sobre rasgos cuantitativos en alguna población, puedan no tener la misma asociación con el mismo QTL en otra población; más aún, el QTL puede tener un efecto diferente o puede no existir; de tal modo que independiente del potencial éxito en la detección de QTL en otros países, el mapeo de QTL en animales domésticos es una actividad que debe realizarse dentro del país interesado en aplicar selección asistida por marcadores genéticos (SAM). El objetivo de esta revisión es presentar los principales resultados en la detección de QTL para rasgos productivos y resistencia a mastitis en ganado lechero, así como discutir varios factores que pueden afectar la detección de QTL. También se proporciona información útil para el diseño de programas de mapeo de QTL en ganado lechero en México.

**PALABRAS CLAVE:** *Loc*i de rasgos cuantitativos (QTL), Desequilibrio de ligamiento, Ganado lechero.

### ABSTRACT

All bovine autosomes have been reported to be harboring quantitative trait loci (QTL) with effects on milk, fat and protein (kg and percentage), resistance to mastitis, and/or SCS. The detection of QTL depends on the presence of linkage disequilibrium (LD) between the genetic markers and the QTL in the population under study. Because different populations are likely to have different allelic frequencies and amounts of LD, it is possible that markers associated with a particular QTL affecting quantitative traits in a population might not have the MASE association with the MASE QTL in another population; thus regardless of the potential success of QTL mapping in other countries, QTL mapping in dairy cattle is an activity that must be undertaken within a country interested in applying marker assisted selection. The objective of this review is to present the main results in the detection of QTL in dairy cattle (mainly in Holstein) for both yield and mastitis resistance traits, as well as to discuss several factors that might affect QTL mapping. Useful information for the design of QTL mapping programs in dairy cattle in Mexico is provided.

**KEY WORDS:** Quantitative trait *loci* (QTL), Linkage disequilibrium, Dairy cattle.

### INTRODUCCIÓN

Se estima que México tiene infraestructura y recursos humanos para el desarrollo de la biotecnología, sin embargo, muestra rezagos en el desarrollo de aplicaciones como biotecnología

### INTRODUCTION

Mexico has been assessed to have important infrastructure and human resources to develop biotechnology; however, it is also slow in developing applications such as in marine

Recibido el 7 de junio de 2005 y aceptado para su publicación el 10 de febrero de 2006.

<sup>a</sup> Animal Science Department, McGill University, Ste-Anne-de-Bellevue, Québec, Canada. H9X3V9; jose.moro@mail.mcgill.ca. Correspondencia al primer autor.

Trabajo parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT) a través de una beca doctoral para el primer autor.

marina, animales transgénicos, y secuenciado y análisis de genomas<sup>(1)</sup>. El análisis de genomas es crítico en la identificación precisa de efectos génicos, mismos que son esenciales en la selección asistida por marcadores genéticos (MAS, por sus siglas en inglés), introgresión de genes, o transgénesis. La identificación de genes con efecto benéfico sobre características económicamente importantes para la industria lechera mexicana debe promoverse debido a la serie de beneficios que la acompañan cuando es exitosa. El objetivo de este trabajo es revisar evidencia de QTL detectados con efecto sobre características cuantitativas en ganado lechero y enfatizar principios generales de métodos de análisis; esta información puede ser útil en el desarrollo de programas para el mapeo de QTL en el ganado lechero mexicano.

#### ***Locí de rasgos cuantitativos y marcadores genéticos***

Se considera que las características cuantitativas más importantes en producción animal están bajo control de varios *locí*<sup>(2)</sup>, que en consecuencia han sido denominados *locí* de rasgos cuantitativos (QTL, por sus siglas en inglés). Rara vez la sola detección de QTL constituye evidencia suficiente para explicar la base genética de rasgos cuantitativos; para lograr la disección genética completa de un fenotipo se requiere conocer las identidades y número de todos los genes que lo definen, las tasas de mutación de esos *locí*, el número e identidades de los genes que afectan el fenotipo dentro y entre poblaciones, y dentro de especies, así como los mecanismos de acción de los genes<sup>(3)</sup>. Adicionalmente, se necesita conocer el papel de las marcas o impresiones genómicas (*genomic imprinting*) que en forma de metilaciones de bases (principalmente citosinas) afectan la expresión génica; las metilaciones pueden heredarse, y tienen gran relevancia en el destino de los transgenes<sup>(4,5)</sup>. Otro factor involucrado es la existencia de ácido ribonucleico intrónico (iRNA, por sus siglas en inglés)<sup>(6)</sup> que puede afectar la expresión génica, y aunque falta ser probado, alterar el fenotipo resultante debido a interacciones con QTL. Hasta ahora, ninguna característica ha sido analizada al nivel de resolución descrito anteriormente; sin embargo, existen formas de analizar parcialmente los factores genéticos que

biotechnology, transgenic animals, sequencing and analysis of genomes<sup>(1)</sup>. The analysis of genomes is critical for the accurate identification of gene effects which are essential in marker assisted selection (MAS), gene introgression, or transgenesis. The identification of genes with beneficial effects on economically important traits in the context of the Mexican dairy industry should be encouraged given the series of benefits that accompany it when successful. The objective of this review is to analyze evidence concerning the detection of genes with effects on quantitative traits in dairy cattle, as well as to emphasize general principles of methods of analysis; this information may be useful in the development of gene mapping programs for Mexican dairy cattle.

#### ***Genetic markers and quantitative trait Loci***

The most important quantitative traits in animal production are thought to have several *loci* underlying them<sup>(2)</sup>. These *loci* have been termed Quantitative Trait *Loci* (QTL). The sole detection of QTL is seldom enough evidence to explain the genetic basis of quantitative traits. A complete understanding of how a phenotype is genetically determined requires the knowledge of the identities and number of all genes defining the phenotypic trait, mutation rates of these *loci*, the number and identities of genes affecting the trait within and between populations, and populations within species, as well as their mechanism of action<sup>(3)</sup>. Additionally, it is necessary to know the role of genomic imprinting in the population under study; methylation of bases (mainly cytosines) has been pointed out as responsible for the control of gene expression; methylations are inherited, and they are highly relevant in the fate of transgenes<sup>(4,5)</sup>. Another factor in play is the existence of intronic rebonucleic acid (iRNA)<sup>(6)</sup> which may affect gene expression, and, though yet to be proven, alter the resulting phenotype through interactions with QTL. Nowadays no trait has been analyzed at that level of resolution. However, there are ways to partially dissect the underlying genetics of quantitative traits. A first step is to map QTL affecting economically important traits.

Different types of markers have been used to map QTL. For instance, the first attempt to detect a

controlan los rasgos cuantitativos. Un primer paso es el mapeo de QTL con efecto sobre características con importancia económica.

Diferentes marcadores se han utilizado para identificar QTL. Por ejemplo, el primer intento para detectar un QTL estudió el peso de frijoles (*Phaseolus vulgaris*) con el uso del pigmento de las semillas como marcador fenotípico<sup>(7)</sup>. Otro tipo de marcador son polimorfismos proteicos, como los grupos sanguíneos. Este tipo de marcador fue usado, aunque sin éxito, durante los sesentas para buscar QTL con efecto sobre producción de leche en ganado danés<sup>(8)</sup>. Ese fue el primer intento de usar el análisis de varianza para encontrar diferencias en rendimiento atribuibles a polimorfismos. Con los años, una variedad de herramientas de genética molecular ha ayudado en la generación de varios nuevos tipos de marcadores genéticos. Un marcador genético es una variación en la secuencia a nivel del ADN que puede usarse para identificar segmentos del genoma que influyen en rasgos cuantitativos<sup>(9)</sup>. Durante los ochentas y noventas varios tipos de marcadores moleculares fueron desarrollados, por ejemplo: polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción, ADN amplificado al azar, y polimorfismos de nucleótidos individuales (RFLP, RAPD, y SNP, respectivamente, por sus siglas en inglés)<sup>(10,11,12)</sup>. Para que un marcador genético sea útil debe ser altamente polimórfico y codominante<sup>(10,13)</sup>. Aunque en el pasado la mayoría de los marcadores genéticos se consideraban sin significado biológico debido a su localización intrónica, esta situación ha cambiado; hay evidencia de que el iRNA (ácido ribonucleico derivado de la región intrónica y eliminado durante la transcripción) tiene un rol en regulación génica<sup>(14)</sup> por medio de un mecanismo de silenciado de genes denominado interferencia de ARN (RNAi, por su siglas en inglés)<sup>(15)</sup>.

### ***Métodos para detectar QTL en ganado lechero***

Existen varios métodos para detectar genes mayores y QTL. Mientras algunos métodos no hacen uso de marcadores genéticos, otros dependen grandemente de ellos. Decidir el uso o no de marcadores genéticos es el paso inicial en la disección genética de características cuantitativas.

QTL studied the weight of beans (*Phaseolus vulgaris*) by using the pigment of the seeds as a phenotypic marker<sup>(7)</sup>. A different type of marker is protein polymorphism, such as blood groups. Such markers were used without success during the sixties to search for QTL affecting milk production in Danish cattle<sup>(8)</sup>. This was also the first attempt to use analysis of variance to find differences in performance attributable to polymorphisms. Over the years, molecular tools have helped generate several new types of genetic markers. A genetic marker at the DNA level is a sequence variation that can be used to identify certain segments of the genome that influence quantitative traits<sup>(9)</sup>. During the eighties and nineties several types of genetic markers were developed, for example: restriction fragment length polymorphisms (RFLP), randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and single nucleotide polymorphism (SNP)<sup>(10,11,12)</sup>. For a genetic marker to be useful it should be highly polymorphic, and co-dominant<sup>(10,13)</sup>. Although in the past most of the genetic markers were not considered to be biologically significant due to their location in the intronic regions, this situation has changed; evidence points out that iRNA (RNA spliced during the transcription process) has a role in gene regulation<sup>(14)</sup> through a mechanism of gene silencing called RNA interference (RNAi)<sup>(15)</sup>.

### ***Methods to detect QTL in dairy cattle***

There are several methods to detect major genes and QTL. While some methods make no use of genetic markers, others rely heavily on them. Deciding whether to use genetic markers or not is the initial step towards the genetic dissection of quantitative traits.

Some marker-free approaches are based on analysis of multimodal distributions, departure from normal distribution, heterogeneity of variances, or offspring-parent resemblance<sup>(13,16)</sup>, while segregation analysis, the most powerful application to detect major genes with no information of genetic markers, is based on the comparison of the likelihood obtained from two models: a model with transmission probabilities (0, 1/2, and 1; which

Algunas estrategias que no usan marcadores genéticos están basadas en análisis de distribución multimodal, desvío de la distribución normal, heterogeneidad de varianzas, o parecido cría-progenitor<sup>(13,16)</sup>; otro método es el análisis de segregación, el más poderoso para detectar genes mayores sin información de marcadores, que está basado en la comparación de las verosimilitudes obtenidas a partir de dos modelos; un modelo incluye probabilidades de transmisión (0, 1/2, y 1; que pueden obtenerse a partir de pedigrís), y el otro modelo se define con probabilidades de transmisión iguales (a este modelo se le llama *no genético*)<sup>(17)</sup>. Un incremento significativo en la verosimilitud sugiere la existencia de un gen mayor segregando en la población. Algunas modificaciones propuestas<sup>(18)</sup> consisten en establecer un modelo con efectos fijos no genéticos y un modelo con un locus con efecto mayor. La ventaja del análisis de segregación es que las observaciones fenotípicas pueden usarse para detectar genes mayores cuando no existen marcadores genéticos disponibles; asimismo, su principal limitación es que no proporciona ninguna información sobre la posición del gene responsable de la variación del rasgo cuantitativo.

Métodos como el de mapeo por intervalos compuestos<sup>(19)</sup>, mapeo a intervalos utilizando regresión<sup>(20)</sup>, y modelos lineales utilizando análisis de varianza hacen uso de marcadores genéticos para probar asociaciones entre estos y rasgos cuantitativos<sup>(8,10)</sup>. Estos métodos pueden detectar segmentos de cromosomas que alojan QTL. Si LD está presente entre un marcador genético y un QTL, marcadores con efecto significativo pueden encontrarse por análisis estadísticos. Respecto a los marcadores genéticos, los análisis pueden realizarse utilizando marcadores anónimos o utilizando marcadores de genes con función fisiológica conocida<sup>(9)</sup>.

Con respecto a la metodología estadística utilizada para estimar efectos de QTL, hay dos métodos principales: modelos lineales utilizando análisis de varianza y métodos de máxima verosimilitud. La aplicación de análisis de varianza para detectar asociaciones entre marcadores genéticos y rasgos

can be obtained from pedigrees), and a model with equal transmission probabilities (referred to as non-genetic model)<sup>(17)</sup>. A significant increase in the likelihood is taken as an indication that a major gene is segregating in the population. Proposed modifications<sup>(18)</sup> involve fitting an initial model with fixed non-genetic effects and then a model with a major locus effect. The advantage of segregation analysis is that phenotypic observations may be used to detect major genes when DNA markers are not available; likewise, its main limitation is that it gives no information regarding the position of the gene responsible for the variation of the quantitative trait.

Methods such as composite interval mapping<sup>(19)</sup>, regression interval mapping<sup>(20)</sup>, and linear models using analysis of variance<sup>(8)</sup> make use of genetic markers to test for associations between them and quantitative traits<sup>(8,10)</sup>. These methods can detect chromosomal segments that harbor QTL. If LD is present between a genetic marker and a QTL underlying a quantitative trait, significant marker effects may be found through statistical analyses. With regard to the genetic markers, analyses may be performed using anonymous markers or using markers of genes with known physiological function<sup>(9)</sup>.

With respect to the statistical methodology used to estimate QTL effects, there are two main approaches: linear models using analysis of variance and maximum likelihood methods. Application of analysis of variance to detect associations between genetic markers and phenotypic traits (which suggest the presence of a QTL linked to the genetic marker affecting the trait) has been widely applied, mainly because it is relatively easy to perform using standard statistical software. Variations of methodology proposed Weller, Kashi and Soller<sup>(21)</sup> have been applied to detect QTL in dairy cattle<sup>(22,23)</sup>. A few studies<sup>(24,25)</sup> have used maximum likelihood methodology in which the likelihood of the model given the phenotypes and marker genotypes is compared under alternative assumptions regarding the position of the QTL (and thus recombination rate between the marker and the QTL). Likelihood methods are considered more powerful than ANOVA methods; however the

fenotípicos (lo cual sugiere la presencia de un QTL ligado al marcador genético con efecto sobre el rasgo) ha sido ampliamente difundida, debido principalmente a la relativa facilidad con la que se pueden realizar con programas estadísticos estándar. Variaciones a la metodología propuesta por Weller, Casí y Soller<sup>(21)</sup> se han aplicado para detectar QTL en ganado lechero<sup>(22,23)</sup>. Algunos estudios<sup>(24,25)</sup> han usado la metodología de máxima verosimilitud, en la cual la verosimilitud del modelo considerando los fenotipos y los genotipos dados por los marcadores es comparado con la verosimilitud de modelos alternos que suponen diferentes posiciones del QTL (es decir, suponen diferentes tasas de recombinación entre el(los) marcador(es) y el QTL). Los métodos que usan máxima verosimilitud son considerados más poderosos que los métodos que usan análisis de varianza, sin embargo, la construcción de funciones de verosimilitud es compleja debido al gran número de posibles genotipos requerido.

### ***Diseños experimentales para detectar QTL en ganado lechero***

El uso de marcadores genéticos en análisis de asociación para identificar QTL se basa en el tipo de asociación que exista entre un marcador genético y un QTL. Un marcador genético puede: 1) afectar directamente la característica, es decir, el marcador es el QTL, o 2) estar en DL con el QTL que afecta la característica, lo que implica, aunque no necesariamente, que el marcador está físicamente ligado al QTL. En estudios de asociación es difícil establecer si el marcador está estrechamente ligado a un QTL (o a un grupo de QTL) o si el marcador es de hecho el gen que afecta la característica. Cuando no existe recombinación entre el marcador y el QTL no hay manera, en estudios de asociación, de diferenciar al marcador del QTL, y en ese caso para usos prácticos el marcador es el QTL. Si dos genes segregan juntos (esto es, los dos genes tienen una asociación no aleatoria) se dice que están en DL. Ligamiento físico puede producir DL, pero incluso dos alelos en diferentes cromosomas (esto es, no ligados físicamente) pueden estar en DL<sup>(26,27)</sup>. Así, se debe enfatizar que DL no requiere necesariamente de ligamiento físico<sup>(28)</sup>.

construction of likelihood functions is complex due to the large number of possible genotypes required.

### ***Experimental designs for QTL mapping in dairy cattle***

The use of genetic markers in association studies to map QTL can rely on the kind of relationship between a genetic marker and a QTL. A genetic marker can be either: 1) Directly affecting the trait, i.e.: the marker is the QTL, or 2) in LD with QTL affecting the trait, which implies, though not necessarily, that the marker is physically linked to the QTL. In association studies it is difficult to establish whether a marker is tightly linked to a QTL (or a cluster of QTL) or whether it is actually the gene affecting the trait. When recombination between the marker and the QTL is zero, there is no way, in association studies, to differentiate the marker from the QTL and for all practical purposes the marker is the QTL. If two genes segregate together (i.e. the two genes are in non-random association) they are said to be in LD. Physical linkage can produce LD, but even two alleles in different chromosomes (i.e.: not physically linked) can be in LD<sup>(26,27)</sup>. Thus, it has to be emphasized that LD does not necessarily require physical linkage<sup>(28)</sup>. Not all alleles segregating together are physically linked. Linkage disequilibrium between non-physically linked alleles has a shorter duration than the LD of physically linked alleles. The duration of the LD from linked genes depends on the rate of recombination. The further apart two genes are on the chromosome, the higher the rate of recombination between them. The presence of selection, migration, mutation and/or genetic drift in the population is necessary to create and maintain LD between genes not physically linked.

For dairy cattle, there are two experimental designs that facilitate the detection of QTL: the daughter design (DD) and the granddaughter design (GDD). The DD<sup>(8,29)</sup> consists in the use of the phenotypic information of progeny homozygous for alternate alleles from heterozygous sires (for the relevant markers) to test the hypothesis of association between the markers and the quantitative trait. The

No todos los genes segregando juntos están físicamente ligados, y el DL entre alelos no ligados físicamente tiene una duración más corta que el DL entre alelos ligados físicamente. La duración del DL de genes ligados físicamente depende de la tasa de recombinación entre ellos; mientras más separados estén dos genes uno del otro sobre el mismo cromosoma, la tasa de recombinación será mayor. La creación y mantenimiento de DL entre genes que no están ligados físicamente depende de la presencia de selección, migración, mutación y deriva genética en la población.

Existen dos diseños experimentales que facilitan la detección de QTL en ganado lechero: el diseño hija (DH) y el diseño nieta (DN). El DH<sup>(8,29)</sup> consiste en el uso de la información fenotípica de progenie homocigota (para alelos alternos) de sementales heterocigotos (para los marcadores de interés) para probar la hipótesis de asociación entre los marcadores y el rasgo cuantitativo. El otro diseño, el DN<sup>(21)</sup>, consiste en genotipificar hijos de sementales heterocigotos (para los marcadores de interés), y recolectar medidas fenotípicas (como valores genéticos, desviaciones de producción de las hijas, y habilidades de transmisión predichas) a partir de la progenie (esto es, vacas en control de producción, nietas de los sementales). Generalmente, el DN es preferido sobre el DH debido al bajo costo de genotipificado. En el DH un posible modelo estadístico podría incluir los efectos de marcador genético, semental, y otros efectos ambientales. Un efecto significativo del marcador indica que existe un QTL segregando (en LD con el marcador en la población bajo estudio)<sup>(21,29)</sup>. En el DN un posible modelo estadístico para mapear QTL a nivel poblacional podría incluir el efecto del marcador y el efecto de los toros (esto es, hijos y sementales). Un efecto significativo del marcador con este modelo tiene la misma interpretación que el modelo bajo el DH<sup>(21,29)</sup>; pero con el DN, también es posible definir un modelo para detectar QTL a nivel familiar, incluso cuando el marcador pueda estar en equilibrio de ligamiento con el QTL a nivel de la población. El análisis intrafamiliar (bajo el DN) puede incluir efectos del abuelo paterno, marcador (heredado por los toros) anidado dentro del abuelo paterno, y toro (hijos de los

other design, the GDD<sup>(21)</sup>, consists in genotyping sons of heterozygous (for the markers of interest) sires, and retrieving phenotypic measurements (i.e. Estimated Breeding Values, Daughter Yield Deviation, or Estimated Transmitting Abilities for the traits of interest) from the progeny (i.e. Granddaughters in milk recording). Generally, the GDD is preferred over the DD due to the low cost of genotyping in this design. In the DD a possible statistical model might include the effect of the marker, sire, and other environmental effects. A significant effect for the marker indicates that there is a QTL segregating (in population wide linkage disequilibrium with the marker) in the population<sup>(21,29)</sup>. In the GDD a possible statistical model to map QTL across the population is to fit a model with the effect of the marker and the effect of the bulls (i.e. sons and their sires). A significant effect of the marker under this model has the MASE interpretation as in the model under the DD<sup>(21,29)</sup>. Also, under the GDD it is possible to fit a model to detect QTL at family level, even when the marker may be at linkage equilibrium with the QTL at population level. The within-family analysis (under the GDD) might include effects of grandsire, marker (inherited by sons) nested within grandsire, and sons nested within marker and grandsire<sup>(29)</sup>. A significant effect for the marker indicates that the marker is linked within families to a QTL affecting the trait<sup>(26)</sup> (i.e. LD will always exist within families if there physical linkage of the QTL to the marker). The within-family analysis may be performed pooling all the grandsire families, or within each grandsire-family<sup>(29)</sup>. It can be seen that GDD is not a requirement to run an across-population analysis; however, once information has been collected under a GDD having in mind to perform within-family analyses, it is feasible to run across-population analyses as those performed under DD. In that way the hypothesis of association between the marker(s) and the trait(s) may be tested at population, and at family level. In summary, DD and GDD will allow the detection of QTL at the population level (which implies that there is LD between the marker and the QTL, even between genes not physically linked) or at within-family level (i.e. LD due to physical linkage).

abuelos paternos) anidado dentro del marcador y abuelo paterno<sup>(29)</sup>. Un efecto significativo del marcador indica que el marcador está ligado dentro de familias a un QTL afectando la característica<sup>(26)</sup> (esto es, DL siempre existirá dentro de familias si hay ligamiento físico entre el QTL y el marcador). El análisis intrafamiliar puede ser realizado considerando todas las familias de abuelos al mismo tiempo, o dentro de cada familia<sup>(29)</sup>. Se puede apreciar que el DN no es requerimiento para realizar análisis poblacionales, sin embargo, una vez que la información se ha colectado con un DN teniendo como propósito la realización de análisis intrafamiliares, es factible realizar análisis poblacionales como los realizados con DH. De esa manera la hipótesis de asociación entre el marcador(es) y la(s) característica(s) cuantitativa(s) puede(n) probarse a nivel de la población y a nivel familiar. Resumiendo, los DH y DN permitirán la detección de QTL a nivel poblacional (lo que implica que existe DL entre el marcador y el QTL, incluso entre genes que no están ligados físicamente) o a nivel familiar (donde el DL se debe a ligamiento físico del marcador y el QTL).

#### ***Factores a considerar en estudios de asociación***

A pesar del número de QTL detectados con influencia sobre características económicamente importantes, el uso de esos QTL dentro de programas de mejoramiento es limitado; varios posibles factores causantes de lo anterior han sido discutidos en literatura sobre el tema. El retraso en el uso de QTL dentro de esquemas de MAS ha sido atribuido a la falta de certeza sobre la existencia de los QTL o si los QTL están segregando en la población<sup>(30)</sup>. Esta falta de certeza está relacionada al hecho de que algunos resultados significativos reportados en la literatura pueden haber ocurrido debido al azar. Por ejemplo, de 2,392 pruebas de significancia realizadas (para detectar QTL con efecto sobre producción y composición de leche, conformación, y salud)<sup>(22)</sup>, se detectaron 32 efectos significativos ( $P < 0.01$ ); a este nivel de significancia, se podrían esperar 24 efectos significativos debido al azar. El anterior es un problema común de comparaciones múltiples cuando varias hipótesis se prueban con la misma base de datos.

#### ***Factors to consider in association studies***

Despite the number of QTL reported with influence on economically important traits, the use of these QTL in breeding programs appears quite limited. Several factors affecting the use of detected QTL in breeding programs have been discussed in the literature. The delay in the use of QTL in marker assisted selection (MAS) schemes has been ascribed to the uncertainty about whether the QTL are real and whether the QTL are segregating in the breeding population<sup>(30)</sup>. This uncertainty is in part related to the fact that some significant effects reported in the literature may occur by chance. For instance, from 2,392 significance tests (performed to map QTL affecting milk yield, milk composition, conformation, and health)<sup>(22)</sup>, 32 significant effects at  $P < 0.01$  were observed; at that significance level, one would expect 24 significant effects by chance. This is a common problem of multiple comparisons when several hypotheses are tested with the MASE data set. The problem of multiple comparisons in QTL mapping is increased by the fact that genetic markers on the MASE chromosome are not independent; hence multiple tests done with the MASE data set will increase the chance of declaring a significant QTL even when the QTL does not exist. In other words, there will be higher probabilities of rejecting the null hypothesis of no association between the marker and the quantitative trait when in fact it is true (i.e. Type I error).

The problem of multiple comparisons in QTL mapping has been addressed by several authors, the most frequent citation being Churchill and Doerge (1994)<sup>(31)</sup>. These authors developed an empirical method to obtain threshold values based on permutation tests, an approach first proposed (although not for QTL mapping) by Fisher in his *Design of experiments*, published in 1935. Basically, the method consists in the repeated random shuffling of the quantitative trait values with regard to the individuals under study, while holding the marker data constant. The permuted data are then used to analyze marker effects. The test statistics obtained from each permutation are stored and the *p-values* stored are used to obtain critical values to test hypothesis with the original data. It was determined that 1000 permutations are

El problema de comparaciones múltiples en mapeo de QTL es exacerbado por el hecho de que los marcadores genéticos sobre el mismo cromosoma no son independientes; como consecuencia, la realización de múltiples pruebas de hipótesis con la misma base de datos incrementará la probabilidad de detectar QTL incluso cuando en realidad el QTL no exista. En otras palabras, habrá alta probabilidad de rechazar la hipótesis nula de no asociación entre el (los) marcador(es) y el (los) rasgo(s) cuantitativo(s) cuando en realidad es cierta (Error tipo I).

El problema de comparaciones múltiples en detección de QTL ha sido abordado por distintos autores, siendo la cita más frecuente Churchill y Doerge<sup>(31)</sup>. Estos autores propusieron un método empírico para obtener valores umbral basado en pruebas de permutación, una estrategia primeramente elucidada (aunque no para la detección de QTL) por Fisher en su *Diseño de Experimentos*, publicado en 1935. Básicamente, el método consiste en realizar repetidos reordenamientos aleatorios de la característica cuantitativa con respecto a los individuos en estudio, mientras la información de los marcadores se mantiene inalterada en cada individuo. Los datos reordenados (permutados) son usados para analizar el efecto de los marcadores genéticos sobre el rasgo cuantitativo. Las pruebas estadísticas obtenidas a partir del análisis de cada grupo de datos permutados son almacenadas y los valores de probabilidad (*p-values*) que se almacenaron se usan para obtener valores umbrales para probar las hipótesis con los datos originales. Se ha determinado que 1000 permutaciones son suficientes para estimar valores de probabilidad a nivel experimental de 5%, y con ello reducir la probabilidad de errores tipo I<sup>(31)</sup>.

Algunos de los efectos positivos reportados en la literatura relacionada con QTL pueden ser debido a DL producido por ligamiento entre un alelo en particular y un QTL en algunas familias, más que debido a DL entre un alelo y un QTL con efecto sobre la característica a nivel de la población. Por ejemplo, en un estudio<sup>(32)</sup> algunos de los QTL detectados con efecto sobre el conteo lineal de células somáticas (CLCS) tuvieron un efecto en

suficiente para estimar experiment-wise *p-values* at 5% level of significance<sup>(31)</sup>, and hence reduce the probability of type I errors.

Some of the positive effects reported in the literature concerning QTL may be due to LD produced by linkage between a specific marker allele and QTL within some families, rather than to LD between a marker and a QTL with effect on the trait across the population. For example, in a study<sup>(32)</sup> some of the detected QTL affecting SCS had an effect in some of the eight grandsire families analyzed, but not in all of them. Only one marker allele was found to be associated with lower DYD values for SCS, regardless of grandsire family. QTL effects within families imply that MAS must be applied in a per family basis rather than in a population approach. Among the factors which create LD (even among genes that are not linked) are selection, migration, mutation, and random drift<sup>(13)</sup>. All of these factors are present in dairy cattle populations. Therefore, methods chosen to study QTL-markers associations, and the interpretation drawn from the results, have to take into account these factors in order to formulate conclusions. Association studies have a resolution of only about 20 cM<sup>(29)</sup>. Within this wide range hundreds of genes may be located; hence the importance of refining and constantly analyzing the region where a QTL has been mapped, in order to obtain a more precise location of the underlying genes. Ultimately, a combination of techniques (linkage analysis, evolutionary tree mapping, comparative mapping, association analysis, fine mapping, positional cloning, differential gene expression, epigenetic analysis) may be necessary to identify the gene underlying the QTL<sup>(33,34)</sup>. Information about the genetic control of economically important traits has accumulated since the first major study to map QTL in dairy cattle was published in 1995<sup>(35)</sup>. By now, almost all the bovine autosomes (BTA) have been reported to harbor QTL with effects on both yield and health traits<sup>(36)</sup>. Although results vary, some conclusions and lessons can be drawn from these.

#### ***QTL studies in dairy cattle: yield traits***

QTL for milk production were mapped for the first time<sup>(32)</sup> by genotyping 159 DNA markers on 1,518

algunas de las ocho familias de sementales analizadas, pero no en todas ellas. Sólo se encontró un marcador en asociación con valores de desviación de producción de las hijas más bajos para conteos celulares somáticos (CCS), sin importar la familia. Efectos de QTL dentro de familias implica que la selección asistida por marcadores genéticos debe ser aplicada a nivel familiar en vez de usar una estrategia poblacional. Ya se ha mencionado que entre los factores que crean DL (incluso entre genes que no están ligados) se cuenta a la selección, migración, mutación, y deriva genética<sup>(13)</sup>. Todos estos factores se encuentran en poblaciones de ganado lechero. Por lo anterior, los métodos escogidos para estudiar las asociaciones entre marcadores genéticos y QTL, y la interpretación generada a partir de los resultados, tienen que tomar en cuenta los factores previamente mencionados con el objeto de formular conclusiones.

La resolución de los análisis de asociación es sólo alrededor de 20 cM<sup>(29)</sup>. Dentro de este amplio rango podría haber cientos de genes; de ahí la importancia de refinar y analizar, de manera regular y constante, la región donde el QTL haya sido localizado con el objeto de obtener una localización más precisa de los genes subyacentes. En última instancia, una combinación de técnicas (análisis de ligamiento, mapeo genético con árboles evolutivos, análisis comparativo de genomas, análisis de asociación, mapeo fino, clonado posicional, expresión diferencial de genes, análisis de epigenética) parece ser necesaria para identificar los genes subyacentes al QTL<sup>(33,34)</sup>. Desde que el primer estudio para identificar QTL en ganado lechero fue publicado en 1995<sup>(35)</sup> se ha acumulado información sobre el control genético de características económicamente importantes. Prácticamente en todos los autosomas bovinos (BTA) se han encontrado QTL con efecto sobre producción de leche y características de salud<sup>(36)</sup>. Aunque los resultados varían, algunas conclusiones y lecciones pueden obtenerse a partir de ellos.

### ***QTL para características productivas***

Loci de rasgos cuantitativos para producción de leche fueron identificados por primera vez<sup>(32)</sup> al

US Holstein sires (with more than 150,000 daughters); QTL affecting milk yield were found on five chromosomes: 1, 6, 9, 10, and 20. The evidence implied that QTL marker-alleles were in association with the quantitative trait in some families. In another study<sup>(23)</sup> 13 families of Norwegian cattle were used to analyze associations between milk yield traits and casein haplotypes. The analyses included the effect of the grandsire, the haplotypes nested within grandsire, and the random effect of sire nested within haplotype. They found a significant effect of one of the haplotypes in five grandsire families; however, they did not find associations when they performed the analysis pooling all grandsire families. The authors suggest that at least in some families a particular haplotype was associated with a favorable QTL allele affecting protein yield.

In another study, relationships between genetic variants within the 3<sup>rd</sup> intron of the bovine Growth Hormone gene and the estimated transmitting abilities (ETA) of milk, fat and protein yields in 172 Canadian bulls (100 Holstein, 51 Ayrshire, and 21 Jersey) were found<sup>(37)</sup>. The model included the fixed effect of the genotype of the bulls and the random residual effect. In this analysis no significant effects were found for any of the genotypes. In the MASE study, the authors report using  $\chi^2$  tests that detected differences in the genotypic proportions of LL and LV genotypes (L= leucine, V= valine) among bulls classified as top, middle and bottom in ETA for milk, fat and protein; however, the small MASple size and the extreme genotypic frequencies were reasons for which the authors suggest further studies are required in order to elucidate the relationships among growth hormone (GH) and milk yield. Associations between the GH factor-1 (Pit-1, a transcription factor that activates the expression of prolactin and GH) and milk yield and conformation traits were studied in Italian Holstein bulls<sup>(38)</sup> (89 sires); the authors calculated daughter yield deviations for yield traits (milk, fat and protein yields, and fat and protein percent), and 16 conformation traits. Relationships among sires were included in the analysis across-population. Although the results suggest that one allele of Pit-1 is associated with high milk and protein yield and

genotipificar 159 marcadores genéticos en 1,518 toros Holstein de Estados Unidos (padres de más de 150, 000 hijas); los autores detectaron QTL con efecto sobre producción de leche en cinco cromosomas (1, 6, 9, 10, y 20). La evidencia obtenida sugirió que los QTL se encontraban en asociación con la característica en algunas familias. En otro estudio<sup>(23)</sup>, 13 familias de ganado noruego fueron usadas para analizar asociaciones entre rasgos de producción de leche y haplotipos de caseína. Los análisis incluyeron el efecto del abuelo, el haplotipo anidado dentro del abuelo, y el efecto aleatorio del toro anidado dentro de haplotipo. Se encontró efecto significativo de un haplotipo en cinco familias de sementales; no se encontraron asociaciones cuando los análisis consideraron a todas las familias de sementales a la vez. Los autores sugirieron que al menos en algunas familias un haplotipo en particular estaba asociado con un alelo del QTL favorable para la producción de proteína.

En otro estudio, se detectaron asociaciones entre variantes del 3<sup>er</sup> intron del gene bovino de la hormona de crecimiento y habilidades de transmisión estimadas (HTE) para producción de leche, grasa, y proteína en 172 toros canadienses (100 Holstein, 51 Ayrshire, y 21 Jersey)<sup>(37)</sup>. El modelo utilizado en ese estudio incluyó el efecto fijo del genotipo de los toros y el efecto aleatorio residual; no se encontraron efectos significativos de ninguno de los genotipos. En ese mismo trabajo, los autores describen la aplicación de análisis de Ji cuadrada con el que encontraron diferencias en las proporciones de genotipos LL y LV (L= leucina; V= valina) entre los toros cuando estos fueron clasificados acorde a valores de HTE (alto, medio, y bajo) para leche, grasa y proteína. Debido a la pequeña muestra utilizada y los valores extremos de frecuencias fenotípicas los autores sugirieron más estudios para discernir las relaciones entre hormona de crecimiento y producción de leche. Por otro lado, se han estudiado asociaciones entre el factor 1 de la hormona de crecimiento (Pit-1) (un factor de transcripción que activa la expresión de prolactina y la hormona de crecimiento) y producción de leche y rasgos de conformación en sementales Holstein italianos<sup>(38)</sup> (89 sementales); los autores calcularon desviaciones de producción

better conformation (deep, angular body, and straight rear leg set), these results are not conclusive since the study was based on a small MASple of bulls. In Germany, 20 markers were tested for their associations with EBV for yield traits in five grandsire families of Holstein bulls<sup>(39)</sup>. This study focused on BTA6. The authors reported finding a significant effect on protein yield in one of the families. They suggested that the QTL is located between two of the polymorphisms (TGLA37 and FBN13), within a 3-cM interval in the middle section of the chromosome. However, caution should be exercised because no mention is made regarding the adjustment in the threshold for the LOD; the non-independence of the markers used is a factor that should be addressed to reduce the chance of false positives (i.e. a significant effect of a QTL that does not exist in the interval). This problem also arose when a single-locus model using interval mapping was fitted<sup>(40)</sup>. The interval between the marker TGLA37 (one of the flanking markers of the putative segment with the QTL) and the marker IL90 was covered with no markers, and its length was around 30 cM. This leaves open the possibility that markers TGLA37 and IL90 may be in LD with other QTL located in this interval. It has been shown that LD between syntenic alleles may extend up to 50 cM in bovine populations<sup>(27)</sup>. In Canada, a study further investigated the relationships between genetic markers of the GH gene and milk yield in Holsteins<sup>(41)</sup>. The authors found significant effects for four markers, and reported the average effect of the gene substitution for alleles of Gh4.1 (43 and -253.6 milk, kg for the favorable allele and unfavorable allele, respectively) and Gh6.2 (44.9 and -283 milk, kg for the favorable allele and unfavorable allele, respectively). These analyses were done across population, not accounting for the relationships among sires.

In another Canadian study six grandsire families (432 sons) were used<sup>(42)</sup> to search for evidence of favorable QTL affecting yield traits (production of milk, fat, and protein, and percentages of fat and protein); they found that there were five putative QTL located on chromosome 1, and two QTL locations on chromosome 6, all related to increased

de las hijas de sementales para producción de leche, grasa, y proteína, y porcentajes de grasa y proteína, y 16 características de conformación. Las relaciones de parentesco entre los sementales fueron incluidas en los análisis poblacionales. Aunque los resultados sugieren que un alelo de Pit-1 está asociado con altas producciones de leche y proteína, y con mejor conformación (cuerpo angular y profundo, patas traseras rectas) estos resultados no son concluyentes dada la pequeña muestra de toros.

En Alemania, se estudiaron asociaciones entre 20 marcadores genéticos y valores genéticos predichos (VGP) para rasgos productivos en cinco familias de sementales Holstein<sup>(39)</sup>. Este estudio se enfocó al BTA6. Los autores encontraron resultados significativos en el caso de producción de proteína en una de las familias; en particular, sugirieron que un QTL está localizado entre dos polimorfismos (TGLA37 y FBN13) dentro de un intervalo de 3 cM en la parte media del cromosoma. Sin embargo, los resultados se deben considerar conservadoramente dado que no se mencionó ajuste del umbral de verosimilitud del *LOD score*; la no independencia entre los marcadores empleados es un factor que debe considerarse para reducir la posibilidad de falsos positivos. Este problema también se produjo cuando se aplicó mapeo a intervalos con un modelo de un locus<sup>(40)</sup>. El intervalo entre el marcador TGLA37 (uno de los marcadores que flanquean la región candidata a contener el QTL) y el marcador IL90 no fue cubierta con marcadores, y su longitud es de aproximadamente 30 cM. Esto deja abierta la posibilidad de que TGLA37 y FBN13 puedan estar en DL con otro QTL localizado en este intervalo. Se ha mostrado que una cantidad importante de DL entre alelos sinténicos puede extenderse hasta 50 cM en poblaciones bovinas<sup>(27)</sup>.

En Canadá, un estudio profundizó en las relaciones entre marcadores genéticos del gen de la hormona del crecimiento y producción de leche en ganado Holstein<sup>(41)</sup>. Se encontraron efectos significativos de cuatro marcadores y se describió el efecto promedio de substitución del gen para alelos de GH4.1 (43 y -253.6 leche, kg para el alelo favorable y desfavorable, respectivamente) y GH6.2 (44.9 y -283 leche, kg para el alelo favorable y

milk yield. Recently, also in Canada, the effects of five markers on milk yield, and percentages of protein and fat were studied<sup>(43)</sup> and it was confirmed that a marker on chromosome 20 for GH Receptor has a significant effect on protein percentage. In studies of US Holsteins<sup>(22,32,44,45)</sup>, within family analyses have been used to detect QTL scattered along 19 bovine autosomes; the most significant QTL have been found affecting milk yield, fat percentage, protein percentage, and protein yield in BTA 3, 6, 10, 14, and 29. There are reports that QTL have been used in MAS schemes in France<sup>(46,47)</sup>, Netherlands and New Zealand<sup>(48)</sup>, and Germany<sup>(49,50,51)</sup>; more detailed information is given later. A summary of the results from the above mentioned studies is given in table 1.

#### ***QTL studies in dairy cattle: mastitis resistance***

Few studies have been carried out to detect QTL and major genes affecting mastitis resistance. The main studies performed in this sense have investigated the role of the Major Histocompatibility Complex (MHC) genes. The associations between BoLA class I haplotypes and subclinical mastitis were analyzed<sup>(52)</sup>. 657 cows from various breeds were used to determine their SCC and bacteriological status (*infected with Staphylococcus aureus*, and/or coagulase-negative staphylococci). The model included fixed effects of herd, lactation number, breed and haplotype. Two alleles were associated with a decreased SCC and another two alleles were associated with increased SCC. Two alleles were associated with increased likelihood of isolating bacteria, and two alleles were associated with decreased likelihood. In another study<sup>(53)</sup> genetic associations between measures of mastitis prevalence and genotypes of the MHC class II DRB3.2 and IgG2 loci, and the CD18 mutation responsible for BLAD (bovine leukocyte adhesion deficiency) were analyzed. 137 periparturient Holstein cows were under study and the measures of mastitis used were EBV for SCS, clinical mastitis (CM), and intramammary infections (IMI) caused by major and minor pathogens. The marker DRB3.2\*16 was associated with increased EBV for SCS; DRB3.2\*23 was associated with decreased EBV for CM; the other allele, DRB3.2\*24, was in

desfavorable, respectivamente). Estos análisis fueron desarrollados a nivel poblacional, sin tomar en cuenta las relaciones de parentesco entre sementales.

En otro estudio<sup>(42)</sup> seis familias de sementales (con 432 hijos) fueron usadas para buscar evidencias de QTL favorables para producción de leche, grasa y proteína y porcentajes de grasa y proteína; cinco QTL candidato fueron localizados en BTA1, y dos sobre BTA6, todos relacionados a un incremento en la producción. Recientemente, los efectos de cinco marcadores sobre producción de leche, y porcentaje de proteína y grasa fueron estudiados<sup>(43)</sup> y se confirmó que un marcador del gen del receptor de la hormona del crecimiento (localizado en BTA20) tiene un efecto significativo sobre el porcentaje de proteína. Estudios de ganado Holstein en Estados Unidos<sup>(22,32,44,45)</sup> realizados en algunas familias de sementales han permitido detectar QTL distribuidos en 19 autosomas bovinos; los QTL más significativos afectando la producción de leche, porcentaje de grasa, el porcentaje y producción de proteína se encontraron en los autosomas 3, 6, 10, 14, y 29. Hay reportes de QTL han sido usados dentro de esquemas de MAS en Francia<sup>(46,47)</sup>, Holanda y Nueva Zelanda<sup>(48)</sup>, y Alemania<sup>(49,50,51)</sup>; información más detallada se proporciona párrafos adelante. Un resumen de resultados de los estudios mencionados anteriormente se proporciona en el Cuadro 1.

### ***QTL para resistencia a mastitis***

Pocos estudios se han llevado a cabo para detectar QTL y genes mayores con efecto sobre la resistencia a mastitis. Los principales estudios realizados han investigado el rol de genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés). Se han analizado las asociaciones entre haplotipos clase I del MHC y mastitis subclínica<sup>(52)</sup> con 657 vacas de varias razas que fueron usadas para determinar sus CCS y estado bacteriológico (*negativa*, o *infectada* con *Staphylococcus aureus*, y/o estafilococos coagulasa-negativos). El modelo incluyó efectos fijos de hato, lactación, raza, y haplotipo. Dos alelos fueron asociados a una disminución de CCS, y otros dos alelos se encontraron asociados a un incremento de CCS.

Cuadro 1. Loci de rasgos cuantitativos (QTL) con efecto sobre características productivas en ganado lechero reportados en varios estudios

Table 1. Quantitative trait loci (QTL) with effect on yield traits in dairy cattle reported on several studies

BTA	Marker (or gene), position (cM)	Traits	Reference
1	Pit-1 gene, position is not reported in the article	Protein, kg	38
1	RM095-ILST004, 21.3 cM	Fat, %	42
	ILST004-BM4307, 32-35.2 cM	Fat, kg	
	BM4307-INRA011, 35.2-54.4 cM	Protein, kg	
	INRA011-MB6506, 54.4-69.2 cM	Milk, kg	
3	BL41-ILST29, 32 cM	Protein, kg	44
	HUJ246-TGLA263, 49 cM	Fat, %	
6	Haplotypes: $\alpha$ S1-CN (C), $\beta$ -CN (A5), $\kappa$ -CN(A); position is not reported in the article	Protein, kg	23
		Milk, kg	
6	BM415, position is not reported in the article	Protein, %	32
6	TGLA37-FBN13, 53-58 cM	Milk, kg	39
		Fat, kg	
6	BM1236, 83.9 cM	Protein, %	45
6	BM1329-BM143, 35.5-49.4 cM	Percentage of Protein	42
		Milk, kg	
10	BMS2614, 98.4 cM	Milk, kg	45
14	BM6425, position is not reported in the article	Protein, %	32
14	BMS1678, 6.2 cM	Fat, kgFat, %	32
14	CSSM066, centromere	Fat, %	47
14	CSSM066, centromere	Protein, %	47
14	ILST39-BMS1678, 1 cM	Fat, %	44
14	BULGE30-BULGE9, centromere	Fat, %	48
14	KIEL_E8, centromere; DGAT1, 0.3 cM; ILST039, 1.3 cM; CSSM66, 8.7 cM	Milk, kg	50
		Fat, kg	
		Protein, kg	
		Fat, %	
		Protein, %	
19	Two polymorphisms on GH gene; 65.7 cM	Milk, kg	41
		Protein, kg	
19	GH gene, 65.7 cM	Milk (ETA)	37
29	ARO26-BCM8012, 10 cM	Protein, kg	44
26	IDVGA59, 57 cM	Fat, kg	47

Dos alelos fueron hallados asociados a una mayor probabilidad de aislar bacterias, y dos alelos se asociaron a una menor probabilidad de aislar bacterias. Otro estudio<sup>(53)</sup> evaluó asociaciones genéticas entre medidas de prevalencia de mastitis y genotipos del MHC clase II DRB3.2, IgG2, y la mutación CD18 responsable de la deficiencia de adhesión leucocitaria bovina (BLAD, por sus siglas en inglés); en este estudio 137 vacas Holstein próximas al parto fueron utilizadas; las medidas de mastitis fueron VGP para conteo lineal de células somáticas (CLCS), mastitis clínica (MC), e infecciones intramamarias (IIM) causadas por patógenos mayores y menores. El marcador DRB3.2\*16 se asoció con aumento de VGP para CLCS; DRB3.2\*23 se encontró asociado a un aumento de VGP para MC; otro alelo, DRB3.2\*24, resultó asociado a un menor VGP para CLCS y al mismo tiempo asociado a un mayor VGP para IIM.

En otro estudio, 1,100 vacas fueron utilizadas para analizar asociaciones entre alelos del locus DRB3.2 con niveles de CCS<sup>(54)</sup>. Se realizaron comparaciones de animales con elevado CCS y animales control. Vacas con elevado CCS se clasificaron ya sea como de incremento agudo de CCS (una muestra con más 500,000 células) o elevación crónica de CCS (tres muestras consecutivas con más de 500,000 células). Vacas no integradas a ninguno de los grupos mencionados se consideraron como grupo control. Los alelos DRB3.2\*8, DRB3.2\*16 y CRB3.2\*23 estuvieron asociados con un incremento en el riesgo de infección en vacas con incremento agudo de CCS en primera, segunda, y tercera lactancias, respectivamente; el alelo DRB3.2\*22 se asoció a un menor riesgo de conteos celulares altos en vacas de segunda lactancia. Otro estudio<sup>(53)</sup> analizó información proveniente de 901 vacas con un modelo que incluyó los efectos de parto, época de parto y marcadores como efectos fijos; aquí se encontró que el alelo DRB3.2\*16 influyó en la expresión de bajos conteos de células somáticas lo que está en conflicto con los dos estudios previos<sup>(51,52)</sup>.

Resultados de estudios de asociación entre genes del MHC clase II y mastitis pudieran parecer poco

association with decreased EBV for SCS and also in association with increased EBV for IMI. In another study, 1100 cows were used to analyze associations between alleles of the DRB3.2 locus with levels of SCC<sup>(54)</sup>. Comparisons of animals with elevated SCC and control animals were performed. Cows with elevated SCC were classified either as acutely elevated SCC (one test of more than 500,000 cells) or chronically elevated SCC (three consecutive tests of more than 500,000 cells). Cows that did not fall in either group were classified as control cows. Alleles DRB3.2\*8, DRB3.2\*16 and CRB3.2\*23 were associated with an increased risk of disease in cows with an acute SCC in first, second and third lactation, respectively; allele DRB3.2\*22 was associated with reduced risk of high cell count in second lactation cows. However, in other study<sup>(53)</sup> allele DRB3.2\*16 was significantly associated with lower SCS, conflicting with other studies<sup>(51,52)</sup>.

Results from association studies between MHC class II genes and mastitis may seem disappointing as most of the literature shows contradictory results. A possible explanation is that the studied MHC genes<sup>(53,54,55)</sup> may explain only partially the variation in mastitis resistance. Several factors may affect the results observed: type of analysis used, structure of the population, relationships among animals, control of the type I error. These studies<sup>(53,54,55)</sup> did not take into account factors such as the population structure, linkage disequilibrium, or relationships among animals. Lack of consideration of the additive relationships has been considered as a possible cause of spurious effects in association studies<sup>(56)</sup>. Some diseases are more likely to be explained with the action of genes of the MHC, but some complex diseases are not. Possibly those complex diseases, such as mastitis, can be explained by the complementary action of other genes affecting the immune response. There is evidence in support of this. There are several QTL affecting CM, SCS, and udder conformation that have been reported by using, mainly, anonymous markers. Three reports of QTL affecting CM were found in the literature<sup>(57,58,59)</sup>. There are reports of QTL on BTA 6 (position 37 cM), BTA 8 (position 54 cM), and BTA 14 (position 93

alentadores debido a que la mayoría de los estudios declaran resultados contradictorios. Una explicación es que los genes del MHC que han sido estudiados<sup>(53,54,55)</sup> pueden explicar únicamente de modo parcial la variación de resistencia a mastitis. Varios factores pueden afectar los resultados observados: el método de análisis utilizado, la estructura de la población, las relaciones de parentesco entre los animales, el control del error tipo I. Estos estudios<sup>(53,54,55)</sup> no tomaron en cuenta factores como la estructura de la población, desequilibrio de ligamiento o relaciones de parentesco entre animales. No considerar las relaciones de parentesco ha sido considerada como posible causa de falsos positivos en estudios de asociación<sup>(56)</sup>.

Algunas enfermedades pueden explicarse por la acción de genes del MHC, pero no necesariamente es el caso de algunas enfermedades complejas. Estas últimas podrían explicarse por la acción complementaria de otros genes con efecto sobre la respuesta inmune. Mastitis sería un ejemplo de este tipo de enfermedades complejas y existe evidencia que apoya esta hipótesis. Varios QTL con efecto sobre MC, CLCS, y conformación de ubre que han sido reportados principalmente con el uso de marcadores anónimos. Tres estudios de QTL afectando mastitis clínica se hallaron en la literatura pertinente<sup>(57,58,59)</sup>. Hay hallazgos de QTL en el BTA 6 (a 37 cM), BTA 8 (a 54 cM) y en BTA 14 (a 93 cM)<sup>(57)</sup>. También se ha reportado la presencia de dos QTL en BTA 11 (a 25.7 y 41 cM)<sup>(58)</sup>; un QTL sobre el BTA 14 se encontró a 40 cM<sup>(59)</sup>. CLCS es la característica que más ampliamente ha sido estudiada con respecto la presencia de QTL para resistencia a mastitis. Esto se explica porque CCS y CLCS son más fáciles de registrar que otras variables de resistencia a mastitis. Análisis de segregación con datos de CLCS sugiere que un gen mayor con efecto sobre CLCS está presente en la población Holstein de Ontario (Canadá)<sup>(60)</sup>.

La literatura disponible muestra que los siguientes BTA podrían alojar QTL para CLCS: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 18 al 23, 26, y 27. La mayor densidad de hallazgos se encuentra en BTA7, donde

cM)<sup>(57)</sup>. QTL on BTA11 (position 25.7 and 41 cM, respectively)<sup>(58)</sup>; another QTL on BTA 14 was found at position 40 cM<sup>(59)</sup>. SCS is the trait that more widely has been studied with regards QTL for mastitis resistance. This is understandable as SCC and SCS are easier to record than any other mastitis resistance trait. Segregation analysis of SCS data of Ontario Holsteins suggests that a major gene affects SCS in the population under study<sup>(60)</sup>. Overall, the evidence shows that the following chromosomes may harbor QTL affecting SCS: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 18 to 23, 26, and 27. The higher density of reports lies on BTA7, where QTL have been mapped at 61.6 cM<sup>(44)</sup>, 75-97 cM<sup>(61)</sup>, and 124.4 cM<sup>(62)</sup>. On BTA 5 there are reports of a QTL at 6.7 cM<sup>(61)</sup> and another one at 100 cM<sup>(60)</sup>. BTA 8 harbors two QTL, one at 16.7 cM<sup>(62)</sup> and at 54 cM<sup>(55)</sup>. On BTA 11 within a section of 40 cM, three QTL have been reported; one at 25.7 cM and other at 41 cM<sup>(58)</sup>, the third QTL was mapped at 63 cM<sup>(59)</sup>. On BTA 22 three findings are documented: at 43.7 and 44.5 cM<sup>(62)</sup> and at 80 cM<sup>(46)</sup>. In this case, due to the short distance between the two QTL located around 40 cM, the figure of a single QTL can not be ruled out. At BTA 23 four QTL have been found: at 17.3 cM<sup>(64)</sup>, at 52 cM, 61 cM<sup>(58)</sup>, and at 80 cM<sup>(44)</sup>. BTA 26 is reported with two QTL at 0 cM<sup>(44)</sup> and other one within a segment located between 50.6 cM and 59.8 cM<sup>(63)</sup>. Other chromosomal locations with QTL affecting CM and SCS, or udder conformation have been reported<sup>(19,44,45,49,58,62)</sup>. A summary of the results from the above mentioned studies is given in Table 2.

Some attempts have been done to condense the information regarding QTL detection in dairy cattle<sup>(65)</sup>; in some cases databases are available online such as that one created by Khatkar *et al.*<sup>(36)</sup>.

### **Marker assisted selection**

A detailed description regarding the status of the use of MAS in livestock is available<sup>(66)</sup>. A revision of how MAS is being used in dairy cattle is out of the scope of this review; here is presented only a brief description of some applications of MAS available in the literature. Some Artificial

QTL se han detectado a 61.6 cM<sup>(44)</sup>, 75-97 cM<sup>(61)</sup>, y 124.4 cM<sup>(62)</sup>. En el BTA 5 se han encontrado dos QTL, uno a 6.7 cM<sup>(61)</sup> y otro a 100 cM<sup>(60)</sup>. BTA 8 aloja dos QTL, uno a 16.7 cM<sup>(62)</sup> y otro a 54 cM<sup>(55)</sup>. En BTA 11 en una región de 40 cM se han detectado tres QTL: a 25.7 cM, a 41 cM<sup>(58)</sup>, y a 63 cM<sup>(59)</sup>. En BTA 22 tres hallazgos se han documentado: a 43.7 cM, 44.5 cM<sup>(62)</sup> y a 80 cM<sup>(46)</sup>. En este caso, debido a la estrecha distancia entre los dos QTL localizados alrededor de 40 cM, la idea de un solo QTL no puede descartarse. En BTA 23 se han encontrado cuatro QTL: a 17.3<sup>(63)</sup>, a 52 cM, 61 cM<sup>(58)</sup>, y a 80 cM<sup>(44)</sup>. Se ha detectado que BTA 26 contiene dos QTL, uno a 0 cM<sup>(44)</sup> y otro dentro de un segmento localizado entre 50.6 y 59.8 cM<sup>(64)</sup>. En otras posiciones cromosómicas se han detectado QTL con efecto sobre mastitis clínica, CLCS, o conformación de ubre<sup>(19,44,45,49,58,62)</sup>. Un resumen de los resultados de los estudios mencionados se proporciona en el Cuadro 2.

Otros autores han realizado algunos intentos por condensar la información generada a partir de estudios de mapeo de QTL en ganado lechero<sup>(65)</sup> y en algunos casos las bases de datos se encuentran disponibles en línea, como la creada por Khatkar *et al*<sup>(36)</sup>.

**Selección asistida por marcadores**

Una descripción detallada sobre el estado que guarda MAS en ganado doméstico se encuentra disponible<sup>(66)</sup>. Una revisión extensa sobre cómo se emplea MAS en ganado lechero está fuera de los objetivos de esta revisión; aquí sólo se mencionan brevemente algunos ejemplos de aplicación de MAS que se encuentran publicados en la literatura al respecto. Algunas compañías de inseminación artificial utilizan MAS como parte de sus esquemas de selección. Sin embargo, poca información se encuentra disponible con relación a la intensidad de su uso, o sobre los procedimientos utilizados para incorporar la información de los QTL. Para la mayoría de las características productivas es probable que MAS sea utilizada en selección intrafamiliar. Un ejemplo de tal aplicación sería el uso de MAS para rasgos productivos en ganado lechero en Francia, donde el INRA (Institut National

Cuadro 2. Loci de rasgos cuantitativos con efecto sobre mastitis clínica, conteo celular somático, y conformación de la ubre en ganado lechero reportados en varios estudios

Table 2. Quantitative trait loci (QTL) with effect on clinic mastitis (CM), somatic cell count (SCC), and udder conformation in dairy cattle reported on several studies

BTA	Marker (or gene), position (cM)	Traits	Reference
1	MAF46, position is not reported in the article	SCC	63
2	Name of marker is not reported in the article, 100 cM	SCC	49
4	RM188-TGL116, 24.7-48.9 cM	SCC	64
5	BM6026, 6.7 cM	SCC	58
	BM315, 100.1 cM	SCC	62
6	Name of marker is not reported in the article, 37 cM	CM	57
7	BM6117, position is not reported in the article	SCC	32
	BM6117-BMS2258, position is not reported in the article	SCC	32
	BMS2258-OarAE129,75-96.6 cM	SCC	61
	BMS1979, 124.4 cM	SCC	62
8	BM3419, position is not reported in the article	SCC	63
	TGLA13-INRA122, 54 cM	SCC-CM	57
10	TGLA378-TGLA102, 49 cM	SCC	61
11	BM304, 24.4 cM	Rear udder height	22
	INRA177, 25.7 cM	CM	58
	BM7169, 41 cM	CM	58
	N/R, 11, 63 cM	SCC	59
13	AGLA232, 79.5 cM	SCC	64
14	BMS1747-BMS740, 4.2-44.2 cM	CM	54
	BM302, 36.9 cM	Udder	45
	ILSTS11-BM302, 10.6-36.9 cM	conformation	64
	Name of marker is not reported in the article, 93 cM	SCC and CM	57
18	TGLA227, 117 cM	SCC	61
19	Name of marker is not reported in the article, 32 cM	SCC	49
21	Name of marker is not reported in the article, 33 and 84 cM	SCC	19
22	BMS875-BM4102, 80 cM	SCC	44
	BM3628, 44.5 cM	SCC	62
	CSSM026, 43.7 cM	SCC	62
23	BM1443, 67.1 cM	SCC	58
	BB705-BM1818, 80 cM	SCC	44
	RM033, 17.3 cM	SCC	63
	D2355, 52 cM	SCC	62
26	BM1314, centromere	SCC	44
	TGLA429-BM804, 50.6-59.6 cM	SCC	64
27	BM3507-TGLA179, centromere a 5.1 cM	SCC	61

de la Recherche Agronomique), LABOGENA (Laboratoire D'analyses Génétiques pour les Espèces Animales) y la UNCEIA (Union Nationale des Coopératives D'élevage et D'insémination Animales) han implementado MAS para ocho compañías de mejoramiento genético, mediante la utilización de un DN que incluyó información proveniente de 1,554 sementales<sup>(46)</sup>. En Alemania, desde 1995 la población de sementales lecheros jóvenes ha sido genotipificada para una serie de 339 marcadores. Actualmente, la población tipificada comprende 1,602 individuos; se realizan evaluaciones genéticas para producción de leche, grasa y proteína, y CLCS<sup>(51,67)</sup>. En Nueva Zelanda y Holanda el gen DGAT1 (acylCoA:diacylglycerol acyltransferase), localizado en el BTA 14, con efecto sobre producción de leche y su composición, está siendo incluido en esquemas de selección. La identificación de éste gen sirve para ejemplificar cómo combinar herramientas de genética molecular y genética cuantitativa para disecar la variación genética de un QTL. Primero, usando un barrido del genoma, un QTL localizado en el centrómero de BTA14 fue localizado en Holsteins de Holanda y Nueva Zelanda<sup>(68)</sup>. Posteriormente, se refinó la posición del QTL hacia un segmento cromosomal de 9.5 cM<sup>(69)</sup>. Más tarde, el QTL fue clonado<sup>(70)</sup> y una mutación se identificó en el gene DGAT1 con efecto sobre el contenido de grasa. Recientemente, la mutación causante fue caracterizada como una sustitución no conservativa lisina a alanina (DGAT1 K23A)<sup>(48)</sup>. El gen DGAT1 produce una enzima que cataliza el último paso en la síntesis de triglicéridos; la mutación K23A parece incrementar la cantidad del producto del gen, por lo tanto incrementando la cantidad de grasa en la leche.

### ***Análisis de la base molecular de los QTL***

Las etapas del descubrimiento del gen DGAT1 enfatiza la importancia de analizar las regiones en donde QTL ya han sido localizados. Qué regiones son susceptibles de analizar? A partir de los Cuadros 1 y 2 puede apreciarse que algunos cromosomas muestran alta densidad de QTL, por ejemplo BTA7, BTA11, BTA14, y BTA23, en el caso de características relativas a resistencia a mastitis. Sería

Insemination Companies are using MAS within their selection procedures. However, little information is available regarding how intensive the use of MAS is, or which procedures are used to incorporate QTL information. For most of the productive traits MAS is likely being used in selection within families. An example of such application is the use of MAS for yield traits in dairy cattle in France, where INRA (Institut national de la recherche agronomique), LABOGENA (Laboratoire d'analyses génétiques pour les espèces animales), and UNCEIA (Union nationale des coopératives d'élevage et d'insémination animales) have implemented MAS for eight breeding companies, by using a GDD that included 1554 sires<sup>(46)</sup>. In Germany, since 1995, the population of young dairy bulls has been genotyped for 339 markers; nowadays, 1602 individuals comprise the genotyped population; genetic evaluations are performed for milk yield, fat yield, protein yield, and SCS<sup>(51,67)</sup>. In New Zealand and Netherlands, acylCoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1), a gene (mapped on BTA 14) with effect on milk yield and milk composition is being included in selection schemes. The identification of this gene is also an example of how to combine molecular and quantitative genetic tools to dissect the genetic variation underlying a QTL. Using a whole genome scan, a QTL located in the centromeric end of BTA 14 was first reported<sup>(68)</sup> in Holsteins from Netherlands and New Zealand. Subsequently the position of the QTL was refined<sup>(69)</sup> to a chromosomal segment of 9.5 cM. Later, the QTL was cloned<sup>(70)</sup> and a missense mutation was identified in the DGAT1 gene with effect on milk fat content. Recently the causative mutation was characterized as a nonconservative substitution (lysine by alanine) (DGAT1 K23A)<sup>(48)</sup>. DGAT1 gene produces an enzyme that catalyses the last step in triglyceride synthesis; the mutation K23A seems to increase the amount of the gene product, hence increasing the amount of fat content in milk.

### ***Analyzing molecular basis of QTL effects***

The discovery of DGAT1 points out the necessity for further analyzes of regions where QTL have been mapped. Which regions would be worth

factible analizar esas regiones mediante mapeo fino, y adicionalmente efectuar estudios moleculares para diseccionar la base genética de los QTL. Hay evidencias de que modificaciones a la secuencia de ADN, tal como las metilaciones de bases, pueden regular la expresión génica<sup>(71)</sup>. Más recientemente se ha propuesto que la complejidad de los eucariotes puede ser resultado de funciones represoras del RNAi, que también regula la síntesis de proteínas<sup>(15)</sup>. Análisis comparativos de ADN pueden detectar posibles factores moleculares con efecto sobre la expresión de genes conocidos, o incluso descubrir genes con implicaciones económicas para producción animal. Sin duda, complementar análisis de asociación con estudios moleculares es una estrategia casi obligada para obtener conocimiento sobre los posibles mecanismos de acción de genes involucrados. Un análisis exhaustivo de posibles QTL es esencial en la elaboración de esquemas de MAS. Por ejemplo, respecto a genes del MHC como genes candidatos para resistencia a mastitis, se ha recomendado la realización de más estudios para determinar los efectos de todos los polimorfismos del MHC antes de establecer cualquier estrategia de selección sobre alelos individuales<sup>(72)</sup>.

## PERSPECTIVAS Y CONCLUSIÓN

Hasta ahora varios marcadores se han postulado como ligados a QTL con efecto sobre producción de leche y resistencia a mastitis. Sin embargo, casi todos los estudios recomiendan una interpretación cauta de los resultados. Un mapa genético bovino recientemente ensamblado<sup>(73)</sup>, estimulará el mapeo de QTL en ganado lechero, de carne, y de doble propósito. En México sólo han habido esfuerzos limitados para establecer programas para tipificar y coleccionar información de ADN bovino para ser usada en la detección de QTL. Generalmente poblaciones animales poseen diferente composición genética; de modo que es probable que algunos marcadores genéticos asociados con QTL en alguna(s) población(es) puedan no estar asociados con un gen segregando (QTL) en la población bovina lechera mexicana. Otra posibilidad es que la fase de ligamiento entre el marcador y el QTL

analyzing? From tables 1 and 2 it can be seen that some chromosomes show a higher density of QTL reports, for instance BTA7, BTA11, BTA14, and BTA23, in the case of traits related to mastitis resistance. It would be feasible to fine map those regions, and additionally perform molecular studies to dissect the molecular basis for the QTL effects. Evidence shows that DNA sequence modifications such as methylation of bases (mainly cytosines) may lead to regulation of gene expression<sup>(71)</sup>. More recently, it has been proposed that the complexity of eukaryotes may be a result of RNA interference which also regulates protein synthesis; small RNA of intronic origin may have repressor function<sup>(15)</sup>. Comparative DNA sequence analysis can be used to detect possible molecular factors affecting expression of known genes, or even the discovery of genes affecting traits of economic importance in dairy cattle in the regions where QTL have been reported. Without doubt, complementing association analyses to detect QTL with molecular studies to get insight into the possible mechanism of action of the genes involved is an almost a mandatory strategy. A comprehensive analysis of putative QTL is essential in order to elaborate MAS schemes. For instance, with regards to MHC genes, groups of genes that are strong candidate genes for mastitis resistance, more studies have been recommended to determine the effects of all the MHC polymorphisms before the establishment of any selection strategy on single alleles<sup>(72)</sup>.

## PERSPECTIVES AND CONCLUSION

So far markers have been postulated as linked to QTL affecting milk yield and mastitis resistance. However, almost all studies recommend a cautionary interpretation of the results. A recently assembled bovine genetic map<sup>(73)</sup> will encourage QTL mapping studies in dairy, beef and dual purpose cattle. In Mexico, limited efforts have been made to establish programs to genotype and collect bovine DNA information to be used in the detection of QTL. Different populations are likely to possess different genetic pools; hence it is likely that some genetic markers associated with QTL in some populations may not be associated with a segregating gene

en la población mexicana sea diferente a la fase de ligamiento en otra población, lo que dejaría abierta la posibilidad de que el marcador asociado al alelo mostrando un cierto efecto en una población pueda estar asociado a un QTL diferente, que posea un efecto distinto sobre la misma característica en la población bovina lechera mexicana. Así, es en el interés de la industria de mejoramiento ganadero lechero en México tipificar sementales con el objeto de crear un banco de datos de ADN bovino para futura referencia y uso. Por lo tanto, el dilema sería: Cuáles polimorfismos deben tipificarse? Hay varias opciones disponibles para hacer la selección de los polimorfismos. Una opción para establecer un banco de referencia de ADN para uso de la industria ganadera lechera mexicana es aprovechar los 1,913 marcadores genéticos dispersos en el genoma bovino públicamente disponibles<sup>(73)</sup>, y debido a que el DL se extiende hasta 20 cM<sup>(27)</sup>, podría ser apropiado tipificar sementales con una densidad de marcadores de 10 cM; eso implicaría tipificar aproximadamente 300 marcadores genéticos para cubrir todo el genoma. Otra opción (que puede ser complementaria a la anterior) es tipificar sementales para marcadores de genes con efecto fisiológico conocido, y probar sus asociaciones con rasgos de interés.

Además de la estrategia para establecer el banco de ADN bovino, es esencial que los estudios de asociación a realizar en la población bovina mexicana consideren aspectos como la estructura genética de la población, las posibles relaciones entre los marcadores y los QTL (DL, ligamiento físico), y el ajuste estadístico requerido para reducir los errores tipo I con el objeto de formular conclusiones. El relativo fácil acceso a polimorfismos genéticos podría crear un cuerpo de hallazgos que podría estar lleno de resultados contradictorios, si no se toman medidas precautorias con respecto a los ajustes estadísticos para comparaciones múltiples, o la naturaleza genética de las asociaciones que se detecten<sup>(74)</sup>. Una estimación precisa de efectos de QTL es un requisito para establecer MAS. Las respuestas a selección serán máximas sólo si el marcador usado está cerca del QTL. Así, MAS debería realizarse solo sobre

(QTL) in the Mexican dairy cattle population. Another possibility is that the marker-QTL linkage phase in the Mexican population may be different from the linkage phase in other populations leaving open the possibility that a marker associated to an allele showing a certain effect in one population might have a different effect on a quantitative trait in the Mexican dairy cattle population. Thus it is in the interest of the dairy cattle breeding industry in Mexico to genotype bulls in order to create a bovine DNA data bank for future reference and usage. Hence, the dilemma is: Which polymorphisms should be genotyped? Several options may be available to select polymorphisms. One option to establish a reference DNA data bank for usage in the Mexican dairy industry is to take advantage of the 1913 publicly available markers scattered along the bovine genome<sup>(73)</sup>, and given that LD extends up to 20 cM<sup>(27)</sup>, it would be appropriate to genotype bulls with a marker density of 10 cM; that would imply genotyping approximately 300 genetic markers to cover the whole bovine genome. Another option (which can be complementary to the mentioned before) is to genotype bulls for markers of genes with known physiological function, and test for associations between those markers and traits of interest.

Regardless of the choice to establish the DNA data bank, more importantly, association studies to be performed in the Mexican dairy cattle population should take into account aspects such as the breeding structure, the possible relationship between the markers and the QTL (LD, and physical linkage), and the adjustment to reduce Type I error (multiple comparison problem) in order to formulate conclusions. The relatively easy access to genetic polymorphisms would create a body of findings that might be full of contradictory results if precautions are not taken regarding statistical adjustments for multiple comparisons, or the genetic nature of the detected associations<sup>(74)</sup>. An accurate estimation of QTL effects is a requirement to establish MAS programs. Selection responses are likely to be maximized only if the marker used is close to the QTL. Thus MAS can be performed only on the genotypes of candidate animals with

genotipos de candidatos cuando se cuenta con la posición más probable del QTL<sup>(75)</sup>. Una vez que esquemas de MAS hayan sido establecidos, se debe dar seguimiento con el objeto de detectar posibles efectos negativos sobre otros rasgos. Al mismo tiempo, estudios de genética molecular deberán proveer evidencia de la base genética de los QTL. La disponibilidad de la secuencia del ADN bovino en bases de datos públicos, abre oportunidades para realizar análisis comparativos de secuencias genéticas que podrían reforzar o corregir las conclusiones obtenidas en estudios de mapeo de QTL. También es recomendable desarrollar estrategias que combinen el mapeo genético y análisis de perfiles de expresión génica para identificar los mecanismos de acción de las redes de genes que controlan características complejas<sup>(76,77)</sup>. Los beneficios del mapeo de QTL pueden ser importantes, pero debe apreciarse que el uso de esos QTL dentro de esquemas de MAS no es trivial; debe enfatizarse, específicamente para países en desarrollo que *“Es poco probable que tecnologías genéticas tengan impacto si se aplican de manera aislada. Programas que trabajen para entender y mejorar en su totalidad el sistema socio-económico de la producción animal y el mercadeo son más probables en tener éxito que aquéllos que tratan componentes individuales del sistema”*<sup>(78)</sup>. Al respecto, se deben establecer discusiones dentro (y entre) los participantes en la industria lechera mexicana.

Esta revisión proporciona información útil con relación al uso de polimorfismos genéticos para detectar QTL con efecto sobre rasgos de importancia económica en el ganado lechero, así como características esenciales de los estudios de asociación que tienen que ser tomados en cuenta para detectar apropiadamente los efectos de QTL.

## LITERATURA CITADA

1. Bolívar ZFG. Recomendaciones para el desarrollo y consolidación de la biotecnología en México. Academia Mexicana de Ciencias, CONACyT. 1 ed. 2003.
2. Ollivier L. Scientific challenges to animal breeding and genetics. In: Proc From Jay Lush to Genomics: visions for animal breeding and genetics. Iowa State University, Ames, Iowa USA. 1999:24.

the most probable location of the QTL<sup>(75)</sup>. Once MAS schemes have been established, a follow up should be established in order to detect possible detrimental effect of MAS on other traits. Concurrently, studies of molecular genetics would ultimately provide evidence of the genetic basis of the QTL. The availability of the bovine DNA sequence in public data bases opens opportunities for comparative DNA sequence analysis that would reinforce or correct the conclusions reached in QTL mapping studies. Approaches that combine genome mapping and gene-expression studies have been proposed<sup>(76, 77)</sup> to identify mechanisms of genetic networks underlying complex traits. Benefits from QTL mapping might be important, but it must be appreciated that their use within MAS schemes is not trivial; moreover, it must be pointed out, specifically for developing countries, that *“Gene-based technologies are unlikely to have an impact if applied in isolation. Programmes that work to understand and improve the full socio-economic system of animal production and marketing are more likely to succeed than those that deal with individual components of the system”*<sup>(78)</sup>. In this respect, further discussions must take place within the various participants in the Mexican dairy industry.

This review gives useful information regarding the use of genetic polymorphisms to detect QTL affecting economically important traits in dairy cattle as well as essential features of association analyses that have to be taken into account to appropriately test for effects of QTL.

*End of english version*

- 
3. MacKay T. The genetic architecture of quantitative traits. Annu. Rev Genet 2001;35:303.
  4. Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. Science 2001;93:1068-1070.
  5. Doerfler W. (Epi)genetics signals: towards a human genome sequence of all five nucleotides. In: The epigenome: molecular hide and seek. Beck S, Olek A. editors Weinherin Germany: Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA; 2003:23-38.
  6. Matzke M, Matzke AJM, Kooter JM. RNA: guiding gene silencing. Science 2001;293:080-1083.

7. Sax K. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 1923;8:552.
8. Neimann-Sorensen A, Robertson A. The association between blood groups and several production characteristics in three Danish Cattle Breeds. *Acta Agric Scan* 1961;11:163-196.
9. Dekkers JCM, Hospital F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Rev Genetics* 2002;3:22-32.
10. Lynch M, Walsh B. *Genetics and analysis of quantitative traits*. 1st ed. Sunderland, Mass, USA: Sinauer Associates; 1998.
11. Griffiths AJF, Miller J. *Modern genetic analysis*. New York, USA: W.H. Freeman & Co; 1999.
12. Gibson G, Muse SV. *A primer of genome science*. 1st ed. Sunderland, Mass, USA: Sinauer Associates, Inc. Publishers; 2002.
13. Falconer DS, Mackay TS. *An introduction to quantitative genetics*. 4th ed. Essex, England: Longman; 1996.
14. Novina CD, Sharp PA. The RNAi revolution. *Nature* 2004;430:161-164.
15. Mattick JS. Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *Bioessays* 2002;25:930-939.
16. Hill WG, Knott S. Identification of genes with large effects. In: Gianola D, Hammond K editors, *Advances of statistical methods for genetic improvement of livestock*, Springer-Verlag, Berlin; 1990:477-494.
17. Elston RC, Stewart J. A general model for the genetic analysis of pedigree data. *Hum Hered* 1971;21:523-542.
18. Morton NE, Maclean CJ. Analysis of family resemblance. III. Complex segregation of quantitative traits. *Am J Hum Genet* 1974;26:489-503.
19. Rodriguez-Zas SL, Southey BR, Heyen DW, Lewin HA. Interval and composite interval mapping of somatic cell score, yield, and components of milk in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2002;85:3081-3091.
20. Baret PV, Knott SA, Visscher PM. On the use of linear regression and maximum likelihood for QTL mapping in half-sib designs. *Genet Res Camb* 1998;72:149-158.
21. Weller JI, Kashi Y, Soller M. Power of "daughter" and "granddaughter" designs for genetic mapping of quantitative traits in dairy cattle using genetic markers. *J Dairy Sci* 1990;73:2525-2537.
22. Ashwell MS, Da Y, Van Tassell CP, Vanraden PM, Miller RH, Rexroad Jr CE. Detection of putative *loci* affecting milk production and composition, health, and type traits in a United States Holstein population. *J Dairy Sci* 1998;81:3309-3314.
23. Lien S, Gomez-Raya L, Steine T, Fimland E, Rogne S. Associations between casein haplotypes and milk yield traits. *J Dairy Sci* 1995;78:2047-2056.
24. Bovenhuis H, Weller JI. Mapping and analysis of dairy cattle quantitative trait loci by maximum likelihood methodology using milk protein genes as genetic markers. *Genetics* 1994;137:267-280.
25. Liu Y, Jansen GB, Lin CY. Quantitative trait loci mapping for dairy cattle production traits using a maximum likelihood method. *J Dairy Sci* 2004;87:491-500.
26. Haley C. *Advances in Quantitative Trait Locus Mapping*. In: *Proc From Jay Lush to Genomics: visions for animal breeding and genetics*. Ames, Iowa USA: Iowa State University; 1999:47-58
27. Farnir F, Coppieters W, Arranz JJ, Berzi P, Cambisano N, Grisart B, *et al.* Extensive genome-wide linkage disequilibrium in cattle. *Genome Res* 2000;10:220-227.
28. Muir BS. *Genetic data analysis II: Methods for discrete population genetic data* 1<sup>st</sup> ed. Sunderland, Mass, USA: Sinauer Associates; 1996.
29. Weller JI. *Quantitative trait loci analysis in animals*. 1st edition. CABI Publishing; 2001.
30. Spelman RJ, Bovenhuis H. Moving from QTL experimental results to the utilization of QTL in breeding programs. *Anim Genet* 1998;29:77-84.
31. Churchill GA, Doerge RW. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 1994;138:963-971.
32. Ashwell MS, Van Tassell CP, Songstegard TS. A genome scan to identify quantitative trait *loci* affecting economically important traits in a US Holstein population. *J Dairy Sci* 2001;84:2535-2542.
33. Meuwissen THE, Goddard ME. Fine mapping of quantitative trait *loci* using linkage disequilibrium with closely linked marker *loci*. *Genetics* 2000;155:421-430.
34. Andersson L, Georges M. Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. *Nature Review Genetics* 2004;5:202-212.
35. Georges M, Nielsen D, MacKinnon M. Mapping quantitative trait *loci* controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics* 1995;139:907-920.
36. Khatkar MS, Thomson PC, Tammen I, Raadsma HW. Quantitative trait *loci* mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. *Genetics, Selection, Evolution* 2004;36:163-190.
37. Sabour MP, Lin CY, Smith C. Association of genetic variants of bovine growth hormone with milk production traits in Holstein cattle. *J Anim Breed Genet* 1997;114:435-442.
38. Renaville R, Gengler N, Vrech E, Prandi A, Massart S, Corradini C, *et al.* Pit-1 gene polymorphism, milk yield, and conformation traits for Italian Holstein-Friesian bulls. *J Dairy Sci* 1997;80:3431-3438.
39. Kühn Ch, Freyer G, Weikard R, Goldammer T, Shwerin M. Detection of QTL for milk production traits in cattle by application of a specifically developed marker map of BTA6. *Anim Genet* 1999;30:333-340.
40. Ronin YI, Korol AB, Nevo E. Single- and multiple-trait mapping analysis of linked quantitative trait *loci*: some asymptotic analytical approximations. *Genetics* 1999;151:387-396.
41. Yao J, Aggrey SE, Zadworny D, Hayes FJ, Kuhnlein U. Sequence variations in the bovine Growth hormone Gene characterized by Single-Strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holsteins. *Genetics* 1996;144:1809-1816.
42. Nadesalingam J, Plante Y, Gibson JP. Detection of QTL for milk production on chromosomes 1 and 6 of Holstein cattle. *Mamm Genome* 2001;12:27-31.
43. Richard M. Fine-mapping of a QTL on chromosome 20 in Holsteins [M.Sc. thesis]. Montreal, Canada: McGill University; 2002.
44. Ashwell MS, Heyen DW, Sonstegard TS, Van Tassell CP, Da Y, VanRaden PM, Ron M, Weller JI, Lewin HA. Detection of quantitative trait *loci* affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. *J Dairy Sci* 2004;87:468-475.

45. Van Tassell CP, Ashwell MS, Sonstegard TS. Detection of putative *loci* affecting milk, health, and conformation traits in a US Holstein population using 105 microsatellite markers. *J Dairy Sci* 2000;83:1865-1872.
46. Boichard D, Fritz S, Rossignol MN, Boscher MY, Malafosse A, Colleau JJ. Implementation of marker-assisted selection in French dairy cattle. 7th World congress on genetics applied to livestock production. 2002.
47. Boichard D, Grohs C, Bourgeois F, Cerqueira F, Faugeras R, Neau A, Rupp R, Amigues Y, Boscher MY, Levéziel, H. Detection of genes influencing economic traits in three French dairy breeds. *Genetic, Selection, Evolution* 2003;1:77-101.
48. Grisart B, Farnir F, Karim L, Cambisano N, Kim JJ, Kvasz A, Mni M, Simon P, Frère JM, Coppietters W, Georges M. Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2398-2403.
49. Bennewitz J, Reinsch N, Grohs C, Levéziel H, Malafosse A, Thomsen H, *et al.* Combined analysis of data from two granddaughter designs: a simple strategy for QTL confirmation and increasing experimental power in dairy cattle. *Gen Sel Evol* 2003;35:319-338.
50. Bennewitz J, Reinsch N, Paul S, Looft C, Kaupé B, Weimann C, Erhardt G, *et al.* The DGAT1 K232A mutation is not solely responsible for the milk production quantitative trait locus on the bovine chromosome 14. *J Dairy Sci* 2004;87:431-442.
51. Bennewitz J, Reinzh N, Thomsen H, Szyda J, Reinhardt F, Liu Z, *et al.* Marker assisted selection in German Holstein Dairy cattle breeding: outline of the program and marker assisted selection breeding value estimation. Proceed 54<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Rome, Session (2003):1-4.
52. Aarestrup FM, Jensen N, Ostergard H. Analysis of associations between major histocompatibility complex (BoLA) class I haplotypes and subclinical mastitis of dairy cows. *J Dairy Sci* 1995;78:1684-1692.
53. Kelm SC, Detilleux JC, Freeman G. Genetic association between parameters of innate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstein cattle. *J Dairy Sci* 1997;80:1767-1775.
54. Dietz AB, Cohen ND, Timms L. Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1997;80:406-412.
55. Sharif, S, Mallard BA, Wilkie BN. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian Dairy Cattle. *Anim Genet* 1998;29:185-193.
56. Kennedy BW, Quinton M, Van Arendonk JAM. Estimation of effects of single genes on quantitative traits. *J Anim Sci* 1992;70:2000-2012.
57. Klungland H, Sabry A, Heringstad B, Olsen HG, Gomez-Raya L, Våge DI, *et al.* Quantitative trait *loci* affecting clinical mastitis and somatic cell count in dairy cattle. *Mamm Genome* 2001;12:837-842.
58. Holmberg M, Andersson-Eklund L. Quantitative trait *loci* affecting health traits in Swedish dairy cattle. *J Dairy Sci* 2004;87:2653-2659.
59. Schulman NF, Vitala SM, de Koning DJ, Virta J, Mäki-Tanila A, Vilkki JH. Quantitative trait *loci* for health traits in Finis Ayrshire cattle. *J Dairy Sci* 2004;87:443-449.
60. Pan Y, Boettcher PJ, Gibson JP. Bayesian segregation analysis of somatic cell scores of Ontario Holstein cattle. *J Dairy Sci* 2001;84:2796-2802.
61. Kühn Ch, Bennewitz J, Reinsch N, Xu N, Thomsen H, Looft C, *et al.* Quantitative trait *loci* mapping of functional traits in the German Holstein cattle population. *J Dairy Sci* 2003;86:360-368.
62. Heyen DW, Weller JI, Ron M, Band M, Beever JE, Feldmesser E, Da Y, Wiggans GR, VanRaden PM, Lewin HA. A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. *Physiol Genom* 1999;1:165-178.
63. Reinsch N, Xu N, Thomsen H, Looft C, Kalm E, Grupe S, *et al.* First results on somatic cell count *loci* from the ADR bovine mapping project. 6<sup>th</sup> World Congress on Genetics. Appl Livest Prod; 1998.
64. Zhang Q, Boichard D, Hoeschele I, Erndt C, Eggen A, Murkve B, *et al.* Mapping quantitative trait *loci* for milk production and health of dairy cattle in a large outbred pedigree. *Genetics* 1998;149:1959-1973.
65. Sonstegard TS, Van Tassell CP. Bovine genomics update: making a cow jump over the moon. *Genet Res Camb* 2004;84:3-9.
66. Dekkers JCM. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *J Anim Sci* 2004;82(E. Suppl.):E313-E328.
67. Szyda J, Liu Z, Maschka R, Reinhardt F, Reents R. Computer system for routine QTL detection and genetic evaluation under a mixed inheritance model in dairy cattle. Proceedings of the 7th WCGALP, Montpellier, 2002;33:249-250.
68. Coppietters W, Riquet J, Arranz JJ, Bertzi P, Cambisano N, Grisart B, *et al.* A QTL with major effect on milk yield and composition maps to bovine Chromosome 14. *Mamm Genome* 1998;9:540-544.
69. Riquet J., Coppietters W, Cambisano N, Arranz JJ, Berzi P, Davis SK, *et al.* Fine-mapping of quantitative trait *loci* by identity by descendant in outbred populations: Application to milk production in dairy cattle. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1999;96:9252.
70. Grisart B, Coppietters W, Farnir F, Karim L, Ford C, Berzi P, *et al.* Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with a major effect on milk yield and composition. *Genome Res* 2002;12:222-231.
71. Millar DS, Holliday R, Grigg GW. Five not four: history and significance of the fifth base. In: The epigenome –molecular hide and seek. Beck S, Beck A editors. KgaA, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co; 2003.
72. Rupp R, Boichard D. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Vet Res* 2003;34:671-688.
73. Everts-van der Wind A, Kata SR, Band MR, Rebeiz M, Larkin DM, Everts RE, *et al.* A 1463 gene cattle-human comparative map with anchor points defined by human genome sequence coordinates. *Genom Res* 2004;14:1424-1437.
74. Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex traits. *Nature Rev Genet* 2001;2:91-99.
75. Stella A, Hansen GB, Boettcher PJ, Gibson JP, Lohuis MM, Pagnacco G. Accounting for uncertainty in QTL location in marker-assisted pre-selection of young bulls prior to progeny test. *J Anim Breed Genet* 2002;119:15-24.

76. Jansen RC, Nap JP. Genetical genomics: the added value from segregation. *Trends in Genetics* 2001;17:388-391.
77. De Koning DJ, Carlborg Ö, Haley CS. The genetic dissection of immune response using gene-expression studies and genome mapping. *Veter Immunol Immunopath.* 2005;105:343-352.
78. FAO/IAEA International symposium on applications of gene-based technologies for improving animal production and health in developing countries. Vienna, Austria. Final report joint FAO/IAEA division of nuclear techniques in food and agriculture 2003.