

Análisis del genoma ovino para la identificación de QTL con influencia sobre caracteres de morfología mamaria: resultados preliminares

B. Gutiérrez Gil, M. El Zarei, L. Álvarez, L.F. de la Fuente, Y. Bayón, F. San Primitivo, J.J. Arranz

Dpto. Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León

E-mail: beatriz.gutierrez@unileon.es; jjarranz@unileon.es

Resumen

El objetivo del presente estudio es la localización de regiones genómicas con influencia sobre caracteres de morfología mamaria en ganado ovino, utilizando la metodología de *genome scan*, o barrido genómico. Con este fin, se ha analizado una población comercial de ganado ovino de raza Churra, organizada en un diseño hija compuesto por 8 familias de medio-hermanas. Un total de 182 marcadores genéticos, distribuidos uniformemente a lo largo del genoma ovino autosómico, fueron genotipados en la población objeto de estudio. Como medidas cuantitativas se utilizaron las desviaciones calculadas para los caracteres de morfología mamaria considerados en el programa de mejora genética de la raza ovina Churra: inserción de la ubre, posición de los pezones, tamaño de los pezones, profundidad y forma global de la ubre. Para la identificación de los QTL se realizó un análisis de regresión de los fenotipos con marcadores flanqueantes. El análisis del genoma para el conjunto de la población permitió la identificación de 11 regiones asociadas con estos caracteres, al nivel *chromosome-wise*, en los siguientes cromosomas: 4, 6, 7, 8, 10, 14, 15, 20, 22, 23 y 26. Para las asociaciones significativas se debe realizar una verificación previamente al abordaje del mapeo fino.

Palabras clave: QTL, Ovino de leche, Morfología mamaria, Barrido genómico

Summary

Analysing the ovine genome to detect QTL for mammary morphology: preliminary results

The objective of this work was the identification of chromosomal regions influencing udder morphology traits in dairy sheep by using the genome scan approach. For this purpose, we have analyzed a commercial population of Spanish Churra sheep organized according a daughter design, which included 8 half-sib families. A total of 182 genetic markers, evenly distributed along the ovine autosome, were genotyped in the studied population. As quantitative measurements for the analysis, we used the yield deviations calculated for each of the udder traits considered in the breeding program of Churra sheep: udder attachment, teat position and teat size, udder depth and udder shape. A multimarker regression analysis was used to detect QTL. The whole genome analysis allowed the identification of 11 chromosome-wide significant regions associated with the traits analyzed in the following chromosomes: 4, 6, 7, 8, 10, 14, 15, 20, 22, 23 y 26. Confirmation of the detected effects is required before attempting future fine mapping studies on these regions.

Key words: QTL, Dairy sheep, Udder morphology, Genome scan

Introducción

Los caracteres relacionados con la morfología mamaria en ganado ovino de leche son de gran importancia ya que determinan la adaptabilidad al ordeño mecánico e influyen de forma significativa en el rendimiento productivo del animal. Al igual que la mayor parte de los caracteres de interés económico en las especies de abasto, estos caracteres están sometidos a un control genético complejo. Desde el punto de vista genético resulta interesante dilucidar la arquitectura de estos caracteres y un primer paso es la detección de los genes o QTL (Quantitative Trait Loci) que controlan las diferencias fenotípicas observadas. En el ganado vacuno se han realizado numerosos estudios sobre diversos caracteres morfológicos, fundamentalmente en el ganado vacuno de raza Frisona (Schrooten *et al.*, 2000; Hiedler *et al.*, 2003, para una revisión general visitar la siguiente URL: http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/qtraitology?class_ID=1005).

En el ganado ovino la utilización de estos caracteres, en los programas de mejora ha sido mucho más reciente. El programa de mejora genética del ganado ovino de raza Churra incluye, desde el año 2002, cinco caracteres lineales utilizados para valorar la morfología mamaria como objetivo secundario de selección. Dentro de un proyecto general de búsqueda de QTL con influencia sobre los caracteres con importancia económica en el ganado ovino de leche, el objetivo del presente artículo es la identificación de los fragmentos génicos portadores de genes con influencia sobre los caracteres de morfología mamaria en la raza ovina Churra. En este artículo se presentan los resultados globales de este análisis genómico, y su estudio comparativo con QTL previamente descritos en otras poblaciones de ganado ovino y vacuno.

Material y métodos

El "diseño hija" descrito por Soller & Genizi (1978) ha sido utilizado para estudiar la segregación de marcadores genéticos en una población comercial de ganado ovino de raza Churra, que incluyó un total de 542 animales pertenecientes a 8 familias de mediohermanas. Todos los animales incluidos en el estudio formaban parte del Núcleo de Selección de ANCHE (Asociación de criadores de Ganado Selecto de Raza Churra) y fueron generados mediante inseminación artificial. Los marcadores genéticos analizados incluyeron un total de 182 marcadores genéticos (181 microsatélites y 1 SNP), distribuidos uniformemente a lo largo del genoma autosómico ovino. A partir de los datos genotípicos obtenidos para estos marcadores se construyeron los mapas de ligamiento de los 26 autosomas ovinos para esta población, utilizando el programa CRIMAP (Green *et al.*, 1990). Los marcadores incluidos en el análisis de ligamiento, junto con las distancias genéticas entre marcadores han sido descritos previamente (Gutiérrez-Gil *et al.*, 2008).

Los datos fenotípicos considerados en el análisis fueron los correspondientes a los cinco caracteres lineales que se utilizan para valorar la morfología mamaria en el ganado ovino de raza Churra: el tamaño y posición de los pezones, la profundidad de la ubre, la inserción mamaria y la forma global de la ubre (De la Fuente *et al.*, 1996). Las medidas cuantitativas consideradas en el análisis de QTL fueron los valores YD (*yield deviation*). Estos valores se obtuvieron corrigiendo las valoraciones fenotípicas de cada uno de los caracteres estudiados para los factores ambientales que influyen en la varianza de estos caracteres (la ronda de calificación, la edad de la oveja y la fase de lactación).

El análisis de QTL se realizó utilizando el programa HSQM (Coppeters *et al.*, 1998), que implementa el método de regresión con mar-

cadore múltiples desarrollado por Knott et al. (1996). Este análisis aplica un modelo de un único QTL para cada posición del genoma, de acuerdo con los mapas de ligamiento previamente desarrollados para la población en estudio. El valor máximo del estadístico obtenido en el análisis para cada combinación cromosoma-carácter fue considerado como significativo cuando superó el nivel de significación del 5%, determinado mediante 10,000 permutaciones al nivel *chromosome-wise* (Churchill y Doerge, 1994) y de tendencia en caso de que el valor *chromosome-wise* superase el umbral de significación 10%. Los valores de significación al nivel *genome-wise* se calcularon utilizando una corrección de Bonferroni, siguiendo las indicaciones De Koning et al. (1999). A partir del análisis intrafamiliar se obtuvieron las estimaciones de los efectos de sustitución alélica segregantes.

Resultados y discusión

Para el mapa de ligamiento construido para la población en estudio, el contenido de información para la identificación de QTL alcanzó un valor promedio por cromosoma cercano al 60%. El análisis de regresión para toda la población detectó once regiones cromosómicas con una significación sugestiva, cinco de ellas con un valor $P < 0.05$ *chromosome-wise* (P_c). (tabla 1). Ninguna de estas regiones alcanzó el nivel de significación *genome-wise*.

El QTL que presentó una mayor significación ($P_c = 0.0136$) fue localizado en el extremo proximal del cromosoma 7 para el carácter posición de los pezones, seguido por el efecto identificado en el cromosoma 20 para el carácter profundidad de la ubre ($P_c = 0.016$). Los otros tres QTL con $P_c < 0.05$ fueron detectados en los cromosomas 14, 15 y 26 para los caracteres profundidad de la ubre, forma global de la ubre e inserción mama-

ria, respectivamente. Las regiones detectadas con un valor $P_c < 0.10$ afectaron a los caracteres forma global (cromosomas 4 y 23), profundidad de la ubre (cromosomas 6 y 8), posición de los pezones (cromosoma 10) y tamaño del pezón (cromosoma 22). El número de familias segregantes para cada QTL varió entre una y tres.

La respuesta a la selección conseguida mediante la aplicación de los métodos clásicos de la mejora genética podría verse incrementada de manera significativa si se conocieran las variantes alélicas del genoma que influyen sobre los caracteres sometidos a selección. De ahí, el gran esfuerzo que la comunidad científica ha dedicado en la última década a la identificación de regiones cromosómicas o QTL relacionadas con caracteres de interés económico en las especies de abasto (<http://www.animalgenome.org/QTLdb/>).

Los resultados del presente estudio sugieren la segregación de QTL con influencia sobre caracteres de morfología mamaria en el ganado ovino de raza Churra, tal y como se esperaría de una población con un esquema de selección relativamente reciente (descrito por de la Fuente et al., 1995). El análisis de regresión aplicado en el presente trabajo permitió la localización de once regiones con una indicación estadística de ser portadoras de QTL para estos caracteres. Aunque ninguno de estos QTL alcanzó una significación al nivel *genome-wise*, cuatro de ellos fueron significativos al nivel "sugestivo" propuesto por Lander and Kruglyak (1995). Para estudios de asociación en animales de abasto, este nivel de significación es considerado más apropiado que otras correcciones altamente conservadoras, tipo Bonferroni, debido al limitado poder estadístico de dichos experimentos. Siguiendo el método descrito por Weller et al. (1990), el poder de nuestro experimento para detectar un QTL que explica un 0,3 de la varianza fenotípica de un carácter de heredabilidad 0,3, sería aproximadamen-

Tabla 1. Caracterización de los posibles QTL identificados en este estudio, al nivel chromosome-wise ($P_c < 0.1$), en relación con caracteres de morfología mamaria

Table 1. Characterization of the putative QTL identified in the present study for udder morphology traits at the chromosome-wide level ($P_c < 0.1$)

Cromosoma	Carácter	cM (P_c)	Intervalo flanqueante	Efecto de sustitución alélica (puntos de escala lineal)
4	Forma de la ubre	23 (0,057)	[BMS1172-MCM144]	0,58-0,75
6	Profundidad de la ubre	1 (0,06)	[INRA133-MCM53]	1,05-1,13
7	Posición del pezón	17 (0,0136)	[BM3033-BMS528]	0,74-1,53
8	Profundidad de la ubre	25 (0,0524)	[BM1227-CSSM25]	0,74-1,45
10	Posición del pezón	5 (0,082)	[AGLA226-BMS975]	0,57-1,69
14	Profundidad de la ubre	1332 (0,045)	[MCM104-BM6507]	1,7
15	Forma de la ubre	1 (0,036)	[MCMA16-BR3510]	0,47-1,5
20	Profundidad de la ubre	8 (0,016)	[INRA132-DYA]	0,52-0,68
22	Tamaño del pezón	2 (0,067)	[MAF36-TGLA429]	1,23-1,75
23	Forma de la ubre	86 (0,093)	[MCM136-URB031]	1,07-1,65
26	Inserción de la ubre	75 (0,026)	[CSSM43-BM203]	0,61-0,79

te del 30% (asumiendo una tasa de error tipo I del 5%, y un 10% de recombinación entre el marcador y el QTL). Así pues, es probable que un número substancial de auténticos QTL segregantes en esta población no hayan sido identificados en nuestro análisis. Por ello hemos elegido la indicación estadística $P < 0.1$ (*chromosome-wise*) como indicadora de la presencia de QTL en la población. El uso de este nivel estadístico puede determinar que varias de estas regiones sean falsos positivos. Por ello se debe realizar una confirmación de las diferentes regiones en nuevas familias de la población, como paso previo al abordaje

del mapeo fino y la posible identificación de las mutaciones causales responsables de los efectos detectados.

El efecto de mayor significación detectado en nuestro estudio afectó al carácter posición de los pezones en el cromosoma 7. Este carácter es de una gran importancia en producción de leche de oveja, ya que determina la adaptación del animal al ordeño mecánico. No existen estudios anteriores que relacionen esta región con la morfología mamaria en oveja, aunque la región ortóloga bovina, situada en el cromosoma 10, parece estar asociada a este tipo de caracteres (Schrooten *et al.*,

2000; Hiendleder et al., 2003). Para este mismo carácter se identificó otro efecto significativo al 10% *chromosome-wise* en el extremo proximal del cromosoma 10. El otro carácter analizado en relación a los pezones sólo presentó una tendencia significativa ($P_c < 0.1$) en el extremo distal del cromosoma 22. Para el carácter profundidad de la ubre se detectaron dos QTL al nivel *chromosome-wise*, en los cromosomas 14 y 20, y dos regiones con tendencias significativas ($P_c < 0.1$) en los cromosomas 6 y 8. Este carácter está relacionado con el recuento de células somáticas (Fernández et al., 1997; Legarra y Ugarte, 2005), y por lo tanto mediante la selección para el mismo se conseguiría, teóricamente, mejorar indirectamente el estado de salubridad de la leche. Coincidiendo con el QTL localizado en el cromosoma 20, el segundo efecto más significativo de nuestro estudio, se han descrito QTL para altura lateral de la ubre y el grado de separación de las mamas en una población de retrocruzamiento obtenida mediante el cruce de las razas Sarda X Lacaupe (Casu et al., 2004).

Para el carácter forma global de la ubre se identificó una región significativa en el cromosoma 15, junto con tendencias significativas en los cromosomas 4 y 23. Este carácter es un índice complejo que engloba a los demás caracteres, y con su mejora se conseguiría una ubre con mayor adaptación al ordeño mecánico.

El QTL identificado en el cromosoma 26 fue el único efecto significativo detectado para el carácter inserción de la ubre, un carácter de gran importancia, ya que se relaciona con la capacidad de la mama para soportar mejor la mayor producción de leche. Este QTL es coincidente con varios QTL relacionados con caracteres de morfología mamaria en el ganado ovino (Casu et al., 2004; Barillet et al., comunicación personal), así como en la región ortóloga del genoma bovino (Schrooten et al., 2000).

Las regiones aquí identificadas suponen el punto de partida para estudios posteriores centrados en el incremento de los marcadores analizados y la re-definición de los intervalos de confianza de los QTL identificados, con el objeto de identificar genes candidatos en relación al efecto detectado en el barrido genómico inicial. Los grandes esfuerzos desarrollados por la comunidad científica en el estudio de la secuenciación y organización de los genomas bovino y ovino [ej. anotación del genoma bovino (www.ensembl.com), genoma virtual ovino (Dalrymple et al., 2007)], así como las expectativas derivadas de los últimos avances metodológicos (secuenciación de última generación, el SNP-chips, etc) facilitarán, en gran medida, la ardua tarea de mapeo fino y clonado de QTL.

Agradecimientos

Trabajo Financiado por los proyectos 1FD97-0225 del Ministerio de Educación y Ciencia y *genesheepsafety* (QLK5-2000-00656) de la Unión Europea. Beatriz Gutiérrez-Gil disfruta de un contrato Juan de la Cierva del MEC

Bibliografía

- Casu S, 2004. Recherche de QTL contrôlant la cinétique de l'émission du lait et la morphologie de la mamelle chez les brebis laitières. Doctoral Thesis. Institut National Agronomique. Paris-Grignon. Paris, France.
- Churchill G, Doerge R, 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, 138, 963-971.
- Coppieters W, Kvasz A, Farnir F, Arranz JJ, Grisart B, Mackinnon M, Georges M, 1998. A rank-based nonparametric method for mapping quantitative trait loci in outbred half-sib pedigrees: application to milk production in a grand-daughter design. *Genetics*, 149, 1547-1555.

- Dalrymple BP, Kirkness EF, Nefedov M, McWilliam S, Ratnakumar A, Barris W, Zhao S, Shetty J, Maddox JF, O'Grady M, Nicholas F, Crawford AM, Smith T, de Jong PJ, McEwan J, Oddy VH, Cockett NE, International Sheep Genomics Consortium, 2007. Using comparative genomics to reorder the human genome sequence into a virtual sheep genome. *Genome Biol.* 8:R152.
- De Koning DJ, Janss LL, Rattink AP, van Oers PA, de Vries BJ, Groenen MA, van der Piel JJ, de Groot PN, Brascamp EW, van Arendonk JA, 1999. Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (*Sus scrofa*). *Genetics*, 152, 1679-1690.
- De la Fuente LF, Fernández G, San Primitivo F, 1995. Breeding programme for the Spanish Churra sheep breed. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 11, 165-172.
- De La Fuente LF, Fernández G, San Primitivo F, 1996. A linear evaluation system for udder traits of dairy ewes. *Livest. Prod. Sci.*, 45, 171-178.
- Fernández G, Baro JA, De La Fuente LF, 1997. Genetic parameters for linear udder traits of dairy ewes. *J. Dairy Sci.*, 80, 601-605.
- Green P, Falls K, Crooks S, 1990. Documentation for CRI-MAP, version 2.4. Washington University school of Medicine, St Louis, USA.
- Gutiérrez-Gil B, El-Zarei MF, Bayón Y, de la Fuente LF, San Primitivo F, Arranz JJ, 2007. Genome Scan analysis for detection of QTL influencing somatic cell score in dairy sheep. *J. Dairy Sci.*, 90, 422-426.
- Hiendleder S, Thomsen H, Reinsch N, Bennewitz J, Leyhe-Horn B, Looft C, Xu N, Medjugorac I, Russ I, Kühn C, Brockmann GA, Blümel J, Brenig B, Reinhardt F, Reents R, Averdunk G, Schwerin M, Förster M, Kalm E, Erhardt G, 2003. Mapping of QTL for Body Conformation and Behavior in Cattle. *J. Hered.*, 94, 496-506.
- Knott SA, Elsen JM, Haley CS, 1996. Methods for multiple-marker mapping of quantitative trait loci in half-sib population. *Theor. Appl. Genet.*, 93, 71-80.
- Lander E, Kruglyak L, 1995. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat. Genet.*, 11, 241-247.
- Legarra A, Ugarte E, 2005. Genetic parameters of udder traits, somatic cell score, and milk yield in Latxa sheep. *J. Dairy Sci.*, 88, 2238-2245.
- Schrooten C, Bovenhuis H, Coppieters W, Van Arendonk JA, 2000. Whole genome scan to detect quantitative trait loci for conformation and functional traits in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 83, 795-806.
- Soller M, Genizi A, 1978. The efficiency of experimental designs for the detection of linkage between a marker locus and a locus affecting a quantitative trait in segregating population. *Biometrics*, 34, 47-55.
- Weller JI, Kashi Y, Soller M, 1990. Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 73, 2525-2537.

(Aceptado para publicación el 28 de abril de 2008)