



universidad
de león

Universidad de León
Facultad de Veterinaria
Departamento de Producción Animal

Programa de Doctorado: Ciencias Veterinaria y de los alimentos-(D304)

Selección Genómica en el Ganado
Ovino de Aptitud Lechera

“Genomic Selection in Dairy Sheep Livestock”

Milagros Sánchez Mayor

León, 2020

Directores de la tesis.

Profesor Doctor Juan José Arranz Santos[†]

[†]Departamento de Producción Animal. Campus de Vegazana s/n. Universidad de León.
España.

Doctor Ricardo Pong-Wong[‡]

[‡]The Roslin Institute and Royal (Dick) School of Veterinary Studies. University of Edinburgh.
Roslin. UK.

El trabajo de investigación de esta memoria de tesis de doctorado ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España (Referencia: BES-2013-063614) y por el Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España (Referencia: AGL2015-66035-R).



“You can never know everything,” Lan said quietly, “and part of what you know is always wrong. Perhaps even the most important part. A portion of wisdom lies in knowing that. A portion of courage lies in going on anyway.”

— Robert Jordan, *Winter's Heart*, Book IX of the *Wheel of Time*.

Dedicatoria

**Por un conjunto no numerable de razones naturales, racionales,
irracionales, reales, imaginarios, complejos, ..., ¡¡¡¡y cuantos conjuntos no
numerales de razones existan!!!!:**

A mis padres.

Agradecimientos

Primero quiero agradecerles a mis padres y familia, en especial a mi tía Alicia y mi padrastro Oriol, que día a día me toleran desde la distancia y me apoyan incondicionalmente.

A mis directores de tesis Ricardo y Juan José, porque estoy segura que en estos seis largos años han tenido que tolerarme muchísimo y sé lo difícil que puede ser. A Juan José por toda la enseñanza en la genética molecular y cuantitativa y por darme la oportunidad de hacer este doctorado. A Ricardo le debo todo su apoyo incondicional y enseñanzas en la genética cuantitativa y predicción genómica, además de todos sus consejos, momentos compartidos y charlas de nuestras antiguas vidas socialistas. Tú has sido como un hermano, para mí eres un ejemplo a seguir. Y como siempre te he dicho, esta tesis es más tuya que mía.

Al profesor Fernando por dedicarme siempre esos momentos en los que tenía dudas sobre la mejora genética en la raza Churra y su paciencia para explicarme cada detalle. A la postdoc Beatriz por tener la paciencia y ayudarme siempre con mi inglés que es fatal.

A Pau Navarro por su ayuda y colaboración en todo momento para la realización de los artículos y de mis estancias en Escocia. A Valentina Riggio por ser tan servicial conmigo en cada estancia en el Roslin Institute y por toda la ayuda incondicional en los artículos.

Agradezco a Llibertat Tusell Palomero y a Oswald Matika por su incondicional sí, para ser los examinadores de la tesis.

Agradecer también al Ministerio de Ciencia e Innovación y al Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España por las diferentes financiaciones que recibí para la realización de esta tesis y las diferentes estancias en el extranjero.

A los compañeros de la universidad y amigos que hice en la ciudad de León en estos seis largos y eternos años. Que sepan que les debo a ellos muchas veces mi estabilidad emocional. En especial a Marta Peláez la secretaria de la facultad por ser tan dulce y cariñosa conmigo.

No se me puede olvidar agradecer a este doctorado y a la ciudad de León, que a ellos le debo mi obesidad, artritis reumatoidea, apnea del sueño, hipotiroidismo crónico, hígado graso, caída del pelo, envejecimiento prematuro, entre otras cosas.

A todos: ¡GRACIAS! ¡¡¡Hasta la Victoria Siempre!!! Che.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Introducción.	1
1. Contexto del ganado ovino en España.	3
1.1. El sector del ganado ovino de leche en España.	4
1.2. La mejora genética del ganado de ovino de leche en España.	4
1.3. Implantación de la Selección Genómica en el Ganado ovino de leche en España.	6
Objetivos.	11
Revisión bibliográfica.	15
1. Introducción a la selección genética.	17
2. Introducción a la Selección Genómica.	19
2.1. El método BLUP y el modelo animal.	20
2.2. Selección Asistida por Marcadores.	23
2.3. Selección Genómica.	24
2.4. Métodos de Selección Genómica.	25
3. Factores que afectan la precisión de las predicciones genómicas.	28
3.1. Población de referencia, tamaño y su estructura genética.	28
3.2. Desequilibrio de ligamiento, densidad de marcadores y relación genética. Tamaño efectivo de la población y número efectivo de segmentos de cromosomas segregando dentro de la población.	31
3.3. Heredabilidad del carácter.	36
3.3.1 La heredabilidad perdida.	37
3.4. Pedigrí y número de generaciones.	40
3.5. Métodos aplicados a la selección genómica y variables respuestas.	42
3.5.1. Modelos de evaluaciones genómicas con múltiples caracteres como variables respuesta versus a solo un carácter.	44
4. Avances en el estudio de la predicción genómica en el ganado ovino.	46
4.1. Evaluación genómica en ganado ovino y sus beneficios.	47
5. Estudios basados en la raza española Churra.	55
Materiales y Métodos.	57
1. Materiales.	59
1.1. Muestra de animales de la raza Churra.	59
1.1.1. Animales, pedigrí, fenotipos y variables explicativas usadas para el estudio de la raza Churra.	60
1.1.2. Genotipos usados para la predicción genómica de la raza Churra.	62
1.2. Muestra de animales de la raza Assaf.	63
1.1.1. Animales, pedigrí, fenotipos y variables explicativas de la muestra de ovejas de la raza Assaf.	65
2. Métodos.	69
2.1. Análisis con datos reales.	69
2.1.1. Análisis aplicados a los datos reales de Churra.	69
2.1.1.1. Métodos de predicción genética y genómica.	71
2.1.1.2. Grupos candidatos de interés.	75
2.1.2. Análisis aplicados a los datos reales de Assaf.	78
2.1.2.1. Estimación de los parámetros genéticos para los caracteres de coagulación y rendimiento quesero.	78

2.1.2.2. Estimación de las correlaciones fenotípicas y genéticas de los caracteres de coagulación y rendimiento quesero con los caracteres de leche. _____	79
2.1.2.3. Selección Indirecta. _____	80
2.1.2.4. La respuesta genética directa a la selección en hembras y machos de Assaf. _____	82
2.1.2.5. La respuesta correlacionada a la selección a través de un proxi y su eficiencia de selección relativa. _____	83
2.1.2.6. Índice de selección y sus respuesta correlacionada y eficiencia relativa. _____	84
2.1.2.7. Balanceando la respuesta a la selección para los caracteres de coagulación, rendimiento quesero y producción de leche. _____	87
2.2. Análisis con datos simulados. _____	89
2.2.1. Estudio de simulación 1. _____	89
2.2.2. Estudio de simulación 2. _____	90
2.2.3. Estudio de simulación 3. _____	91
<i>Resultados y Discusión. _____</i>	97
<i>Chapter 1. Accuracy of pedigree and genomic predictions of a small genotyped Spanish National Population of Churra Sheep Breed. _____</i>	99
Abstract _____	102
Introduction _____	103
Materials and Methods _____	105
Phenotypic Data and Pedigree _____	105
Genotype Data _____	106
Heritability and Calculation of Corrected Phenotype _____	107
Genetic Prediction Methods _____	108
Targeted candidate groups _____	113
Simulation Study _____	115
Results _____	117
Variance Component Estimates _____	117
Benefit of genomic prediction in the Churra dataset _____	117
Benefit of Genomic prediction in the simulated data _____	119
Discussion _____	121
Conclusions _____	127
References _____	128
Tables _____	132
Supplementary Material. _____	142
Appendix 1. Removing parents' effect from deregressed breeding value when the individual or its parents are inbred. _____	142
<i>Chapter 2. Effect of the genotyping strategies on the sustained benefit of single step genomic BLUP over multiple generations. _____</i>	147
Abstract _____	150
Background _____	151
Methods _____	152
Founder population in linkage disequilibrium _____	152
Population structure _____	153
Genetic architecture _____	154
Genetic evaluation and selection _____	155

Scenarios compared _____	156
Criteria of comparison _____	157
Results _____	158
Benefit of GBLUP when all candidates are genotyped _____	158
Benefit of ssGBLUP when only a proportion of candidates are genotyped _____	158
Discussion _____	161
Conclusions _____	166
List of Abbreviations _____	166
References _____	169
Figures _____	172

Chapter 3. Phenotypic and genetic parameter estimates of cheese-making traits and their relationship with milk production, composition and functional traits in Spanish Assaf sheep. _____ 179

Abstract _____	182
Introduction _____	183
Materials and Methods _____	184
Animals, milk sample collection and laboratory analysis _____	184
Genetic parameter estimation for cheese-making traits _____	186
Estimates of genetic and phenotypic correlations between cheese-making traits and milk traits _____	187
Results _____	188
Descriptive statistics for cheese-making traits _____	188
Genetic parameters for cheese-making traits _____	189
Genetic parameters for milk traits and their correlations with cheese-making traits _____	190
Discussion _____	191
Conclusions _____	198
References _____	200
Tables _____	203
Figures _____	210

Chapter 4. The potential benefit of indirect selection for Cheese-Making Traits in Spanish Assaf Sheep. _____ 211

Abstract _____	214
Introduction _____	215
Results and Discussion _____	218
Traits and expected direct response to selection _____	218
Proxies for cheese-making traits _____	221
Selection to simultaneously improve both milk production and cheese-making traits _____	223
Conclusions _____	226
Material and Methods _____	226
Traits and their phenotypic and covariance matrices _____	226
The direct genetic response to selection on ewes and rams _____	229
The correlated response to selection via a proxy and its relative selection efficiency _____	230
Selection index and their correlated response and relative selection efficiency _____	231

Balancing the response to selection for milk production and cheese-making traits _____	234
Acknowledgements _____	235
Funding _____	236
Competing Interest _____	236
References _____	237
Tables _____	240
Figures _____	243
Supplementary Information _____	248
<i>Discusión General</i> _____	249
<i>General Discussion</i> _____	249
Discusión General _____	251
Objetivo 1. Evaluar el beneficio potencial de los métodos de predicción genómica en el esquema de selección implementado por ANCHE en la población de ovejas Churra. _____	251
Objetivo 2. Cuantificar el impacto de la proporción de candidatos a ser genotipados y la estrategia de selección en el beneficio sostenido del ssGBLUP. _____	256
Objetivo 3. Estudio de nuevos caracteres a la selección que pueden beneficiarse de las evaluaciones genómicas. _____	259
Discusión Global _____	265
General Discussion _____	271
Objective 1. To evaluate the potential benefit of genomic prediction methods in the selection scheme implemented by ANCHE in the Churra sheep population. _____	271
Objective 2. To quantify the impact of the proportion and the selection strategy on the sustained benefit of single step genomic BLUP. _____	276
Objective 3. Study of novel traits for selection which can benefit from genomic evaluation. _____	278
Global discussion _____	283
<i>Resumen</i> _____	289
<i>Abstract</i> _____	289
Resumen _____	291
Abstract _____	297
<i>Conclusiones</i> _____	301
<i>Conclusions</i> _____	301
Conclusiones _____	303
Conclusions _____	305
<i>Referencias</i> _____	307
Referencias _____	309

ÍNDICE DE TABLAS

Introducción

TABLA 1. RAZAS, CLASIFICACIÓN OFICIAL DE LA RAZA, TENDENCIA EVOLUTIVA, NÚMERO DE REPRODUCTORES, NÚMERO DE REBAÑOS Y USO PRODUCTIVO DE LAS RAZAS DE OVINO ESPAÑOLAS. _____	8
---	---

Materiales y Métodos

TABLA 2. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LOS FENOTIPOS RECOGIDOS PARA LOS DATOS ANALIZADOS DE LA RAZA CHURRA. _____	61
TABLA 3. DISTRIBUCIÓN DE LAS CINCO VARIABLES EXPLICATIVAS UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO. _____	62
TABLA 4. RESUMEN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS ANIMALES GENOTIPADOS CON HIJOS EN EL PEDIGRÍ POR AÑO DE NACIMIENTO. _____	63
TABLA 5. DISTRIBUCIÓN DE LAS MUESTRAS DE LECHE RECOGIDAS Y ANALIZADAS PARA EL ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS GENÉTICOS DE LA RAZA ASSAF. _____	65

Resultados y Discusión

Chapter 1. Accuracy of pedigree and genomic predictions of a small genotyped Spanish National Population of Churra Sheep Breed.

TABLA 1. DESCRIPTIVE STATISTICS OF THE CHURRA DATASET. _____	132
TABLA 2. SUMMARY OF THE DISTRIBUTION OF THE GENOTYPED ANIMALS WITH OFFSPRING IN THE PEDIGREE BY BIRTH YEAR. _____	133
TABLA 3. HERITABILITIES AND PERMANENT ENVIRONMENT EFFECT (AND THEIR STANDARD ERRORS IN BRACKETS) FOR EACH TRAIT. THEY WERE ESTIMATED WITH BLUP EITHER USING ALL ANIMALS IN THE PEDIGREE AS DESCRIBED FOR EACH TRAIT (“ALL ANIMALS”) OR ONLY USING PHENOTYPIC RECORDS OF GENOTYPED EWES (“GENOTYPED”). _____	134
TABLA 4. PRECISION OF ESTIMATED BREEDING VALUES FOR THE THREE GROUPS OF EWE CANDIDATES WITH BLUP, AND GENOMIC PREDICTION METHODS (GBLUP, DGBLUP AND SSGBLUP) FOR THE CHURRA DATASET. RESULTS ARE THE PEARSON’S CORRELATION BETWEEN CORRECTED PHENOTYPES AND GEBV/EBV CALCULATED WITH DIFFERENT EVALUATION METHODS WHERE THE ANIMALS IN TRAINING POPULATION ARE EITHER (I) EWES FROM THE 16 GENOTYPED FAMILIES OR (II) ALL GENOTYPED AND UNGENOTYPED EWES IN PEDIGREE WITH AVAILABLE PHENOTYPIC INFORMATION. THE CORRELATIONS WERE CALCULATED FOR THREE EWE GROUPS: (A) GENOTYPED EWES HALF-SIB OF GENOTYPED TRAINING EWES, (B) UNGENOTYPED DAUGHTERS FROM GENOTYPED RAMS AND (C) YOUNGEST UNGENOTYPED EWES (I.E. FORWARD PREDICTION). _____	135
TABLA 5. PRECISION OF ESTIMATED BREEDING VALUES FOR THE GENOTYPED RAMS WITH BLUP, AND GENOMIC PREDICTION METHODS (GBLUP AND SSGBLUP) FOR THE CHURRA DATASET. RESULTS ARE THE PEARSON’S CORRELATION BETWEEN EBV OF GENOTYPE	

RAMS CALCULATED WITH ALL INFORMATION AND GEBV/EBV CALCULATED WITH THE TRAINING POPULATION EXCLUDING DAUGHTERS OF THE VALIDATED RAMS. _____ 137

TABLE 6. PRECISION OF ESTIMATED BREEDING VALUES OF EWES WITH BLUP AND GBLUP FOR SIMULATION DATASET 1. CORRELATION BETWEEN SIMULATED PHENOTYPES AND ESTIMATED BREEDING VALUES CALCULATED WITH BLUP AND GBLUP. _____ 138

TABLE 7. PRECISION OF ESTIMATED BREEDING VALUES FOR THE THREE GROUPS OF EWE CANDIDATES WITH BLUP, AND GENOMIC PREDICTION METHODS (GBLUP, DGBLUP AND SSGBLUP) FOR THE SIMULATION DATASET 2. RESULTS ARE THE PEARSON'S CORRELATION BETWEEN CORRECTED PHENOTYPES AND GEBV/EBV CALCULATED WITH DIFFERENT EVALUATION METHODS WHERE THE ANIMALS IN TRAINING POPULATION ARE EITHER (I) EWES FROM THE 16 GENOTYPED FAMILIES OR (II) ALL GENOTYPED AND UNGENOTYPED EWES IN PEDIGREE WITH AVAILABLE PHENOTYPIC INFORMATION. THE CORRELATIONS WERE CALCULATED FOR THREE EWE GROUPS: (A) GENOTYPED EWES HALF-SIBS OF GENOTYPED TRAINING EWES, (B) UNGENOTYPED DAUGHTERS FROM GENOTYPED RAMS AND (C) YOUNGEST UNGENOTYPED EWES (I.E. FORWARD PREDICTION). _____ 139

TABLE 8. PRECISION OF ESTIMATED BREEDING VALUES FOR THE GENOTYPED RAMS WITH BLUP, AND GENOMIC PREDICTION METHODS (GBLUP AND SSGBLUP) FOR THE SIMULATION DATASET 2. RESULTS ARE THE PEARSON'S CORRELATION BETWEEN EBV OF GENOTYPE RAMS CALCULATED WITH ALL INFORMATION AND GEBV/EBV CALCULATED WITH THE TRAINING POPULATION EXCLUDING DAUGHTERS OF THE VALIDATED RAMS. _____ 141

Chapter 3. Phenotypic and genetic parameter estimates of cheese-making traits and their relationship with milk production, composition and functional traits in Spanish Assaf sheep.

TABLE 1. DISTRIBUTION OF THE COLLECTED MILK SAMPLES ANALYSED IN THE PRESENT STUDY PER FLOCK, YEAR, NUMBER OF COLLECTION DAYS (DAYS), NUMBER OF COLLECTED SAMPLES (N) AND THE NUMBER OF NON-COAGULATING SAMPLES PER DAY ARE ALSO INDICATED (NA). _____ 203

TABLE 2. DESCRIPTIVE STATISTICS FOR THE CHEESE-MAKING TRAITS ANALYSED IN THE PRESENT STUDY. NOBS = THE NUMBER OF OBSERVATIONS; NAS=NUMBER OF MISSING VALUES. NAS-% = NA PERCENTAGE; MIN = MINIMUM VALUE; MAX = MAXIMUM VALUE; SD=STANDARD DEVIATION; CV-%=COEFFICIENT OF VARIATION (PERCENTAGE). _____ 204

TABLE 3. DESCRIPTIVE STATISTICS OF MILK TRAITS FOR THE COAGULATING SAMPLES STUDIED IN THE PRESENT WORK. MIN=MINIMUM VALUE; MAX=MAXIMUM VALUE; MEAN=MEAN OF THE TRAIT; SD=STANDARD DEVIATION; CV-%=COEFFICIENT OF VARIATION (PERCENTAGE). _____ 205

TABLE 4. ESTIMATED HERITABILITIES AND GENETIC AND PHENOTYPIC CORRELATIONS FOR THE CHEESE-MAKING TRAITS STUDIED IN THE PRESENT WORK. HERITABILITY (MAIN DIAGONAL ELEMENTS), PHENOTYPIC CORRELATIONS (OFF-DIAGONAL LOWER ELEMENTS) AND GENETIC CORRELATIONS (OFF-DIAGONAL UPPER ELEMENTS). BETWEEN BRACKETS, THE STANDARD ERROR FOR EACH PARAMETER IS INDICATED. _____ 206

TABLE 5. ESTIMATED GENETIC PARAMETERS FOR THE MILK TRAITS STUDIED IN THE PRESENT WORK. HERITABILITY (DIAGONAL ELEMENTS), PHENOTYPIC CORRELATIONS (OFF-DIAGONAL LOWER ELEMENTS) AND GENETIC CORRELATIONS (OFF-DIAGONAL UPPER ELEMENTS). BETWEEN BRACKETS, THE STANDARD ERROR FOR EACH PARAMETER IS INDICATED. _____ 207

TABLE 6. ESTIMATED PHENOTYPIC AND GENETIC CORRELATIONS OF CHEESE-MAKING TRAITS WITH MILK TRAITS STUDIED IN THE PRESENT WORK AS AN EXPLORATORY STUDY. BETWEEN BRACKETS, THE STANDARD ERROR FOR EACH PARAMETER IS INDICATED. 208

Chapter 4. The potential benefit of indirect selection for Cheese-Making Traits in Spanish Assaf Sheep.

TABLE 1. THE EXPECTED RESPONSE FROM DIRECT SELECTION ON THE TRAIT ITSELF FOR EWE (WITH EWE'S OWN RECORD) AND RAM (PROGENY-TESTED WITH 10 HALF-SIB DAUGHTERS) CANDIDATES. _____ 240

TABLE 2. HERITABILITIES (MAIN DIAGONAL ELEMENTS), PHENOTYPIC (OFF-DIAGONAL LOWER ELEMENTS) AND GENETIC (OFF-DIAGONAL UPPER ELEMENTS) CORRELATIONS BETWEEN THE CHEESE MAKING, MILK PRODUCTION AND FUNCTIONAL TRAITS USED TO CALCULATE THE GENETIC RESPONSES. ESTIMATES ARE AFTER RESCALING, BENDING AND RESCALING AGAIN THE ORIGINAL PHENOTYPIC AND GENOTYPIC COVARIANCE MATRICES. _____ 241

ÍNDICE DE FIGURAS

Resultados y Discusión

Chapter 2. Effect of the genotyping strategies on the sustained benefit of single step genomic BLUP over multiple generations.

FIGURE 1. COMPARISON OF THE RESPONSE TO SELECTION WHEN USING GBLUP (RED LINES) AND BLUP (BLACK LINES) EVALUATION ACROSS ALL GENERATIONS. _____ 172

FIGURE 2. RESPONSE TO SELECTION ACROSS GENERATIONS FOR THE SSGBLUP SCENARIOS WHERE ONLY A PROPORTION OF THE CANDIDATES ARE GENOTYPED. GRAPHS IN TOP ROW SHOW THE CUMULATIVE GENETIC GAIN, GRAPHS IN MIDDLE ROW SHOW THE RELIABILITY, AND GRAPHS IN BOTTOM ROW SHOW THE GENETIC VARIANCE. THE SCENARIOS ARE FOR GENOTYPING STRATEGIES (RANDOM: LEFT COLUMN, TOP: MIDDLE COLUMN AND EXTREME: RIGHT COLUMN) AND DIFFERENT PROPORTION OF CANDIDATES GENOTYPED (— 70%, — 50%, — 40%, — 30%, — 20% AND — 10%). RESULTS FROM GBLUP (—) AND BLUP (—) ARE ALSO SHOWN AS THEY ARE THE RESPECTIVE UPPER AND LOWER LIMIT OF SSGBLUP, EQUIVALENT TO THE SITUATIONS WHERE 100% AND 0% OF THE CANDIDATES ARE GENOTYPED. _____ 173

FIGURE 3. EFFICIENCY OF THE SSGBLUP IN TERMS OF THEIR CUMULATIVE GENETIC RESPONSE FOR THE DIFFERENT GENOTYPING STRATEGIES (— RANDOM, — TOP, — EXTREME) AND PROPORTION OF GENOTYPED CANDIDATES (ONE PER GRAPH). THE DOTTED LINE IN EACH GRAPH INDICATES THE PROPORTION OF CANDIDATES WHICH WERE GENOTYPED IN THE CORRESPONDING SCENARIO SHOWN IN THE GRAPH IN QUESTION. _____ 174

FIGURE 4. EFFICIENCY OF THE SSGBLUP IN TERM OF THEIR OVERALL RELIABILITY (COMBINING BOTH GENOTYPED AND UNGENOTYPED ANIMALS) FOR THE DIFFERENT GENOTYPING STRATEGIES (— RANDOM, — TOP, — EXTREME) AND PROPORTION OF GENOTYPED CANDIDATES (ONE PER GRAPH). THE DOTTED LINE IN EACH GRAPH INDICATES THE PROPORTION CANDIDATES WHICH WERE GENOTYPED IN IN THE CORRESPONDING SCENARIO SHOWN IN THE GRAPH IN QUESTION. _____ 175

FIGURE 5. RELIABILITY OF SSGBLUP FOR GROUP OF GENOTYPED AND UNGENOTYPED CANDIDATES FOR P=10% (LEFT), 40% (MIDDLE) AND 70% (RIGHT) AND DIFFERENT GENOTYPING STRATEGIES (— RANDOM, — TOP, — EXTREME). _____ 176

FIGURE 6. PROPORTION OF THE GENOTYPED MALE (LEFT) AND FEMALE (RIGHT) CANDIDATES WHICH WERE SELECTED AS PARENT OF THE NEXT GENERATION ACROSS THE THREE DIFFERENT GENOTYPING STRATEGIES (— RANDOM, — TOP, — EXTREME). EACH POINT IS THE VALUE FOR ONE REPLICATE (100 REP) ACROSS THE 6 PROPORTION OF GENOTYPED CANDIDATES (I.E. 10, 20, 30, 40, 50 & 70%). 1 IN THE Y-AXIS MEANS THAT ALL GENOTYPED CANDIDATES OF A GIVEN SEX WERE SELECTED AND 0 MEANS NONE WAS SELECTED. 177

Chapter 3. Phenotypic and genetic parameter estimates of cheese-making traits and their relationship with milk production, composition and functional traits in Spanish Assaf sheep.

FIGURE 1. RESULTS OF THE PRINCIPAL COMPONENT (PC) ANALYSIS PERFORMED IN THE PRESENT STUDY WITH THE CHEESE-MAKING TRAITS AND THE MILK TRAITS CONSIDERED. THE GRAPHICAL REPRESENTATIONS OF PC1 VS. PC2 (A) Y PC1 VS. PC3 (B) FOR ALL THE 16 TRAITS ANALYSED HERE ARE PROVIDED HERE. _____ 210

Chapter 4. The potential benefit of indirect selection for Cheese-Making Traits in Spanish Assaf Sheep.

FIG 1. RELATIVE SELECTION EFFICIENCY (RSE) OF MILK PRODUCTION TRAITS (PP, FP, LP, MY, PY, FY, LY); FUNCTIONAL TRAITS (PH, UREA LSCC) OR THE ASSAFE INDEX WHEN USED AS PROXIES FOR MCP (RCT, LOGK₂₀, A₆₀; SEE A1 AND B1 PLOTS), AND CY TRAITS (ILCY, ILDCY, DCY, DDCY; SEE A2 AND B2 PLOTS). THE ESTIMATES BASED ON RAM'S PROGENY TEST ARE PRESENTED IN A1 AND A2 GRAPHS. THE ESTIMATES BASED ON EWE OWN RECORD ARE PRESENTED IN B1 AND B2 GRAPHS. _____ 243

FIG 2. RELATIVE SELECTION EFFICIENCY (RSE) EXPECTED ON THE MCP (RCT, LOGK₂₀, A₆₀; SEE A1 AND B1 PLOTS) AND CY TRAITS (ILCY, ILDCY, DCY, DDCY; SEE A2 AND B2 PLOTS) WHEN VARYING THE RELATIVE WEIGHT GIVEN TO THE SELECTION OBJECTIVES: CONSIDERING RCT VERSUS ILCY (PLOTS A1 AND A2) OR A₆₀ VERSUS ILCY (PLOTS B1 AND B2). THE SELECTION CRITERIA ARE BASED ON PROGENY TEST INFORMATION AND THE INDEX INCLUDED PP, FP, PY, FY, PH, UREA, AND LSCC. _____ 244

FIG 3. RELATIVE SELECTION EFFICIENCY (RSE) EXPECTED ON THE MCP (RCT, LOGK₂₀, A₆₀; SEE A1 AND B1 PLOTS) AND CY TRAITS (ILCY, ILDCY, DCY, DDCY; SEE A2 AND B2 PLOTS) WHEN VARYING THE RELATIVE WEIGHT GIVEN TO THE SELECTION OBJECTIVES: CONSIDERING RCT VERSUS ILCY (PLOTS A1 AND A2) OR A₆₀ VERSUS ILCY (PLOTS B1 AND B2). THE SELECTION CRITERIA ARE BASED ON THE EWE OWN RECORD AND THE INDEX INCLUDED PP, FP, PY, FY, PH, UREA, AND LSCC. _____ 245

FIG 4. RELATIVE SELECTION EFFICIENCY (RSE) EXPECTED ON THE MCP (RCT, LOGK₂₀, A₆₀; SEE A1 AND B1 PLOTS), CY TRAITS (ILCY, ILDCY, DCY, DDCY; SEE A2 AND B2 PLOTS) AND PY, FY AND LSCC (SEE A2 AND B2 PLOTS) WHEN VARYING THE RELATIVE WEIGHT GIVEN TO CMT (RCT AND ILCY WITH THE SAME WEIGHT) AND PRODUCTION TRAITS (PY AND FY WITH THE SAME WEIGHT AS IN THE ASSAFE INDEX). THE SELECTION CRITERIA ARE BASED ON PROGENY TEST INFORMATION (PLOTS A1, A2 AND A3) OR ON THE ANIMALS' OWN RECORD (PLOTS A1, A2 AND A3) AND THE INDEX INCLUDED PP, FP, PY, FY, PH, UREA, AND LSCC. FOR ILLUSTRATION, FOR THE POSITION 0.25/0.75, THE ACTUAL ECONOMIC WEIGHTS GIVEN TO RCT, ILCY, PY AND FY ARE 0.25*0.5, 0.25*0.5, 0.75*0.63 AND 0.75*0.37, RESPECTIVELY. THE SECTION OF THE CURVES SHOWN IN DASHED LINES INDICATE THE CASES WHEN THE RSE WITH THE PROPOSED SELECTION INDEX IS LOWER THAN THE EXPECTED RSE USING THE ASSAFE INDEX. _____ 246

SUPPLEMENTARY FIG S1. SCATTER PLOT WITH ORIGINAL AND BENDED ESTIMATES OF THE PHENOTYPIC (A1), AND GENETIC (B1) CORRELATIONS AND HERITABILITIES (C1) WHEN BENDING WAS DONE ON THE ORIGINAL (BLUE CIRCLES) OR THE RESCALED-STANDARDIZED (RED CIRCLES) VARIANCE-COVARIANCE MATRICES. _____ 248

Introducción.

1. Contexto del ganado ovino en España.

En el año 2019, el censo de ganado ovino de la Unión Europea alcanzaba los 85,401,000 de animales. España, con alrededor de 16 millones de animales, representa el 19% del total de la población de ganado ovino en Europa (EUROSTAT, 2019) y es el segundo país de Europa, después del Reino Unido. Según las estadísticas del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA), actualmente existen en España 10 razas autóctonas de Fomento que representan el 19% de las razas españolas, 34 razas en peligro de extinción (64% de las razas españolas), 1 raza de la Unión Europea (2% de las razas españolas), 1 raza de terceros países (2% de las razas españolas), 6 razas integradas en España (11% de las razas españolas) y 1 raza sintética española (2% de las razas españolas) (MAPAMA, 2019). Dentro de las razas autóctonas de Fomento, la mitad se encuentran en estado de recesión con tendencia a encontrarse en peligro de extinción. De todas las razas integradas en España, todas excepto una, se encuentran en estado evolutivo de recesión. La raza Aragonesa, caracterizada como una raza autóctona de Fomento, es la que actualmente presenta un mayor número de reproductores (374,197 animales), seguida por la Manchega (184,990 animales), la Churra (147,435 animales) y la Assaf (144,969 animales). Sin embargo, las razas con mayor número de rebaños distribuidos a lo largo de todo el país son la Aragonesa (454 animales), la Merino (239 animales), la Segureña (226 animales) y la Xalda (223 animales) (Tabla 1).

El mayor porcentaje de censo poblacional por comunidades autónomas lo tiene Extremadura, con alrededor de 3,63 millones de animales (3,629,555 ovejas censadas) el cual representa el 23% del censo total. En segundo lugar, se encuentra la comunidad de Castilla y León con un censo de 3,020,952 de animales. Le siguen Castilla La Mancha, Andalucía y Aragón con censos reportados de 2,3 millones, 2,2 millones y 1,7 millones, respectivamente. El resto de las comunidades autónomas representan menos del 20% del censo poblacional (Tabla 1).

1.1. El sector del ganado ovino de leche en España.

El uso productivo del ganado ovino se basa fundamentalmente en tres actividades: producción de carne, producción de leche y producción de lana. Dentro del ganado ovino lechero, las tres razas que más aportan a la producción de leche son la Manchega, la Churra y la Assaf. Las razas Manchega y Churra son razas Autóctonas de Fomento mientras que la raza Assaf está declarada como una raza de terceros países (Tabla 1). La raza Assaf lidera en cuanto a producción de leche, con un promedio de 400 kg por lactación, seguida por Manchega (180 kg promedio por lactación) y Churra (117 kg promedio por lactación) (MAPAMA, 2019). En cuanto a los componentes de la leche, específicamente grasa y proteína, la raza Churra lleva la delantera, con valores de 7.01% de grasa y 5.79% de proteína, seguido por Manchega con valores de 7% y 5.6%, y la Assaf con valores de 6.65% y 5.4%, para porcentaje de grasa y proteína, respectivamente (MAPAMA, 2019).

1.2. La mejora genética del ganado de ovino de leche en España.

El funcionamiento de los programas de mejora genética en el ganado ovino lechero se concentra en grupos pequeños de animales, a los que se les denominan “mejorantes”, con alto valor genético y alta fiabilidad como reproductores (Jurado, 2017; OVIespaña, 2019). Los programas de mejora genética tienen sus orígenes en los años 80. La raza Churra fue una de las pioneras en los planes de los programas de mejora genética. En el año 1981 oficializó la reglamentación específica del libro genealógico y en el año 1984 diseñó el primer programa de selección para mejorar la producción láctea. La raza Assaf diseñó y oficializó su primer libro genealógico en el 2003 y en el año 2005 presentó su primer programa de mejora genética (MAPAMA, 2019).

En general, los programas de mejora genética en el ganado ovino de leche en España son implementados en función del uso productivo y la raza. Por ejemplo, las razas Latxa y Carranzana, que son razas de ganado ovino lechero, tienen un programa basado en la selección en raza pura. Su objetivo de selección principal es el aumento de la producción lechera como medio para incrementar la rentabilidad económica de esta raza. La producción de leche en ambas razas, es destinada casi completamente a la producción de queso, por lo que en su programa de mejora tienen en cuenta caracteres como la producción y los componentes de la leche como son la proteína y la grasa. Sin embargo, caracteres relacionados a la morfología mamaria son mejorados también debido a que la presencia de ubres con morfología no deseadas pueden distorsionar la rutina del ordeño, además de causar una mayor mortalidad perinatal de los corderos por problemas de encalostamiento y amamantamiento, entre otros efectos indeseados. El incremento de la resistencia a las encefalopatías espongiformes transmitidas en el ovino, también son incluidos en el programa de mejora como un objetivo de selección, cuya finalidad es aumentar la frecuencia del alelo ARR sin comprometer de forma importante el progreso genético de la producción de leche (Confelac, 2019).

Otro ejemplo de raza productora de leche es la raza Assaf. En el 2005 pusieron en marcha el programa nacional de mejora genética de esta raza, donde el índice usado para el criterio de selección contiene tres caracteres: el porcentaje de grasa, el porcentaje de proteína y la producción de leche (ASSAFE, 2011), sin embargo, ellos resumen estos tres caracteres en dos que son: producción de grasa y producción de proteínas, donde a cada uno le asignan el mismo peso de 0.5 (comunicación personal de Luis Fernando de la Fuente). Sin embargo, para esta raza se tiene previsto considerar otro índice de selección relacionado a la producción de queso, ya que casi el total de la producción de leche de esta raza es destinado a esta industria (ASSAFE, 2019). Otros criterios de selección relacionados con la resistencia a las encefalopatías espongiformes transmisibles en ovino son tenidos en cuenta, que incluyen planes de

erradicación de genotipos sensibles al Scrapie. Por otro lado, la raza Churra como alta productora de leche, las acciones de su programa de mejora genética se basan principalmente en la producción de leche y lechazo. El objetivo primario del programa de mejora de esta raza se basa en la producción de leche y queso y como objetivos secundarios se utilizan caracteres de producción de proteínas, prolificidad, morfología mamaria y corporal. La valoración genética global tanto para hembras como machos está basada en un índice que pondera los cinco caracteres anteriormente descritos de la siguiente forma: 60% para la cantidad de leche, 20% para la concentración de proteína, 5% para el número de nacidos vivos, 10% para la morfología mamaria y 5% para la morfología corporal (ANCHE, 2019a, 2019b).

En general, todos los programas de mejora genética en ovino realizan sus evaluaciones genéticas usando el método BLUP (*Best Linear Unbiased Predictor*) (Henderson, 1982, 1984, 1975, 1973), donde cada programa analiza caracteres en dependencia de la raza. Otro aspecto común entre todos ellos es el uso de marcadores moleculares para la detección de genes referentes a la enfermedad del Scrapie, así como para realizar controles de paternidad.

1.3. Implantación de la Selección Genómica en el Ganado ovino de leche en España.

En España, la mejora genómica todavía no ha sido completamente implementada en el ganado ovino de leche, aunque hay razas que ya la tienen en marcha. Jurado (2017) expuso y habló sobre la situación y problemas principales de la implementación de la selección genómica en el ganado ovino de leche en España. Jurado refirió a que se habían realizado varios estudios preliminares de selección genómica en los candidatos a futuros sementales. Por ejemplo, en la raza Assaf, se ha estudiado que en caracteres de producción de leche que, en un plazo de 30

años con la selección clásica mejorarían en unos 110 o 120 litros, se podrían mejorar unos 140 litros en el mismo plazo de tiempo aplicando mejora genómica (Jurado, 2017). En el año 2015, las razas Assaf, Churra y Lacaune participaron en un programa subvencionado por MAPAMA, donde el objetivo principal era la implementación de la selección genómica en el ganado ovino de leche como herramienta de mejora genética. El primer paso para el cumplimiento del objetivo era crear una población de referencia (animales fenotipados y genotipados). La raza Assaf a finales del 2017 logró tener unos 1,500 animales genotipados compuesta por hembras, machos de inseminación artificial (IA) y machos de monta natural, todos ellos con un alto nivel de fiabilidad. En la raza Churra se logró genotipar 250 sementales de alto valor genético, con ganancias de hasta el 90% respecto a la valoración clásica. Otras razas siguen en proceso de construcción de una población de referencia, como la Manchega con unos 700 animales genotipados (Jurado, 2017).

Jurado (2017) explicó que el problema de la implementación de la selección genómica en ganado ovino de leche es que el precio del genotipado es alto en relación al precio del animal. La capacidad económica de las razas de ovino, por lo general, no tiene el suficiente soporte para crear una población de referencia inicial y el poder económico de las asociaciones de ovino es menor que el de vacuno. Jurado (2017) alegó que, en el ganado vacuno, específicamente en la raza Holstein, los programas de mejora genética genómica están bien consolidados, ya que tienen grandes poblaciones de referencias, debido a que el precio del genotipado es bajo en relación al precio de los animales (alrededor de un 5%). A eso se le debe añadir que el número efectivo de la población en Holstein es bajo mientras que en ovino por lo general es grande. Además, la raza Holstein está presente en diversos países, o sea, es una raza internacional, sin embargo, las razas de ovino de leche españolas sólo están presentes en España, por lo que la población de referencia es única y nadie podría colaborar con los programas de mejora genómica de las razas de ovino de leche de España (Jurado, 2017).

Por otro lado, con la implementación de la selección genómica, la introducción de nuevos caracteres de selección en ovino de leche también ha sido una nueva oportunidad para algunas industrias como la industria quesera porque permite evaluar caracteres difíciles de seleccionar por métodos tradicionales (Fernández, 2017). La ventaja de utilizar esta herramienta cuando se plantea aplicarla a caracteres nuevos de selección es que puede ser aplicada solamente a una población de referencia, sin necesidad de recoger un gran número de observaciones en estos nuevos caracteres difíciles de seleccionar (Fernández, 2017).

Tabla 1. Razas, clasificación oficial de la raza, tendencia evolutiva, número de reproductores, número de rebaños y uso productivo de las razas de ovino españolas.

Razas	Clasificación oficial de la raza	Tendencia evolutiva	Nº de reproductores	Nº de rebaños	Usos productivos
Ojinegra de Teruel	RAF	RECESIÓN	20,533	38	C
Manchega	RAF	EXPANSIÓN	184,990	160	L
Churra	RAF	EXPANSIÓN	147,435	124	L
Castellana	RAF	EXPANSIÓN	54,006	79	C, L, La
Carranzana	RAF	RECESIÓN	2,235	20	L
Latxa	RAF	EXPANSIÓN	86,431	213	L, La
Navarra	RAF	RECESIÓN	78,806	97	C
Rasa Aragonesa	RAF	RECESIÓN	374,197	454	C
Segureña	RAF	RECESIÓN	124,106	226	C
Merina	RAF	EXPANSIÓN	136,002	239	C, L, La
Churra Lebrijana	RAPE	EXPANSIÓN	444	8	C, L
Lojeña	RAPE	RECESIÓN	11,606	35	C
Merina Grazalema	RAPE	EXPANSIÓN	5,302	36	L
Ansotana	RAPE	EXPANSIÓN	13,947	13	C
Cartera	RAPE	RECESIÓN	9,379	14	C, La
Merina Montes	RAPE	EXPANSIÓN	4,190	20	C, La
Churra Tensina	RAPE	EXPANSIÓN	12,133	27	C, L, La
Maellana	RAPE	EXPANSIÓN	8,274	14	C
Xisqueta	RAPE	EXPANSIÓN	61,277	84	C, La
Alcarreña	RAPE	RECESIÓN	9,484	14	C
Talaverana	RAPE	EXPANSIÓN	7,932	18	C, L
Manchega Negra	RAPE	EXPANSIÓN	6,155	16	L
Colmenareña	RAPE	EXPANSIÓN	7,740	23	C, L
Ojalada	RAPE	EXPANSIÓN	12,723	15	C
Castellana Negra	RAPE	EXPANSIÓN	23,333	74	C, L, La
Aranesa	RAPE	EXPANSIÓN	3,746	33	C
Ripollesa	RAPE	EXPANSIÓN	36,467	48	C, La

Gallega	RAPE	EXPANSIÓN	4,847	102	C
Menorquina	RAPE	EXPANSIÓN	3,332	70	C
Ibicenca	RAPE	EXPANSIÓN	239	18	C, L
Mallorquina	RAPE	EXPANSIÓN	12,678	75	C, L
Roja Mallorquina	RAPE	EXPANSIÓN	4,029	55	C, L
Canaria de pelo	RAPE	RECESIÓN	2,451	22	C
Palmera	RAPE	RECESIÓN	293	10	C, La
Canaria	RAPE	EXPANSIÓN	9,068	74	C, L, La
Chamarita	RAPE	EXPANSIÓN	27,641	14	C
Rubia del Molar	RAPE	EXPANSIÓN	1,816	8	C, L
Carranzana Negra	RAPE	RECESIÓN	1,006	15	C, L
Sasi Ardi	RAPE	EXPANSIÓN	4,741	52	C
Guirra	RAPE	EXPANSIÓN	5,643	20	C
Montesina	RAPE	EXPANSIÓN	10,494	26	C
Roya Bilbilitana	RAPE	EXPANSIÓN	36,414	64	C
Xalda	RAPE	EXPANSIÓN	5,130	223	C
Merina Negra	RAPE	EXPANSIÓN	8,386	68	C, La
Lacaune	RUE	RECESIÓN	35,333	25	C, L
Assaf	RTP	RECESIÓN	144,969	131	L
Landschaff	RIE	RECESIÓN	67	2	C
Charmoise	RIE	RECESIÓN	49	2	C
Berrichon Du Cher	RIE	RECESIÓN	1,643	12	C
Fleischschaf	RIE	EXPANSIÓN	23,593	51	C
Ile de france	RIE	RECESIÓN	5,479	27	C
Merino Precoz	RIE	RECESIÓN	4,504	21	C
Salz	RSE	EXPANSIÓN	7,000	30	C

RAF: Razas Autóctonas de Fomento. RAPE: Raza Autóctona en Peligro de Extinción. RUE: Raza de la Unión Europea. RTP: Razas de Terceros Países. RIE: Razas Integradas en España. RSE: Razas Sintéticas Españolas. C: Carne. L: Leche. La: Lana. Fuente MAPAMA (2019).

Objetivos.

El principal objetivo que nos planteamos en el presente trabajo es evaluar los beneficios potenciales del uso de la selección genómica en el ganado ovino lechero de Castilla y León y de forma priorizada en la raza Churra.

Para cumplir este objetivo global se plantean abordar los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar los beneficios potenciales del uso de la predicción genómica en el programa de selección de leche de la raza Churra que gestiona la Asociación Nacional de Criadores de la oveja Churra Española. Para ello se utilizarán los recursos de animales genotipados en esta raza, teniendo en cuenta que se dispone de una población de referencia no óptima de tan solo 1,902 animales. Para la consecución de este objetivo se proponen:
 - a) Aplicar diferentes métodos de selección genómica: GBLUP, DGBLUP y ssGBLUP.
 - b) Evaluar las ventajas de implementar los diferentes métodos de selección genómica en diferentes grupos candidatos: (i) grupos de candidatos genotipados, (ii) candidatos no genotipados, pero estrechamente relacionados a los individuos genotipados, y (iii) candidatos no genotipados, pero no tan estrechamente relacionados a individuos genotipados.
 - c) Aplicar validación cruzada para evaluar los errores de predicciones genómicas.
 - d) Validar todos los resultados obtenidos mediante simulación.
2. Cuantificar el impacto de la estrategia de selección de animales como candidatos para formar la población de referencia sobre la respuesta a la selección en el ganado ovino sometido a un proceso de estimación de los valores genéticos mediante ssGBLUP.

3. Estudiar nuevos caracteres que pueden ser utilizados como futuros caracteres candidatos a la selección y que pueden beneficiarse del proceso de selección genómica.
 - a) Analizar la viabilidad de utilizar caracteres de coagulación de la leche y del rendimiento quesero individual en la raza ovina Assaf. Para ello se propone realizar un estudio preliminar de los parámetros genéticos de dichos caracteres y su correlación con los caracteres de producción y calidad de la leche.
 - b) Estudio de la respuesta a la selección de caracteres de coagulación y rendimiento quesero mediante selección indirecta usando como indicadores indirectos o "proxy" caracteres de producción, composición y funcionales de la leche que se miden de forma rutinaria en el control lechero oficial.

Revisión bibliográfica.

1. Introducción a la selección genética.

Los programas de cría y mejora de los animales tienen como objetivo mejorar genéticamente las poblaciones de animales mediante la selección de individuos como futuros reproductores para formar las siguientes generaciones. El proceso de seleccionar consiste en hacer que ciertos animales contribuyan genéticamente a la siguiente generación y otros no. Como resultado de este proceso, caracteres como producción, prolificidad, fertilidad, conformación, entre otros, son mejorados, con el fin de incrementar la productividad económica. Para llevar a cabo este proceso, hay que identificar entre todos a los mejores individuos, que serán aquellos que tengan un óptimo valor genético para los caracteres objeto de selección.

El mérito o valor genético de un animal se estima utilizando diferentes fuentes de información y tendrá una mayor precisión a medida que se va incorporando más información. A priori, el valor genético de un animal puede ser calculado como el promedio de los valores genéticos de los padres (*PA*, de las siglas en inglés *Parent Average*) $\left(PA = \frac{EBV_{mami} + EBV_{papi}}{2} \right)$ y cuando se le adiciona sus propios datos más los de sus relativos (sean productivos, conformación, etc.), entonces su *PA* cambia a su valor genético estimado (*EBV*, de las siglas en inglés *Estimated Breeding Value*) $(EBV = PA + Medidas Propias + Medidas de los relativos)$ (InfoHolstein, 2015). En general, la fiabilidad del EBV aumenta con la información fenotípica conocida del animal, la de sus padres, la de su propia producción, la de sus familiares y la de su descendencia; donde el fenotipo que expresa un individuo es el resultado de su potencial genético y del medio ambiente en el que vive. Con el comienzo de la era de la genómica (finales de los 90 y años 2000) y con el inicio del genotipado de los animales, esta información molecular (DNA) adicionada al valor genético también incrementa la fiabilidad de los EBV, convirtiendo el EBV en EBV genómico (*GEBV*; de las siglas en inglés *Genomic Estimated Breeding Value*). Esto se puede expresar mediante la relación: $GEBV = EBV + DNA$. Por lo

tanto, a medida que los EBV (o GEBV) sean más precisos (debido a la adición de información) y fiables, la precisión de las predicciones genéticas incrementa y por lo tanto el progreso genético incrementará con las generaciones (InfoHolstein, 2015).

En los programas de mejora genética el número de caracteres usados depende de la especie y la raza. A modo de ejemplo, en el ganado bovino, específicamente en la raza Holstein, se utilizan unos 30 caracteres en la evaluación tradicional (Wiggans et al., 2017). Aunque los programas de selección han mejorado las producciones de los animales domésticos, existen nuevos desafíos que requerirán cambios tanto en los caracteres medidos como en la dirección de dichos programas. Hay que tener en cuenta que se ha logrado poca mejora genética en algunos caracteres importantes, ya sea porque son costosos de medir (por ejemplo, los caracteres de coagulación de la leche y la eficiencia en la transformación de alimentos en el ganado vacuno y ovino), o debido a que la variación genética en ellos ha sido ignorada en gran medida (por ejemplo, la fertilidad) o a sus limitaciones como son los caracteres medidos tarde en la vida del animal o limitados al sexo. Además, hay nuevos caracteres que toman importancia en el entorno de un cambio climático global y económico como puede ser la intensidad de las emisiones de metano (emisiones por litro de leche o kilogramo de carne), que están influenciados por un gran número de genes y afectados por factores ambientales. Es probable que caracteres de este tipo se conviertan en parte de los objetivos de selección del ganado vacuno y ovino debido a su impacto sobre el medio ambiente (Hayes et al., 2013; Weller, 2016; Weller et al., 2017).

Todos estos cambios en los programas de mejora genética debidos a la introducción de nuevos caracteres a medir e incorporar en los programas, también han conllevado la evolución de los métodos de selección debido a los cambios en los procedimientos de estimación del valor genético de los individuos. Existen diversos métodos para aplicar la selección, desde métodos muy simples hasta métodos más complejos: selección individual, selección indirecta, selección

familiar, selección intrafamiliar, selección por parientes, entre otros, y dentro de ellos, diferentes estrategias de selección como son: selección fenotípica, selección usando índices, selección aleatoria, selección a través del mérito genético, etc. Con el uso de estos criterios y estrategias de selección y, además, el acceso a diversos tipos de datos, como pedigrí (documentación que indica la información básica del animal y sus ancestros), genotipos y fenotipos (individuales y las de sus parientes), el potencial genético de un animal puede ser estimado a través de modelación matemática/estadística (Mrode, 2014).

2. Introducción a la Selección Genómica.

En esta introducción a la selección genómica (GS), narraremos el surgimiento de la GS como metodología de evaluación genética de forma muy breve. La genética cuantitativa es una rama de la genética de poblaciones y tiene sus bases en el análisis de caracteres cuantitativos, o sea, se ocupa de los fenotipos que varían continuamente y de la genética subyacente de dichos fenotipos. Tiene sus orígenes en las bases de los estudios de los efectos genéticos efectuados por diferentes genetistas-matemáticos en los años 1900, donde finalmente en 1918, Ronald Fisher estableció los primeros desarrollos matemáticos de esta rama de la genética, los cuales se centraron en conciliar la genética mendeliana con las observaciones biométricas de Galton (Turelli, 2016).

Como dijimos en el párrafo anterior, los trabajos iniciales de la genética cuantitativa estuvieron basados, principalmente, en dos estudios sobre la herencia realizados por Gregor Mendel y Francis Galton. Primero, las (redescubiertas) leyes Mendelianas descritas en el artículo de Mendel (1865) sobre caracteres que están determinados por las contribuciones de muchos "factores" discretos heredados de forma independiente, obteniendo una distribución básicamente continua de fenotipos, además de factores ambientales no hereditarios que también

contribuían a ésta continuidad (Barton et al., 2017; Turelli, 2017; Weller, 2016). Y por otro lado, en contraste con una rama independiente del análisis genético estaba Galton (1869), que se concentraba en caracteres que variaban de forma continua (por ejemplo, altura y longitud de las vainas de semillas), donde estos caracteres podían aproximarse a una distribución gaussiana (Barton et al., 2017; Turelli, 2016).

Sin embargo, después del redescubrimiento de las leyes de Mendel, en 1902, Bateson y Saunders acumularon una serie de datos y conjeturaron que la herencia poligénica de Mendel podría explicar la variación continua (Turelli, 2016). Johanssen (1903) demostró que el efecto ambiental era la mayor fuente de variación en caracteres cuantitativos en vez de causas genéticas, sin embargo Yule (1906) sugirió que la variación continua pudiera ser explicada por los pequeños efectos de muchos genes Mendelianos. Payne (1918) en un estudio en *Drosophila*, demostró que el cromosoma X estaba afectado por múltiples factores, entre estos factores estaba el incremento de las frecuencias de genes favorecidos, observando así genotipos extremos. Finalmente, Fisher (1918) tras importantes contribuciones de Pearson, demostró que la segregación de estos genes Mendelianos en una población de cruzamiento generaría correlaciones entre los familiares. A partir de 1920, la genética cuantitativa estableció sus bases y en general, podemos definir que ésta se centra principalmente en estudiar la variación fenotípica de caracteres complejos y vincularlos a su base genética con el objetivo de comprender la arquitectura genética de los fenotipos y la relación entre individuos, además de predecir mejor la respuesta a la selección a corto y largo plazo (Turelli, 2016; Weller, 2016).

2.1. El método BLUP y el modelo animal.

En los programas de mejora genética, los modelos mixtos lineales han sumado una gran importancia a la estimación de los valores genéticos de los individuos basados en sus

observaciones fenotípicas ya que son la base del método BLUP. El índice de selección (Hazel, 1943; Hazel and Lush, 1942) es una herramienta que permite aplicar un peso a cada carácter e incorporar la información fenotípica proveniente de caracteres genéticamente correlacionados. Sin embargo, nuevos métodos matemáticos-estadísticos fueron necesarios, diseñados y usados en la aplicación de la selección genética. Dentro de los métodos matemáticos-estadísticos están los modelos mixtos que dieron origen a uno de los métodos de evaluación genética animal tradicional más usados para la estimación de los valores genéticos, el método BLUP, el cual usa la información fenotípica y pedigrí (Henderson, 1975, 1973). Sin embargo, mucho antes las ecuaciones del modelo mixto fueron publicadas por Henderson (1949, 1950) en dos resúmenes, y en 1959 fueron publicadas sus demostraciones en Henderson et al. (1959). Además, Goldberger (1962) fue el primero en usar la terminología “*best linear unbiased predictor*”, Henderson (1963) describió formalmente el BLUP como una forma de índice de selección y finalmente las siglas BLUP fueron acuñadas por Henderson (1973) (Morota, 2015). También el BLUP para modelos de efectos aleatorios fue conocido como índice de selección por Smith (1936) y Hazel (1943); además Lush (1936) refirió a este hecho como “*most probable producing ability*” (Robinson, 1991).

El método BLUP está basado en el modelo mixto, o sea, es un modelo lineal que contiene tanto efectos fijos como efectos aleatorios; además, mejora la predicción proporcionada por los índices de selección gracias a la predicción conjunta de los valores genéticos y la estimación de efectos sistemáticos, como el sexo, la edad al parto, los grupos contemporáneos, etc. (Henderson, 1973; Werf, 2003).

Al mismo tiempo el modelo mixto es un modelo animal porque se ajusta un valor genético (efectos aleatorios) para cada animal. La importancia de estos modelos es que se utilizan diferentes fuentes de información para la predicción de los valores genéticos, además que es de particular utilidad para diseños no balanceados, donde el BLUP toma ventajas (Lynch and

Walsh, 1998; Walsh and Lynch, 2018; Werf, 2003). Además, el método BLUP toma en cuenta los efectos de la deriva, la selección y el apareamiento selectivo (Kennedy and Sorenson, 1988).

En el modelo animal, el requerimiento crítico es que hay una distribución conocida para los valores genéticos de los animales, o sea, el valor genético de cada individuo se define en términos de efectos y de covarianzas entre los valores genéticos de diferentes individuos. Estas covarianzas están expresadas en una matriz A (matriz de relación genética aditiva o “*numerator relationship matrix*”) y pueden ser obtenidas en términos de dos coeficientes: primero, el coeficiente de relaciones de Wright (Wright, 1922), o sea, la covarianza de la unión de gametos formadas por las relaciones aditivas, que no es más que una medida de las proporción de genes que son IBD (*identical by descent*); y segundo, como dos veces el coeficiente de parentesco definido en las relaciones basadas en probabilidades de genes individuales siendo IBD (Malécot, 1948). Sin embargo, Henderson (1976) propuso una forma de obtener la matriz A, basados en un conjunto de reglas según las relaciones en el pedigrí y que permiten construir la inversa de A de una forma más sencilla y al mismo tiempo proporcionando una solución más simple para las ecuaciones del modelo mixto. Luego, Quaas (1976) generalizó estas reglas, para altos valores de endogamia y pedigrí con un gran número de generaciones.

Se han planteado muchas extensiones y variaciones del modelo animal. Entre ellas se encuentra la extensión del modelo animal a múltiples caracteres (correlacionados). Además, como variaciones tenemos aquellos modelos que involucran múltiples efectos aleatorios, como los casos de medidas repetidas del mismo carácter (modelo de repetibilidad), caracteres con efectos maternos, efecto paternal y el modelo animal reducido, entre otros. Cabe notar que muchos de estos modelos se tornan complejos debido a la cantidad de información (observaciones registradas) y por ende una mayor carga computacional es requerida. Sin embargo, diversos métodos para resolver dicho problema se han planteado, como aquellos basados en iteraciones por ejemplo Jacobi o Gauss-Seidel, entre otros. (Miształ and Gianola, 1988).

2.2. Selección Asistida por Marcadores.

La selección fenotípica como estrategia de selección, intuitivamente ha sido llevada a cabo por los ganaderos durante miles de años y con buenos resultados, sin embargo, hace un poco menos de 60 años aproximadamente, el concepto de selección asistida por marcadores (MAS) fue sugerido inicialmente por Neimann-Sorensen and Robertson (1961), Smith (1967), Soller (1978), Stuber et al. (1982), Soller and Beckmann (1983), Smith and Simpson (1986), Schumm et al. (1988), entre otros, donde proponían el uso de marcadores moleculares con el propósito de aplicar selección indirecta e identificando al mismo tiempo marcadores genéticos asociados a caracteres de interés, lo cual incrementaría la ganancia genética dramáticamente. Obviamente para aplicar MAS se necesita que hayan genes que afecten al carácter con un notable efecto y que estos estén en desequilibrio de ligamiento (LD) con los marcadores (Ben-Ari and Lavi, 2012).

Conceptualmente MAS se puede definir como un proceso de selección indirecta basado en el uso de marcadores moleculares, donde la ganancia genética dependerá de la cantidad de variación genética explicada por los marcadores (Ben-Ari and Lavi, 2012). Estos métodos de MAS propuestos inicialmente, no siempre eran aplicables a la mejora genética animal debido a la naturaleza de los datos, ya que estos pueden estar afectados por factores no genéticos o ambientales (edad, sistema de manejo, estación, sexo, rebaño, año de nacimiento, tipo de nacimiento, etc.), además que muchas de las poblaciones de animales no siguen los supuestos básicos de Hardy-Weinberg, o sea, presencia de mutaciones, apareamiento no aleatorio, flujo de genes, tamaño de población finito o deriva genética y selección, que pueden contribuir a la complejidad de los datos (Fernando and Grossman, 1989). De ahí que, Fernando and Grossman (1989) plantearan una metodología donde integraban marcadores moleculares de tipo microsatélites en el método BLUP para la evaluación genética de animales, que luego fue

extendido por Goddard (1992) (Mrode, 2014). Sin embargo, la mayoría de la variabilidad genética del DNA se basa en otro tipo de marcadores. Estos marcadores son los llamados SNPs de las siglas en inglés “*Single Nucleotide Polymorphisms*”. Estos marcadores están ampliamente distribuidos a lo largo de todo el genoma, son aceptablemente polimórficos y se pueden localizar en intrones, exones, promotores, potenciadores y regiones intergénicas (Deng et al., 2017).

2.3. Selección Genómica.

Con la introducción de los marcadores moleculares SNP dentro de los modelos de estimación de los valores genéticos de los animales, surge una nueva metodología: la Selección Genómica, donde los valores genéticos estimados a través de ella son llamados valores genéticos genómicos o GEBV. La GS surge de diferentes métodos planteados por Meuwissen et al. (2001) (Blasco and Toro, 2014), donde demostraron que las precisiones de las predicciones genéticas y el progreso genético incrementaban con la introducción de la información molecular dentro del modelo BLUP y métodos de estimación Bayesiana (BayesA y BayesB). La premisa para la introducción de estos marcadores fue que los SNPs están ampliamente distribuidos a lo largo del genoma y, por lo tanto, métodos como el BLUP y los Bayesianos podían usarse para calcular los efectos de los SNPs y por ende los EBV. Además, debido a la utilización de un número elevado de marcadores que balizan el conjunto del genoma, algunos de los SNPs estuviesen localizados cerca de los loci de caracteres cuantitativos (QTL) de interés, donde debido al LD entre ellos, ambos (SNPs y QTLs) deberían ser heredados conjuntamente. Por lo tanto, basados en esta idea, todos los QTLs podían estar en LD con alguno de los SNPs, y si se asumía una cantidad suficiente de marcadores que cubriesen todo el genoma, como consecuencia los efectos aditivos de los QTLs podían ser capturados por los SNPs sin necesidad de localizar los

QTLs. Algunas de sus conclusiones fueron (i) el uso de SNPs puede ayudar a aumentar la ganancia genética y reducir el intervalo generacional (ii) la GS sería una gran herramienta para caracteres de baja heredabilidad y (iii) los animales podrían seleccionarse a edades tempranas porque no sería necesario tener medida fenotípica de los candidatos para su evaluación.

De una manera más formal, podemos decir que la GS es una forma de selección asistida por marcadores en la que se utilizan marcadores genéticos que cubren todo el genoma, de modo que todos los QTL están en LD con al menos un marcador (Goddard and Hayes, 2007). Las mayores ventajas de esta nueva herramienta son, el aumento de la precisión (precisión de la predicción genómica) de la selección con respecto a los métodos tradicionales, aumento de la intensidad de la selección, mantiene los niveles de variación genética y disminuye el intervalo generacional. Una desventaja es que si la GS es practicada durante muchas generaciones se pierde el LD entre los QTL y los marcadores debido a la recombinación y la respuesta a la selección declinará más rápidamente que la respuesta a la selección debido a la selección fenotípica, a menos que nuevos marcadores sean adicionados a la predicción de los valores genómicos o se siga recalibrando el efecto de los marcadores en la población actual (Goddard, 2009).

2.4. Métodos de Selección Genómica.

Los métodos de selección genómica están basados en un proceso de dos pasos, la estimación de los efectos asociados a los marcadores en una población de referencia (fenotipada y genotipada) y a su vez ésta información es usada para predecir los valores genéticos de los candidatos a la selección en un grupo de validación que ha sido sólo genotipada (Blasco and Toro, 2014). Se han utilizado tanto modelos paramétricos como no-paramétricos incorporando la información genómica a la fenotípica y de pedigrí y aplicándolos a la GS. Dentro de los

métodos paramétricos algunos de los más descritos son: regresión de mínimos cuadrados, regresión Ridge o Regularización de Tikhonov, regresión Ridge Bayesiano, BLUP, Genomic BLUP (GBLUP), single-step GBLUP (ssGBLUP), Least Absolute Shrinkage and Selection Operator (LASSO), LASSO Bayesiano, Alfabeto Bayesiano (Bayes A, Bayes B, Bayes C, Bayes $C\pi$, Bayes $D\pi$...), etc. Algunos de los métodos no-paramétricos que han sido usados en la GS podemos decir que son: Estimador Nadaraya-Watson, regresión Reproducing kernel Hilbert space, Support vector machine, Redes Neuronales, etc. (González-Recio et al., 2008; Howard et al., 2014). Los métodos paramétricos han sido los más descritos en la literatura para el uso de la GS, mientras que la aplicación de los métodos no-paramétricos ha sido más limitada (Gianola et al., 2010) debido a que la interpretación de sus coeficientes y potencial aplicación en selección no es obvia. Los métodos paramétricos pueden ser clasificados en dos grupos: métodos de regularización gaussiana y no gaussiana.

Como explicamos anteriormente, diversos métodos de regularización gaussiana han sido descritos en la literatura. Por lo general, éstos ajustan los efectos de los SNPs como efectos aleatorios, donde asumen que la distribución de dichos efectos es gaussiana y, además, todos los SNPs tienen una distribución gaussiana común, o sea, la misma varianza genética para todos los SNPs (Habier et al., 2011; Meuwissen et al., 2001; Mrode, 2014; VanRaden, 2008). Tres modelos que asumen estos supuestos y que son los más descritos en la literatura son (i) SNP-BLUP, el cual es un modelo que ajusta los efectos individuales de los SNPs simultáneamente (Meuwissen et al., 2001; Mrode, 2014; VanRaden, 2008), (ii) GBLUP es un modelo que estima los valores genéticos directamente, con matriz de varianzas y covarianzas entre los valores genéticos ajustados de la forma $G\sigma_a^2$, donde σ_a^2 es la varianza genética aditiva y G es la matriz de relación genómica, o sea, G representa la proporción del genoma que los animales tienen en común y se estima a partir de los SNP (Garrick, 2007; VanRaden, 2008, 2007) y (iii) ssGBLUP o enfoque de un solo paso, que combina en una sola matriz tanto la información proporcionada

por el pedigrí como la información molecular en un solo paso, lo que da como resultado la predicción directa de EBV para animales no genotipados y GEBV para animales genotipados (Aguilar et al., 2010; Christensen and Lund, 2010; Legarra et al., 2009; Misztal et al., 2009).

Dentro de los métodos de regularización no gaussiana se encuentran los métodos del alfabeto bayesiano. En general estos procedimientos asumen que algunos marcadores están en LD con un QTL y por lo tanto pueden capturar su efecto, sin embargo, el resto no lo están y por ende no capturan ningún efecto. Algunos de los más descritos son: (i) BayesA (Meuwissen et al., 2001) asume a priori que los efectos de SNPs tienen una distribución t-Student y cada SNP tiene su propia varianza genética. (ii) Bayes B (Meuwissen et al., 2001) asume a priori que algunos SNPs tienen efectos con distribución t-Student y otros tienen efectos cero y varianza como en BayesA. (iii) BayesC propuesto por Habier et al. (2011), donde ellos indicaron que la estimación de las varianzas de cada SNP en BayesA y BayesB tenían solo un grado de libertad adicional en comparación con su distribución a priori de la varianza, por lo que la reducción de los efectos de SNP depende en gran medida del parámetro de escala; por lo tanto, para superar esta limitación, propusieron BayesC, que implica estimar una varianza única que es común para todos los SNP, reduciendo así la influencia del parámetro de escala. Sin embargo, BayesC permite que algunos SNP tengan efectos cero con probabilidad π , mientras que los SNP restantes tienen un efecto distinto de cero con probabilidad $(1 - \pi)$, cuya probabilidad proviene de una mixtura de distribuciones multivariadas t-Student. (iv) Bayes $C\pi$ y $D\pi$, descritos por Habier et al. (2011), donde en Bayes $C\pi$ la probabilidad π es tratada como desconocida y es estimada de los datos, mientras Bayes $D\pi$ impone una distribución a priori en el parámetro de escala de la distribución inversa de chi-cuadrado, que es la distribución a priori de la varianza de los efectos de los marcadores. Otros métodos del alfabeto Bayesiano se han utilizado en la GS, todos ellos descritos en Gianola (2013), como son Bayes R, Bayes L o Lasso Bayesiano y todas sus extensiones, etc.

3. Factores que afectan la precisión de las predicciones genómicas.

La precisión de la predicción genómica depende de muchos parámetros. Hay al menos ocho de estos bien descritos: (i) el tamaño efectivo de la población (N_e), (ii) el tamaño de la población de referencia y su estructura genética, (iii) la heredabilidad del carácter (h^2), (iv) el número efectivo de segmentos de cromosomas segregando dentro de la población (M_e), (v) la distribución de los efectos de los QTLs, (vi) la proporción de varianza genética en los QTLs capturada por los marcadores, que a su vez ésta depende del grado de LD entre marcadores y QTLs, (vii) el número de observaciones fenotípicas, así como el tipo de variable respuesta y (viii) el modelo de predicción genómica aplicado (Clark et al., 2012; Daetwyler et al., 2008; Goddard, 2009; Goddard et al., 2011; Hayes et al., 2009c; Hayes and Goddard, 2008; Meuwissen et al., 2013). A continuación, se realiza un somero repaso de cómo afectan los anteriores factores a la precisión de las predicciones de los EBV estimados mediante GS.

3.1. Población de referencia, tamaño y su estructura genética.

Muchos estudios se han basado en la importancia de la población de referencia, su tamaño y estructura genética, y de cómo ésta afecta la precisión de la predicción genómica. La relación entre la población de referencia y la precisión ha sido explorada planteando diversas situaciones, donde se ha visto que el efecto de incrementar el tamaño, incrementa la precisión genómica dependiendo de N_e , h^2 y la estructura genética de la población de referencia. Existen ejemplos realizados mediante simulaciones, y en ganado vacuno, varios estudios han ilustrado esta relación.

El número de observaciones fenotípicas tanto de la población de referencia como de la población bajo estudio, influyen en la precisión de las evaluaciones genómicas. La cantidad de

animales y observaciones fenotípicas en la población de referencia es crucial, ya que éstas son usadas para la estimación de los efectos de los SNPs. A mayor número de individuos, más observaciones de alelos de los SNPs habrá y por lo tanto mayor serán las precisiones. Además, para caracteres de baja heredabilidad, mayor número de observaciones fenotípicas serán necesarias en la población de referencia y más cuando un animal a evaluar no tiene fenotipo (Hayes et al., 2009b).

VanRaden et al. (2009) realizaron un estudio en los toros Holstein, donde demostraron que, al incrementar la población de referencia, incrementaba la precisión en la estima de su valor genético y, de forma, casi lineal para un carácter (mérito neto) con heredabilidad de 0.2. Ellos encontraron ese mismo patrón usando otros caracteres con diferentes heredabilidades. Hayes et al. (2009b) compararon diferentes poblaciones de referencia de toros Holstein-Friesian de cuatro países distintos. En sus resultados observaron que las precisiones fueron mayores en aquellas poblaciones de referencia de mayor tamaño, sin embargo, en un carácter de baja heredabilidad, como es la fertilidad, y con una población de referencia de 332, las precisiones alcanzadas fueron de 0.42 (BLUP) y 0.37 (Bayes A). Demostraron que la precisión de los valores genómicos puede aproximarse a la unidad si se genotipan y fenotipan suficientes animales estrechamente relacionados.

Habier et al. (2007) mostraron cómo las relaciones genéticas entre individuos en la población de referencia afectaron las precisiones de las predicciones genómicas a lo largo de las generaciones. Habier et al. (2010) estudiaron el impacto de las relaciones genéticas aditivas entre las poblaciones de referencia y grupos de validación en una población de Holstein. En un estudio de simulación, Habier et al. (2013) plantearon como un objetivo, estudiar cómo los parámetros de LD, cosegregación y relación genética aditiva contribuyen a las precisiones dependiendo, entre otros parámetros, de la población de referencia. Resultados similares fueron obtenidos por Clark et al. (2012). Ellos compararon los tipos de población de referencia en

dependencia del tipo de relación entre los individuos pertenecientes a estas, o sea, una población de referencia con individuos estrechamente relacionados, una población con parientes lejanos y una tercera con individuos no relacionados. Las precisiones de las predicciones genómicas obtenidas fueron mayores a medida que las relaciones entre individuos era mayor.

Otros estudios sobre la estructura de la población de referencia se han desarrollado basados en la variable sexo en relación a caracteres limitados por el sexo. Algunos autores han estudiado, que en dependencia de la población de referencia donde sólo son hembras, o sólo machos, o compuesta tanto por hembras como machos, las precisiones pueden variar. Calus et al. (2013) evaluaron en promedio las precisiones de las predicciones genómicas usando una población de referencia de vacas, otra de toros y una combinación de ambas. El ranking de las diferentes precisiones obtenidas por los diferentes modelos para los diferentes caracteres tuvo el mismo patrón: las precisiones calculadas usando toros (genotipados y fenotipados) fue menor que la calculada en la población de vacas solamente, y ambas fueron inferiores cuando la población de referencia era una combinación de ambos sexos. Lourenco et al. (2015) realizaron un estudio basado en pollos, donde reflejaba que las precisiones dependen de la estructura de la población de referencia en cuestión. Ellos se plantearon como objetivo analizar una población comercial de pollos y determinar las ganancias en la precisión de las evaluaciones genómicas usando genotipos y fenotipos de machos, o hembras o ambos sexos. Una de las conclusiones del estudio fue que el genotipado de ambos sexos, puede ser una opción adecuada en especies y sistemas de producción para los cuales no solo los machos, sino también las hembras, tienen un alto impacto reproductivo.

Los estudios de las precisiones entre razas en una misma especie también han sido objeto de estudio en las evaluaciones de las predicciones genómicas. Hayes et al. (2009a) analizaron dos poblaciones de referencia en dos razas (Holstein y Jersey), así como dos grupos de validación, uno de cada raza, y para esto investigaron las precisiones genómicas cuando la población de

referencia era de una sola raza o la combinación de ambas razas. Ellos confirmaron que una población de referencia de múltiples razas es una solución potencial para la detección de QTLs y que, en casi todos los caracteres del estudio, las precisiones combinando ambas razas, eran mayores que cuando tenían en cuenta una sola raza como población de referencia. Pryce et al. (2011) realizaron un análisis de sensibilidad utilizando todas las posibles combinaciones de población de referencia de tres razas bovinas, Fleckvieh, Holstein y Jersey, para evaluar la precisión de las predicciones de los valores genómicos. Encontraron ventajas de usar múltiples razas como una sola población de referencia sobre las evaluaciones de una sola raza, aunque estas ganancias fueron pequeñas. Otro trabajo basado en las dos principales razas de cabras francesas (Alpine y Saanen) se llevó a cabo con el objetivo de realizar las evaluaciones genómicas en todos los machos testados de ambas razas (Carillier et al., 2014). Usando el enfoque de un solo paso comparó tres modelos: modelo para una sola raza (usaban una población de referencia de una sola raza), múltiples razas (usaban como una sola población de referencia las dos razas bajo estudio) y por último un modelo de múltiples caracteres (donde se consideraba caracteres correlacionados de ambas razas). Las predicciones fueron similares para los tres modelos, aunque el modelo de mejor precisión fue el de múltiples razas.

3.2. Desequilibrio de ligamiento, densidad de marcadores y relación genética.

Tamaño efectivo de la población y número efectivo de segmentos de cromosomas segregando dentro de la población.

El tamaño efectivo de la población (N_e), determina la extensión de los bloques de LD, la variación genética y la deriva genética en una población, además representa el número mínimo de individuos reproductores en una población idealizada y es un predictor del número de segmentos de cromosomas (M_e) que están representados en una población (Sved, 1971; Tenesa

et al., 2007). Este parámetro tiene una relación estrecha con la cuantificación de la precisión de la predicción genómica. El LD está muy vinculado a la densidad de marcadores y ambos son fuentes que contribuyen a la precisión de la predicción genómica. El LD entre cada par de SNPs depende tanto del N_e , como de la tasa de recombinación entre los SNPs (Daetwyler et al., 2013b; Tenesa et al., 2007). Existen varias definiciones de cómo estimar el LD. Una de ellas es la descrita en Hill and Robertson (1968) donde r^2 es una medida de LD que se calcula como la correlación al cuadrado de las frecuencias alélicas entre pares de loci y $E(r^2)$ es el esperado de r^2 sobre todos los pares de loci. Otha and Kimura (1971) definieron la asociación no aleatoria de genes entre loci, causada por deriva genética de frecuencia aleatoria en poblaciones finitas de la siguiente manera: $E(r^2) = \frac{(5+2N_e c)(1+1/n)}{11+26N_e c+8(N_e c)^2+2/n}$ donde para un n suficientemente grande, el límite de $E(r^2)$ sería aproximadamente: $\frac{5+2N_e c}{11+26N_e c+8(N_e c)^2} = \frac{5+2N_e c}{(4N_e c+11)(2N_e c+1)}$. Otra expresión que cuantifica el LD para marcadores en el mismo autosoma tiene la forma $E(r^2) \approx 1/(\alpha + sN_e c) + \frac{1}{n}$ donde para $\alpha=1$ representa ausencia de mutaciones, para $\alpha=2$ si las mutaciones son tomadas en cuenta, $s=4$ para cromosomas autosomas, $s=2$ para el cromosoma X (Hill, 1975; McVean, 2002; Sved, 1971; Tenesa et al., 2007; Weir and Hill, 1980), n es el tamaño de la muestra y c es la tasa de recombinación entre SNPs.

En Goddard et al. (2011), consideraron el caso donde los QTLs no son regularmente diferentes de los marcadores, asumieron una población homogénea de individuos que no están relacionados, y además independencia entre loci. Desarrollan la relación entre M_e y r^2 donde, teniendo en cuenta la expresión del párrafo previo y tomando $\alpha=2$ e ignorando el término $\frac{1}{n}$, ya que asumen un tamaño de muestra lo suficientemente grande que el término $\frac{1}{n}$ tiende a cero, M_e fue obtenido como: $M_e = (2N_e L N_{chr}) / \log(N_e L)$ y la medida de LD fue expresada como:

$E(r^2) \approx \log \frac{(N_e L)}{2N_e L N_{Chr}} \approx 1/M_e$, donde N_{Chr} es el número de cromosomas y L es la longitud promedio de un cromosoma medido en Morgan.

Como ya hemos venido comentado, las precisiones de las predicciones genómicas dependen de muchos factores, entre ellos la proporción de varianza genética en el QTL capturada por marcadores, que ésta a su vez depende del LD entre marcadores y QTL, de la densidad de marcadores y M_e . Por lo tanto, incrementando la densidad de marcadores para obtener un alto nivel de LD entre marcadores y QTLs es deseable. Habier et al. (2007) en un estudio de simulación plantearon diferentes escenarios en una población simulada, con y sin LD, con el fin de demostrar que los marcadores capturan no solo los efectos de QTL que están en LD con marcadores, sino también las relaciones genéticas aditivas entre animales genotipados. Encontraron que las precisiones de las predicciones genómicas pudieran ser diferentes de cero y positivas incluso cuando no había presencia de LD entre marcadores y QTLs, ya que esta precisión está generada por marcadores que capturan la asociación con QTL (LD) o relación genética aditiva de la población simulada (análisis de ligamiento, LA). Habier et al. (2010) alegaron que estudios en ganado Holstein han ignorado el hecho del impacto de las relaciones genéticas aditivas capturadas por los SNPs en la precisión de los valores genéticos genómicos. Ellos sugieren que este impacto y la precisión de los GEBV debido al LD deben conocerse antes de implementar programas de mejora genética, y más cuando la selección se piensa realizar usando los GEBVs. Como resultado, la precisión de la predicción genómica debido al LD será más persistente entre generaciones que las precisiones resultantes de los EBV tradicionales y por el contrario; la precisión de predicción genómica aportada por marcadores que capturan la relación genética aditiva, pero que están en equilibrio de ligamiento con QTL, decaerá al aumentar la distancia genética entre la población de referencia y la población en estudio. Habier et al. (2013) explican que anteriormente a Habier et al. (2007) y Gianola et al. (2009) se pensaba que el LD era la única fuente de información en las poblaciones de referencia,

y demostraron que los SNPs también capturan las relaciones del pedigrí. Demostraron que la extensión y la cantidad de LD están determinados por la densidad de los SNPs la cual afecta la precisión de los GEBV. Esto puede ser alcanzado si se genotipan chips de SNPs de alta densidad, los suficientes para maximizar la precisión de las predicciones genómicas.

Anteriormente habíamos comentado que N_e determina la cantidad de LD y es un predictor de M_e , por lo que cabe decir que tanto N_e como M_e son parámetros críticos en cuanto a la cuantificación de la precisión de las predicciones genómicas. Varias formas de predicción de M_e han sido planteadas, algunas previamente descritas. Todas ellas diferentes, desde muy simples a más complejas y usando como predictor N_e .

Goddard (2009) definió M_e como $\frac{2N_eL}{\log(4N_eL)}$. Esta fórmula asume pares de gametos en una población de apareamiento aleatorio, donde marcadores y QTLs están en completo LD, y además asume independencia entre loci, y que los efectos de los marcadores tienen una distribución normal. El esperado al cuadrado de la precisión de la predicción genómica planteada para esta definición de M_e en un individuo sin fenotipo es:

$$E(r^2) = 1 - \frac{\lambda}{(2N\sqrt{a})} * \log\left(\frac{a + 2\sqrt{a} + 1}{a - 2\sqrt{a} + 1}\right)$$

$$= 1 - \frac{\lambda}{(2N\sqrt{a})} * \log\left(\frac{(\sqrt{a} + 1)^2}{(\sqrt{a} - 1)^2}\right)$$

Donde $a = 1 + 2\lambda/N$, N es el tamaño de la población de referencia, $\lambda = \sigma_e^2/\sigma_u^2$, $\sigma_u^2 = h^2/(vM_e)$ es la varianza genética del locus, σ_e^2 es la varianza residual, h^2 es la heredabilidad del carácter y $v = 1/\log(2N_e)$. Como se asumió apareamiento aleatorio, se esperaría que N_e sea grande y por ende M_e también lo será, esto conllevaría a que cada marcador explicaría una pequeña cantidad de la varianza genética, por lo tanto σ_u^2 será pequeña y λ grande, implicando que la precisión sería baja, sin embargo, si N es lo suficientemente grande ($N \gg \lambda$), $E(r^2)$

tendería a 1. Esto indica que, si la precisión de los EBV obtenida a partir de los marcadores es mayor que la obtenida en el pedigrí, el número efectivo de segmentos segregando son significativos debido al ligamiento. El inconveniente de usar esta definición de M_e es que sobreestima la precisión de las predicciones genómicas debido a que se subestima M_e . Por lo tanto, aunque se asuma apareamiento aleatorio, podemos concluir que cuando N_e es pequeño, se espera tener mayor precisión que para un N_e mayor (Hayes et al., 2009c).

Continuando con otras definiciones descritas en la literatura, Hayes et al. (2009c) y Clark et al. (2012) encontraron en sus resultados de simulaciones, que una aproximación de $M_e = 2N_eL$ era más consistente en sus estudios, obteniendo que las precisiones de las predicciones genómicas eran más apropiadas. Hayes et al. (2009c) reflejaron la siguiente relación de la que hemos venido hablando, a mayor N_e , mayor M_e , por lo tanto, el grado de LD será menor, implicando que, mayor número de SNPs serán necesarios para capturar los efectos de los QTLs, así como, mayor número de observaciones fenotípicas serán requeridas para la estimación de los valores genéticos genómicos de animales no fenotipados, por ejemplo, animales jóvenes, y más cuando la heredabilidad del carácter en el estudio es baja.

Por su parte, Meuwissen et al. (2013) utilizaron una nueva definición derivada de Goddard (2009) el cual plantea que $M_e = \frac{2N_eLN_{chr}}{\log(2N_e)}$, donde M_e es directamente proporcional al producto del tamaño del genoma (LN_{chr}). Ellos no ignoran el hecho de que toda la varianza genética no puede ser explicada por marcadores debido a la baja densidad de marcadores, y por lo tanto consideran que una parte del EBV de un animal está explicado por los marcadores (u) y otra no (a), donde la proporción de varianza explicada por lo marcadores se expresa como: $\beta = \sigma_u^2 / (\sigma_u^2 + \sigma_a^2)$. La precisión de las predicciones genómicas se puede predecir a través de la

fórmula: $r = \sqrt{\frac{\theta\beta}{\theta+1-h^2r^2}}$, donde $\theta = \frac{TS h^2\beta}{M_e}$ y TS es el número de animales en la población de

referencia. Esta precisión incrementará con la información proveniente de la población de referencia ($TS h^2$) y disminuirá a medida que aumenta el número de segmentos M_e .

Las anteriores definiciones de las precisiones de las predicciones genómicas son derivadas utilizando M_e , pero éste a su vez no considera la correlación entre la relación de los cromosomas, sobreestimando así a M_e y sub- o sobreestimando las precisiones. Lee et al. (2017a; b) plantearon dos fórmulas nuevas de cómo calcular M_e no sólo en función de N_e y L , sino también, teniendo en cuenta mutaciones y la correlación entre SNPs. Con estas asunciones,

expresaron M_e como: $\frac{4N_e^2L^2}{[\ln(2N_eL+1)+2N_eL(\ln(2N_eL+1)-1)]}$ y si además tenían en cuenta la correlación entre cromosomas, esta sería: $\frac{N_{chr}}{[\ln(4N_eL+1)+4N_eL(\ln(4N_eL+1)-1)]} / \left[\frac{N_{chr}}{[(8N_e^2L^2)+(1/3N_e)(N_{chr}-1)]} \right]$, donde

N_{chr} es el número de cromosomas, y cuando son consideradas mutaciones históricas tendríamos: $\frac{N_{chr}}{[\ln(2N_eL+1)+2N_eL(\ln(2N_eL+1)-1)]} / \left[\frac{N_{chr}}{[(4N_e^2L^2)+(1/3N_e)(N_{chr}-1)]} \right]$. Por lo tanto, la precisión de

la predicción genómica para estas definiciones puede ser expresada como: $\sqrt{\frac{h^2}{h^2+(M_e/N)}}$, donde

N es el número de observaciones fenotípicas y h^2 es la heredabilidad del carácter. Como se puede apreciar para un N suficientemente grande la precisión tenderá a 1 y lo contrario si M_e es grande.

3.3. Heredabilidad del carácter.

La heredabilidad de un carácter, es también un factor muy relacionado a la precisión cuando se realizan evaluaciones genómicas, como se ha visto y descrito en la sección anterior. Diversos estudios basados en simulaciones han estudiado cómo la variación de este parámetro afecta a las precisiones de los EBV. Legarra et al. (2008) en un estudio de GS en ratones, obtuvieron

las mayores ganancias genéticas usando la información molecular para caracteres de baja heredabilidad, indicando que la selección genómica sería una buena herramienta para aplicar selección en caracteres pocos heredables. Por otro lado, Hayes et al. (2009c), ilustraron el efecto de variar el número de observaciones fenotípicas, heredabilidad y precisión. Ellos reflejaron que, un número alto de registros fenotípicos sería necesario para predecir los valores genómicos de un individuo no fenotipado con cualquier precisión, particularmente si la heredabilidad es baja.

3.3.1 La heredabilidad perdida.

Para un carácter cuantitativo en una población determinada, la heredabilidad se define como una proporción de varianzas, específicamente como la proporción de varianza total que es atribuible a la variación de los valores genéticos aditivos (heredabilidad en el sentido estricto, h^2) o a la variación de los valores genéticos totales (heredabilidad en el sentido amplio, H^2) (Visscher et al., 2008). La proporción de varianza genética aditiva puede ser calculada a través del pedigrí o usando chips de SNPs. En general, los valores obtenidos con el pedigrí son mayores que cuando se utiliza la información molecular, de forma que los valores genómicos suelen ser entre un tercio y dos tercios inferiores a los obtenidos mediante el pedigrí (Visscher et al., 2012). Esta diferencia en el parámetro h^2 es lo que conocemos como heredabilidad perdida o “*missing heritability*”. Cuando se utiliza el pedigrí, la varianza genética aditiva se puede descomponer en dos partes, la varianza entre familias que mide la diferencia entre las medias de los valores genéticos de las familias y la varianza intrafamiliar debido a la segregación que mide la variación dentro de cada familia (Walsh and Lynch, 2018), sin embargo, por lo general esta varianza tiende a estar sesgada. La proporción de varianza explicada por los marcadores es casi improbable que capture toda la variación genética del

genoma, ya sea porque el chip de SNP no lo cubre completamente o porque el LD entre QTLs y marcadores no es perfecto (Garrick et al., 2009), o sea, la densidad de marcadores no es suficiente para que todos los QTLs se encuentren en LD con al menos un SNP.

Por ejemplo, los SNPs con alta heterocigosidad son seleccionados preferiblemente para confeccionar los chips, o sea, seleccionar SNPs con alta MAF (de las siglas en inglés *Minor Allele Frequency*), mayor que el 5% por ejemplo, donde este suceso es llamado sesgo muestral o efecto de selección (en inglés “*ascertainment bias*” o “*sampling bias*”) (Daetwyler et al., 2010b), que consiste en obtener resultados sesgados debido a factores que no se tuvieron en cuenta. En este caso, el control de calidad estricto que se practica muchas veces para los conjuntos de datos genómicos, provoca que alelos de baja frecuencia y que contribuyen a la varianza genética en caracteres cuantitativos no estén incluidos (ejemplo: la esquizofrenia, (Visscher, 2018)).

Sin embargo, un control de calidad debe realizarse siempre para eliminar los SNPs no informativos, además se debe implementar cuidadosamente un manejo de los SNPs informativos en los chips de marcadores con el fin de maximizar las predicciones genómicas. O sea, tener en cuenta aquellos SNPs que están en consistente LD con los QTLs influenciando un carácter de interés. Se considera que un SNP debe ser excluido del análisis si no cumple con diferentes medidas de control de calidad, entre las más descritas están: errores de parentesco, baja tasa de genotipado, redundancias entre SNPs (colinealidad entre SNPs), mínima frecuencia alélica (ejemplo, $MAF < 0.05$), equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE, ejemplo, $p\text{-valor} < 0.00001$), heterocigosidad con una desviación de ± 3 desviación estándar respecto a la media, SNPs que no tuvieran localización en el genoma, entre otros. Es importante eliminar estos SNPs que no cumplen el control de calidad debido a que sus inclusiones en el análisis de GS pueden alterar los resultados. Por ejemplo, la colinealidad entre SNPs, implicaría alta correlación entre ellos, y si a un QTL se le atribuye un número de SNPs altamente

correlacionados, implicaría una reducción de la precisión de la predicción genómica y su persistencia a través de generaciones.

Wiggans et al. (2010) describieron el procedimiento de selección de SNPs para el cálculo de las evaluaciones genómicas. Ellos usaron genotipos de diferentes razas de vacas (Holstein, Jersey, y Brown Swiss) y concluyeron que cuando aplicaron el control de calidad a un chip de 50K de SNPs, el 16% de SNPs no eran fiables, 3% fueron redundantes y un 6% tenían $MAF < 0.01$, considerando solamente como SNPs informativos el 75% de los marcadores. En Daetwyler et al. (2010b) sugieren mediante un estudio de simulación que el 40% de los loci pueden tener una $MAF < 0.05$ en presencia de equilibrio mutación-deriva, sin embargo ésta proporción de SNPs de baja frecuencia es generalmente excluida en los controles de calidad debido a dos razones: (i) no tener en cuenta SNPs con alelos raros, o sea, con baja MAF, ya que es difícil detectar si realmente es un SNP o un error de secuenciación y (ii) SNPs con alta MAF supone una mayor facilidad de segregación de los SNPs entre las razas, etc. Esto plantea un inconveniente puesto que la mayoría de los caracteres son altamente poligénicos y muchos están asociados con alelos de baja frecuencia (Visscher, 2018). Bresolin et al. (2019) propusieron medir el impacto del control de calidad, densidad de marcadores y frecuencia alélica en la precisión de las predicciones genómicas. Obtuvieron que (i) los diferentes grupos de SNPs con baja MAF (0.007, 0.008 and 0.009) proporcionaron precisiones de predicción más bajas que los grupos con frecuencia alélicas más altas, (ii) no hubo ningún efecto del control de calidad de los SNPs en las precisiones de las predicciones genómicas y (iii) para todos los caracteres analizados en el estudio, el chip de mayor densidad (700K) no proporcionó mejores precisiones de predicción que el chip de baja densidad (10K). Sin embargo, Wainschtein et al. (2019) observaron en un estudio sobre heredabilidad que para caracteres complejos como son la altura y el índice de masa corporal, la heredabilidad perdida es explicada principalmente por variantes raras, en particular por aquellas que se encuentran en regiones de bajo LD.

En general podemos decir que el origen de la heredabilidad perdida es debido a la varianza genética perdida y ésta última es generada fundamentalmente por dos factores: (i) el chip de SNPs no cubre completamente una proporción del genoma y (ii) el LD entre QTLs y marcadores es imperfecto, además de la elevada variabilidad de las variantes raras (Wainschtein et al., 2019). Sólo como comentario, aunque el chip de densidad de marcadores de mayor uso en la mayoría de los estudios de predicción genómica es el de 50K de SNPs, tanto de Illumina como de Affymetrix (donde los resultados de estos análisis son muy variables ya que depende de la población, raza, tamaño y estructura genética), los chips de alta densidad sería lo más ideal para el estudio de la GS y principalmente incluir marcadores informativos que estén en LD con los QTLs que afecten a caracteres cuantitativos.

3.4. Pedigrí y número de generaciones.

Diversos estudios se han realizado con el objetivo de ver cómo afecta a la precisión de las evaluaciones genéticas el pedigrí y el número de generaciones que abarca. Desafortunadamente, los errores en el pedigrí son muy comunes en los programas de mejora genética. La incorrecta información en el pedigrí afecta a la estimación de los parámetros genéticos y los valores genéticos de los animales dado que los modelos usados para la estimación de éstos, asumen que todas las relaciones genéticas entre animales son correctas. Israel and Weller (2000) simulaban una tasa de error de paternidad en vacas del 10%, provocando una disminución de la ganancia genética y estimación sesgada de los valores genéticos. Ellos concluyeron que esta tasa de error redujo la ganancia genética por año en un 4.3% y la ganancia genética acumulada después de 20 años en un 3.5%, en comparación con la simulación cuando tenían en cuenta un correcto control de paternidad. Los valores genéticos estimados estaban sesgados un 10% debido a paternidades incorrectas. Además, con estos errores de pedigrí había un sesgo con tendencia a

seleccionar toros más jóvenes. Banos et al. (2001) introdujeron un 11% de errores de paternidad en el pedigrí de la población de vacas Holstein que tenían registros en las bases de datos de EEUU. La información incorrecta en el pedigrí afectó los valores genéticos de los animales, y en el caso de los machos, los más afectados fueron aquellos que tenían méritos genéticos muy bajos y muy altos. Sanders et al. (2006) estimaron la proporción de errores por mala asignación de machos en una población de la raza red Angus usando microsatélites, así como su consecuencia en la ganancia genética. Una consecuencia de la presencia de estos errores es la reducción en la respuesta genética respecto a la esperada, debido a la infraestimación de la heredabilidad, ya que la varianza genética aditiva es estimada incorrectamente, y a su vez, causa un decremento en la precisión de la predicción de los valores genéticos. Munoz et al. (2014) realizaron un estudio en una población de Pinos Taeda. Se plantearon demostrar cómo los errores de pedigrí pueden afectar a la GS. Para ello, aplican una corrección en el pedigrí y por último comparan los modelos utilizados, tanto los modelos basados en la información del pedigrí como en la información genómica. Concluyeron que, de 15 caracteres en el estudio, 13 tuvieron un incremento en las precisiones de las predicciones genómicas, indicando que los modelos de GS capturan más eficientemente las asociaciones entre los marcadores y QTLs cuando se utiliza el pedigrí apropiado para estimar los valores genéticos.

El efecto del número de generaciones transcurridas desde la estimación de los efectos de los SNPs también contribuye a la precisión de las predicciones genómicas. En general podemos decir que, si una población de referencia no se actualiza, la precisión de las predicciones genómicas disminuirá al pasar las generaciones, indicando que existe la necesidad de actualizar dicha población de referencia y reestimar los efectos de los marcadores (Meuwissen et al., 2001). Meuwissen and Goddard (2010) simularon una población para obtener las precisiones de las predicciones genómicas usando datos de secuenciación del genoma completo. Después de 10,000 generaciones simularon 20 generaciones más, donde encontraron que los efectos de

los SNP pueden estimarse en una generación y utilizarse diez generaciones más tarde sin pérdida de precisión. Wolc et al. (2011) se plantearon evaluar la precisión sobre cinco generaciones en datos reales de pollos comerciales usando información proveniente del pedigrí y marcadores moleculares. Demostraron que las predicciones de las evaluaciones genómicas debidas al LD perseveraron durante las cinco generaciones siguientes. Weng et al. (2016) examinaron el hecho de ir incluyendo generaciones en la población de referencia de pollos comerciales y determinar el número óptimo de generaciones para maximizar las precisiones de las predicciones genómicas para diferentes caracteres de interés económico. Concluyeron que incluir generaciones afecta a las precisiones en función del carácter y de la heredabilidad de éste.

3.5. Métodos aplicados a la selección genómica y variables respuestas.

Se conoce que el método a elegir para aplicar la GS es un factor muy importante en la estimación de los valores genéticos. Estos métodos dependen de la población de interés, así como de la distribución de los efectos de los QTLs para el carácter en estudio, cuya distribución es desconocida. Aunque en muchos estudios se ha reportado que el hecho de escoger uno u otro método afecta la predicción. Sin embargo, estudios de simulación han demostrado que las precisiones dependen, fundamentalmente, de la arquitectura genética del carácter (de los Campos et al., 2013). La precisión de los valores genéticos genómicos varía en dependencia del método ya que las suposiciones acerca de la distribución de los QTLs varían entre ellos. Desde el inicio de la GS han existido discrepancias y comparaciones entre métodos con el objetivo de encontrar cuál predice mejor.

Daetwyler et al. (2010b) comparan el método lineal GBLUP versus el método no-lineal BayesB usando datos simulados y teniendo en cuenta dos tamaños efectivos de la población (de 200 y

1000), tres grupos con distinto número de individuos en la población de referencia de 200, 1000 y 2000, y un rango de número de QTLs expresados como proporción de M_e . Este estudio reflejó cómo las precisiones variaban en dependencia de los parámetros. Las precisiones del GBLUP variaron en dependencia del N_e y no del número de QTLs, sin embargo, la precisión del Bayes B dependía de ambos parámetros independientemente y de la interacción entre ellos. Para un número de QTLs bajo, el método BayesB obtuvo mejores precisiones que el GBLUP; y cuando el número de QTLs se incrementaba, las diferencias entre las precisiones de ambos métodos fueron pequeñas. Daetwyler et al. (2013b) utilizan una serie de métodos paramétricos, para datos reales y simulados. Dentro de los métodos que usaban información molecular, los métodos bayesianos A, B y C, obtuvieron las precisiones más altas para los diferentes caracteres analizados comparados con otros métodos como Lasso y GBLUP. de los Campos et al. (2013) hacen una revisión de artículos basados en simulaciones, que han usado métodos no-paramétricos y paramétricos, y dentro de este último, métodos basados en penalizaciones y métodos bayesianos, así como las comparaciones entre las diferentes metodologías. Ellos concluyen que dentro de los muchos factores que afectan las precisiones de las predicciones, algunos pueden ser controlados y otros no. Factores como la estructura genética de la población de referencia, la heredabilidad del carácter en estudio y el grado de LD no pueden ser controlados, sin embargo, otros factores como el tamaño, la relación genética y diseño de la población de referencia pueden ser controlados, también la densidad de marcadores y el modelo para la estimación de los valores genéticos. Este último, aparte de que se ha descrito como un factor importante, donde en diversos estudios basados en datos simulados, han encontrado diferencias entre los métodos aplicados, sin embargo, en datos reales estas diferencias no se han podido corroborar. En general, aquellos modelos que tienen tendencia a reducir los efectos de las variables, tienen un mejor comportamiento, en especial, el método GBLUP cuando ha sido usado en datos reales para la mayoría de caracteres que se han estudiado.

Pocos estudios se han basado en estudiar cómo influye el tipo de variable respuesta en las predicciones genómicas. Guo et al. (2010) realizaron una comparación entre dos tipos de variables respuestas, DYD y EBV, en un estudio de simulación. El estudio se basó, fundamentalmente, en ver cómo variaban las predicciones genómicas según la heredabilidad y el número de hijas por toro. La hipótesis principal fue comprobar si una correlación entre PA y GEBV derivado de un modelo usando como variable respuesta EBV podría ser mayor que una correlación entre PA y GEBV usando como variable respuesta DYD. Aplicaron dos modelos no lineales bayesianos y el modelo lineal GBLUP. Ellos demostraron, que usar EBV predice igual o ligeramente mejores precisiones que usando DYD, donde las precisiones dependían de la heredabilidad del carácter, el número de hijas por toro, el número de animales genotipados y el tipo de modelo estadístico aplicado. En los escenarios donde usaron caracteres con la heredabilidad más alta, se observaron pequeñas diferencias en las precisiones, y lo contrario se observó cuando la heredabilidad era baja.

3.5.1. Modelos de evaluaciones genómicas con múltiples caracteres como variables respuesta versus a solo un carácter.

Algunos estudios han investigado el hecho de usar un solo carácter como variable respuesta o varios al mismo tiempo para ver cómo afectan las precisiones de las predicciones. Hoy en día, la mayoría de los estudios se basan en usar modelos de una sola variable respuesta, sin embargo, también se han planteado usar modelos de múltiples caracteres con el fin de optimizar y lograr mayor eficiencia en el sistema de evaluación genómica. Otras ventajas de usar modelos de múltiples caracteres en vez de usar la evaluación genética tradicional de un solo carácter, es que son una herramienta muy útil para caracteres correlacionados, de baja heredabilidad y con pequeño número de observaciones medidas.

Tsuruta et al. (2011) propusieron evaluar un modelo de múltiples caracteres usando el método ssGBLUP para 18 caracteres medidos rutinariamente en la evaluación genética nacional de US Holsteins y compararlo con el mismo método, pero con un carácter como variable respuesta. Ellos concluyeron que el modelo de múltiples caracteres llevó más tiempo computacional comparado con el procedimiento de un carácter, sin embargo, las precisiones fueron superiores, aunque no para todos los caracteres. Calus and Veerkamp (2011) propusieron tres modelos de múltiples caracteres con datos simulados para compararlos con su respectivo modelo de un solo carácter. Estos caracteres tenían pocas observaciones medidas, pero estaban correlacionados genéticamente para tres niveles: 0.25, 0.54 y 0.75. Plantearon dos escenarios con el fin de estudiar la capacidad de los modelos a la hora de predecir los tres posibles casos para un animal, o sea, el animal presentaba fenotipos para ambos caracteres, o en un solo carácter, o sin fenotipos en ambos caracteres. El primer escenario consideró que todos los animales tuvieran fenotipos en las generaciones 1 y 2. En el segundo escenario fue considerado que todos los animales tuvieran fenotipos en ambos caracteres para la generación 1, y en la generación 2 la mitad de ellos no tenían fenotipos para el primer carácter y el resto eran valores perdidos, y viceversa, la otra mitad tenían para el segundo carácter fenotipos y el resto tenían valores perdidos. Y en ambos escenarios, ningún animal tenía fenotipos en ambos caracteres para las generaciones 3 y 4. Los resultados en general dependieron de la correlación genética entre los caracteres. Para los animales con fenotipos, la precisión de la predicción genómica, aumentó hasta 0.03 y 0.14, para las correlaciones genética de 0.25 y 0.75, respectivamente, sin embargo, para los animales jóvenes sin fenotipos, aumentaron hasta 0.10. Otro estudio llevado a cabo sobre la comparación entre el uso de modelos de múltiples caracteres versus a un solo carácter, fue el realizado por Guo et al. (2014). Ellos simularon diferentes escenarios considerando la heredabilidad de dos caracteres genéticamente correlacionados, así como la proporción de valores ausentes para los dos caracteres. Observaron que, cuando no había presencia de valores

ausentes, las precisiones obtenidas con el modelo de múltiples caracteres fueron superiores o iguales, en dependencia del carácter. En el caso de presencia de valores ausentes para uno de los caracteres, el modelo de múltiples caracteres produjo mejores precisiones que el de un solo carácter.

4. Avances en el estudio de la predicción genómica en el ganado ovino.

En la introducción describimos brevemente el estado actual de la GS en el ganado ovino de leche en España. Como habíamos comentado, la implementación de la selección genómica en el ganado ovino ha tomado más tiempo comparado con el ganado vacuno. La situación en ovejas es bastante diferente, ya que para poder establecer la GS exitosamente, es necesario tener en cuenta una serie de condiciones para que el beneficio de la ganancia económica sea factible como, por ejemplo, tener en cuenta el costo de genotipado. Otro factor a tener en cuenta a la hora de la implementación de la GS en ovejas es la cantidad de rebaños de pequeños tamaños que no pueden invertir en la mejora genética (Werf et al., 2014). Por otro lado, el uso de la información molecular nos ha facilitado aplicar una selección más precisa a edades más tempranas y para caracteres que son difíciles de medir, como son la lana, canal, calidad de la carne, resistencia a enfermedades, etc., u otros caracteres medidos tardíamente en la vida del animal como los relacionados con la producción de leche, longevidad, habilidad reproductiva, o costosos de medir como los caracteres de coagulación y rendimiento quesero. Sin embargo, estas ventajas de la GS en el ganado ovino no siempre son aprovechables debido a los problemas específicos de la GS, como son: tamaños pequeños de la población de referencia, bajo LD, grandes N_e , incorrecto manejo y control de los registros genealógicos y fenotípicos y costo-beneficio marginal de los costos históricos de genotipado. Por lo que, el costo del genotipado

en relación con el valor del animal sigue siendo una fuerte barrera económica para la aceptación de la GS en el ganado ovino (Arranz, 2017; Fernández, 2017; Jurado, 2017; Rupp et al., 2016). Un factor clave para la aplicación de la GS es crear una población de referencia óptima, basada en su tamaño y estructura, pero al mismo tiempo teniendo en cuenta que la inversión del genotipado no exceda el beneficio obtenido. Esto se ve reflejado en la mayoría de los estudios de GS en el ganado ovino, donde la mayoría de las poblaciones de referencia tienden a ser pequeñas comparadas con el ganado bovino. Por ejemplo, Auvray et al. (2014) reportó una población de referencia con 13,387 animales de diversas razas de Nueva Zelanda compuesta por Romney (47%≈5.300 ovejas), Coopworth (21.3%), Texel (7.1%), Perendale (6.7%), Primera (6%), East Friesian (2.3%), Composite (2.1%), Highlander (1.7%), Poll Dorset (1.6%), Finnish Landrace (1.3%), entre otras con una frecuencia <1% (total 2.9%). Estudios de múltiples razas Australianas han reportado 8,000 animales entre ellas 4,000 Merinos (Daetwyler et al., 2012a, 2012b, 2010a) y otras más limitadas como es la raza Francesa Lacaune con 4,800 animales (Larroque et al., 2014) y España con 1,902 Churras (Sánchez-Mayor et al., 2018; Sánchez et al., 2011), entre otras.

4.1. Evaluación genómica en ganado ovino y sus beneficios.

En ganado ovino, los países con mayor interés en la aplicación inicial de la GS han sido Australia, Francia, Nueva Zelanda, España, Italia, entre otros. Como ya hemos venido comentando, estudiar los factores que influyen en las predicciones genómicas, es primordial, debido a que el beneficio de la GS influye en el progreso genético ya que éste reduce el intervalo generacional. Anteriormente hemos analizado cómo afectan los factores determinantes de la precisión de las predicciones genómicas en el ganado bovino principalmente y a continuación veremos cómo muchos de estos factores han sido descritos en el ganado ovino.

En ovejas, el tamaño efectivo de las poblaciones varía entre razas y generalmente mayor que el de las razas de vacas. En la población de ovejas australianas, la raza Merino es una de las razas de mayor tamaño efectivo y varía entre sus diferentes variedades. Kijas et al. (2012) recolectaron 74 muestras de diferentes razas de ovino de diferentes continentes: Asia, África, América y Europa. Uno de los objetivos fue evaluar el nivel y gradiente de diversidad genética histórica ligada a las diferentes poblaciones usando la información genómica (chip de 50K) de estas poblaciones. Ellos estimaron el N_e para cada una de ellas, donde el 75% de las razas excedían el N_e de 300. Por ejemplo, en la raza Churra para las últimas 20 generaciones, ellos estimaron un N_e de 600, sin embargo, un estudio posterior sobre esta misma raza y usando el mismo chip de marcadores de 50K de SNPs (García-Gómez et al., 2012b) recalcularon este valor para las últimas cuatro generación y el N_e encontrado fue de 128 animales (como promedio de diferentes tasas de conversión) y más recientemente (Chitneedi et al., 2017) imputaron el mismo panel de SNPs de 50K a alta densidad de 500,000 SNPs, donde obtuvieron para una generación atrás, una estimación de N_e más precisa y más baja, de sólo 83 individuos. Dentro de las razas de ovejas chinas, para las últimas 7 generaciones, los tamaños efectivos de las poblaciones de tres de ellas fueron aproximadamente de 207, 74, y 67 para las razas Sunite, German Mutton Merino, y Dorper, respectivamente (Zhao et al., 2014).

La evaluación genómica en la industria ovina australiana ha sido bien establecida y se han alcanzado ganancias significativas desde su implementación. Daetwyler et al. (2012a) se propusieron determinar si teniendo en cuenta la estructura de la población incrementarían las precisiones genómicas para diferentes razas ovinas separadamente y entre ellas. Demostraron que un alto porcentaje de precisión de las predicciones genómicas (86%) se podían alcanzar con el número de SNPs de un solo cromosoma respecto a la precisión total alcanzada con todos los SNPs de todos los cromosomas, indicando que las precisiones de las predicciones son debido a la estructura de la población, o sea, sólo una pequeña parte de la precisión fue debido

al LD entre marcadores y QTLs. Las ganancias en las precisiones de los GEBV fueron en promedio de 0.05 a 0.10. Otro estudio relacionado con múltiples razas australianas fue el realizado por Daetwyler et al. (2012b), donde estudiaron las precisiones de las predicciones genómicas usando GBLUP y BayesR, y aplicando validación cruzada para caracteres de calidad de carne en diferentes razas de ovejas australianas. Analizaron dos tipos de variables respuestas: fenotipos brutos y fenotipos ajustados. El estudio llevó a cabo diferentes escenarios: (i) analizar las precisiones promedio entre el tipo de variable respuesta para todos los caracteres y razas en conjunto, (ii) analizar las precisiones genómicas promedio entre los caracteres para todas las razas en conjunto y (iii) analizar las diferencias de las precisiones promedio entre cada método y entre las razas para todos los caracteres en conjunto. Los resultados mostraron, de manera global, que la selección genómica para caracteres difíciles de medir es un buen enfoque para incrementar la ganancia genética. Sin embargo, a nivel puntual, cuando compararon las precisiones usando los diferentes tipos de variables respuesta, las precisiones se incrementaron más cuando usaron fenotipos ajustados tanto para el método BLUP como el BayesR, pero no para el método GBLUP. Cuando analizaron las precisiones genómicas promedio para cada carácter sobre las precisiones obtenidas con el BLUP, notaron que para algunos caracteres el incremento fue sustancialmente alto, mientras que para otros caracteres éstas fueron similares y muy cercanos a las precisiones obtenidas con el pedigrí. Cuando analizaron las precisiones promedio de las cuatro razas, Border Leicester (BL), Merino (MER), Polled Dorset (PD) y White Suffolk (WS), obtuvieron que las precisiones de las predicciones genómicas fueron más bajas para BL que para el resto de las razas. Las otras tres razas tuvieron predicciones genómicas similares, aunque MER tenía un mayor tamaño en la población de referencia, pero PD y WS tenían menores N_e . En general, ellos mostraron cómo la ganancia en la precisión estaba bien correlacionada con el tamaño de la población de referencia y la heredabilidad del carácter, sugiriendo que la precisión y la ganancia genética puede incrementar si la población de

referencia incrementa en tamaño. Las diferencias entre las precisiones de ambos métodos pueden ser justificadas a que las precisiones son altamente dependientes de M_e , y según Daetwyler et al. (2010b), ellos proponen una regla de decisión: cuando $N_{QTLs} < M_e$ son más útiles los métodos de variables de selección como el BayesB y en caso contrario escoger métodos como el GBLUP. Aunque la desventaja de esto es que en datos reales N_{QTLs} es desconocido.

Daetwyler et al. (2013a) estudiando un carácter de reproducción (número de corderos destetados), combinaron dos tipos de información: fenotipos corregidos de hembras y de machos. Evaluaron y compararon los métodos GBLUP y BLUP bajo diferentes estrategias de validación cruzada para dos razas de ovejas: Merino y Border Leicester. Ellos observaron que cuando la información fenotípica para los machos era incluida en el análisis, las precisiones incrementaban respecto a si sólo usaban información fenotípica de hembras. Sin embargo, en el BLUP, las precisiones donde los animales de validación fueron escogidos aleatoriamente (0.15 para BL y 0.19 para MER) eran superiores a las precisiones obtenidas dentro de los grupos de familias de los machos (-0.05 para MER y 0.10 para BL). Y cuando aplicaban GBLUP, esto dependió de la raza, la precisión entre familias (0.27) para BL fue superior a la de los subconjuntos de validación escogidos aleatoriamente (0.22) y en el caso contrario para MER (0.24 para aleatorio y 0.12 para entre familias). Ellos declaran que, en trabajos futuros, la heterosis y el tipo de escala aplicada a la matriz G se deberían tener en cuenta cuando se trabaja con múltiples razas, ya que éstas afectan a la consanguineidad específica de la raza y a las frecuencias alélicas y por lo tanto a los componentes de varianza. Además, sugieren que para que los ganaderos puedan aplicar la selección, estos GEBV deberían estar en conjunto con los EBV, o sea, como una combinación lineal entre los dos vectores, GEBV y EBV, y ponderados cada uno por un escalar que es derivado de las propias precisiones de los GEBVs y EBVs (Swan et al., 2012). Otra alternativa es aplicar el método ssGBLUP, aunque este también necesita tener

en cuenta la heredabilidad perdida o la proporción de varianza genética no capturada por los marcadores (Garrick et al., 2009).

Swan et al. (2014) analizaron un rango de caracteres, entre ellos caracteres de carne, reproducción, lana, resistentes a enfermedades, entre otros, donde éstos no son medidos rutinariamente por la industria ya que son difíciles de medir. Ellos se plantearon como objetivo principal estudiar las predicciones genómicas para maximizar las ganancias genéticas y aplicaron en todas las evaluaciones para todos los caracteres de interés en la industria ovina australiana usando el método ssGBLUP. La estructura de la población de referencia estuvo basada en tres líneas: raza Merino, razas maternas y sementales terminales. Ellos concluyeron que las precisiones para todos los caracteres fueron moderadas (0.2-0.5).

Francia es otro país donde la selección genómica se ha llevado a cabo desde los inicios de esta tecnología. La raza francesa Lacaune ha sido una de las más estudiadas. Duchemin et al. (2012) propusieron un estudio basado en datos reales en la raza Lacaune y compararon diversos modelos y métodos para evaluar el beneficio de las predicciones genómicas cuando la variable de análisis fueron las desviaciones de producción de las hijas (DYD) ponderadas por sus contribuciones, en una población de referencia de 2,567 machos genotipados. Ellos calcularon las precisiones genómicas usando 4 métodos (GBLUP, BayesC π , *Partial Least Squares* (PLS) y *Sparse Partial Least Squares* (sPLS)) que incorporan la información molecular versus el método BLUP. El resultado general fue que todos los métodos genómicos tuvieron mejores predicciones comparados con el BLUP. Además, notaron que no hubo una clara ventaja de las precisiones entre los diferentes métodos genómicos para los distintos caracteres.

Baloche et al. (2014) se plantearon extender el estudio realizado por Duchemin et al. (2012) usando los métodos Pseudo-ssGBLUP y ssGBLUP comparado con el Pseudo_BLUP, así como recalcular el LD entre los marcadores y el tamaño efectivo de las razas. Asumieron que $1 cM =$

1 *Mbp*, y recalcularon el LD para dos distancias, $< 1 \text{ cM}$ y $< 0.05 \text{ cM}$, donde los coeficientes de correlación cuadráticos fueron: 0.11 ± 0.16 y 0.13 ± 0.18 , respectively. N_e fue estimado usando marcadores para 50 generaciones atrás con un tamaño efectivo aproximado de 370 animales, y llevando 5 generaciones atrás, éste alcanzó 252, y basado en el pedigrí éste fue de 192 animales. Aplicando la fórmula de Daetwyler et al. (2010a), la precisión promedio de las predicciones genómicas entre todos los caracteres fue de 0.57. Para todos los escenarios de evaluación genómica las ganancias en precisión fueron entre 0.08 y 0.20. Ellos alegaron que las posibles razones a la baja ganancia se deban al bajo nivel de LD, baja precisión de las DYD por la poca información de los animales genotipados, entre otras razones. El LD resultante indica que, para algunas razas, la adición de nuevos genotipos es obligatoria, y el incrementar la densidad de marcadores pudiera beneficiar la precisión de los GEBV.

Legarra et al. (2014a) estudiaron las precisiones genómicas entre seis diferentes razas de ovejas francesas y españolas (Basco-Béarnaise, Manech Tete Noire, Manech Tete Rousse, Latxa Cara Negra Euskadi, Latxa Cara Rubia y Latxa Cara Negra Navarra), así como las similitudes entre ellas. Para ello usaron el método ssGBLUP y como variable respuesta las DYD. Los resultados indican que las precisiones son mejores, en general, en las razas francesas que, en las españolas, quizás debido a que contemplan más los parámetros rutinarios, mejor recogida de datos, mejor control del proceso de IA, entre otros. Por otro lado, las precisiones de las predicciones genómicas fueron superiores a las basadas en el pedigrí, excepto para una raza (Latxa Cara Negra Euskadi) donde fundamentan que la posible causa es debido a que existe un sesgo subyacente en las evaluaciones genéticas de rutina, causando este extraño resultado, ya que esta raza no difiere de las demás razas en cuanto al manejo de la recolecta de los datos, o el pedigrí, genotipos, etc.

Shumbusho et al. (2013, 2016) estudiaron el beneficio de usar la GS en la raza de carne Mouton Ile de France. Ellos mostraron altas ganancias genéticas usando una pequeña población de

referencia de 2,000 animales para caracteres de leche y carne. Además, analizaron la eficiencia económica de sustituir el uso de la información genealógica por la información molecular, ya que en oveja los programas de mejora, aunque obtengan unas ganancias genéticas altas, no resultan eficientes económicamente. En general, los resultados mostraron que en la mayoría de los escenarios de GS que se estudiaron, presentaron ventajas sobre la selección tradicional y con beneficios económicos.

Raoul et al. (2017) hicieron un estudio de simulación basándose en la premisa de que, en la mayoría de los programas de mejora en ovino, construir una población de referencia adecuada para la aplicación de la selección genómica puede ser un problema ya que la información fenotípica no siempre está completa o bien reportada, o hay pocos recursos para el genotipado. Simularon un carácter con heredabilidad de 0.25 y repetibilidad de 0.5. Imputaron un panel de baja densidad ($\leq 1,000$ SNPs) a uno de media densidad ($\sim 45K$) para una población de referencia de hembras. Plantearon 5 escenarios variando dos aspectos: primero, la estructura de la población de referencia, o sea, incluyendo o no genotipos de las hembras, y segundo, los paneles de densidad de marcadores, densidad media o densidad media imputados de baja densidad. Usando genotipos de media densidad, la ganancia genética aumentó un 26% con una población de referencia de sólo machos, y cuando ambos sexos fueron incluidos, la ganancia fue del 56%. Cuando usaron genotipos de media densidad imputados del panel de baja densidad, para la población de referencia de sólo machos la ganancia fue del 22% y 42% cuando ambos sexos fueron incluidos.

En Nueva Zelanda, las razas de mayor estudio son las de carne y lana: Romney, Coopworth, Perendale y Texel, entre otras. El estudio de la GS se ha usado principalmente para la aplicación de la industria y teniendo en cuenta la estructura de las poblaciones de ovejas neozelandesas. Dodds et al. (2014) estudiaron las predicciones de dos métodos, GBLUP y un método de regresión (Regp) para diferentes razas y entre ellas. Los caracteres bajo análisis fueron: las

proporciones predictivas y las proporciones registradas de las razas. Las precisiones obtenidas en ambos métodos, produjeron altas correlaciones, que van desde 0.85 a 0.97, aunque el método GBLUP dio mejores predicciones que el Regp. Además, las predicciones parecen estar sobreestimadas para aquellos animales no vinculados con la población de referencia.

Auvray et al. (2014) usando diferentes tipos de matrices genómicas en una población de referencia de múltiples razas y para diferentes caracteres de interés económico (carne, lana, entre otros), se plantearon desarrollar ecuaciones de predicciones genómicas para el uso por parte de la industria ovina usando marcadores de animales más viejos para predecir los más jóvenes. Las diferentes matrices genómicas fueron ajustadas por raza, re-escaladas, etc. En total, 8 tipos de matrices con diferentes combinaciones fueron testadas. Como conclusión principal, indicaron que utilizar una población de referencia de razas mixtas para todas las combinaciones de caracteres y razas, las predicciones genómicas podrían alcanzar mejores predicciones que cuando éstas son calculadas por razas independientemente. Las ganancias de la precisión de los GEBV fueron estimadas a ser en promedio entre 0.05 y 0.27 (promedio=0.13) por raza. Las ganancias obtenidas de la información molecular fueron, en general, más bajas que las obtenidas en el ganado bovino con respecto al tamaño de la población de referencia, el cual es probablemente debido al bajo LD y N_e .

Lee et al. (2015) estudiaron los parámetros genéticos y precisiones de las predicciones genómicas para dos caracteres: Estabilidad (carácter que se define como la probabilidad de sobrevivir a una cierta edad dado que el animal tuvo la oportunidad de alcanzar dicha edad) y Vida Productiva (carácter que se define como el número total de años productivos). Ambos caracteres tienen baja heredabilidad, son medidos tardíamente y están limitados por el sexo, donde la selección genómica sería una buena herramienta para mejorar estos caracteres. La población de referencia y validación estuvo compuesta entre 3,125 y 4,104 animales de diferentes razas dependiendo del carácter. Los resultados de las precisiones de las predicciones

oscilaron entre 0.26 y 0.44 dependiendo de los tamaños de las muestras usadas como referencia y validación y además de los tamaños efectivos de las razas involucradas.

5. Estudios basados en la raza Churra española.

La mayoría de los estudios en la raza Churra, han estado basados en la detección de QTLs y, en la medida de lo posible en identificar variantes causales de caracteres de producción de leche (García-Gómez et al., 2013; García-Gómez et al., 2012a), resistencia a la mastitis (Gutiérrez-Gil et al., 2018, 2007), resistencia a parásitos gastrointestinales (Atlija et al., 2016a, 2016b, 2015; Chitneedi et al., 2018) y a la identificación de mutaciones responsables de enfermedades hereditarias (Suárez-Vega et al., 2013; Suárez-Vega et al., 2015). Además, se han analizado los parámetros genéticos de los diferentes caracteres de producción de leche, caracteres de rendimiento quesero y factores que afectan a caracteres de composición de la leche (Othmane et al., 2002a, 2002c, 2002b) y morfológicos (Gutiérrez-Gil et al., 2011, 2009), así como el tamaño efectivo, LD y la consanguinidad de la población de ovejas Churras (Chitneedi et al., 2017; García-Gómez et al., 2012b).

Como ya habíamos comentado en la sección anterior, Kijas et al. (2012) en un estudio de simulación usando el chip de 50K de SNPs, estimó el N_e para 50 generaciones atrás en la raza Churra, con alrededor de 600 animales. En un estudio posterior García-Gómez et al. (2012b) reestimaron este parámetro para la última generación usando el mismo chip para 1681 animales, y como promedio de diferentes tasas de conversión encontraron que $N_e = 128$ y basado en la relación $1 \text{ cM} \sim 1 \text{ Mb}$, N_e fue de 159. En un estudio más reciente, Chitneedi et al. (2017) usando la misma población anterior, imputaron el chip de 50K a un chip de alta densidad (600K) y reestimaron el N_e . Ellos encontraron que el estimado para este parámetro fue de 83, más bajo que el estimado basado en el chip de 50K.

En los dos últimos artículos mencionados en el párrafo anterior, describieron patrones similares de los LD estimados en intervalos de 1Mb de SNPs agrupados, para la misma población y usando los chips de alta densidad de 600K y de media densidad de 50K de SNPs. El promedio estimado del LD para marcadores de hasta 10 kb de separación fue de aproximadamente 0.3 en ambos estudios.

Un estudio inicial de la aplicación de selección genómica fue llevado a cabo para la raza Churra. Sánchez et al. (2011) usaron desviaciones de rendimiento y consideraron dos métodos de selección genómica: un primer método similar al descrito en Boichard et al. (2010) y un método de red elástica (*Elastic Net*) basados en dos regularizaciones de penalización L1 (LASSO) y L2 (Ridge Regression). Las ganancias genéticas de los métodos genómicos sobre las evaluaciones usando el pedigrí no siempre fueron positivas. Para tres caracteres, porcentaje de grasa (FP), producción de grasa (FY) y células somáticas (SCS), las precisiones genómicas no fueron mejores que las precisiones obtenidas del pedigrí (0.46 versus 0.43, 0.25 versus 0.17, 0.57 versus 0.51, respectivamente). Mientras que, para los demás caracteres, las ganancias estuvieron en dependencia de los parámetros pasados a los modelos genómicos, pero en general se consideraron superiores a las precisiones obtenidas con el modelo basado en el pedigrí.

Materiales y Métodos.

1. Materiales.

Dos conjuntos de datos pertenecientes a dos razas diferentes de ovejas fueron analizados: Assaf y Churra. El uso de datos procedentes de las ovejas de raza Churra estuvo basado principalmente en el estudio de las predicciones genómicas. El conjunto de datos de raza Assaf consistió en mediciones de nuevos fenotipos que fueron caracterizados para conocer sus parámetros genéticos y se analizó la posible respuesta indirecta que se produce en el actual sistema de mejora de la raza. En cualquier caso, estos resultados preliminares en la raza Assaf fueron realizados para analizar las posibilidades de aplicación de estos nuevos caracteres en el esquema de mejora mediante GS. Debido a que, para cada conjunto de datos, se realizaron diferentes tipos de análisis, es sugerido que en caso de confusión se corrobore en la sección de materiales y métodos de cada manuscrito presentados en la sección de resultados de esta tesis.

1.1. Muestra de animales de la raza Churra.

La oveja Churra es una raza ovina autóctona del noroeste de España, en la región de Castilla y León. Esta raza muestra una doble aptitud basada en la producción de leche y carne y está clasificada como raza autóctona de Fomento en el Catálogo Oficial de razas de ganado ovino de España. El programa de mejora está gestionado por la Asociación Nacional de Criadores de la oveja Churra Española (ANCHE, 2019a). La raza Churra en los años 60 llegó a ser una de las razas de mayor censo en España, con alrededor de 1,600,000 ejemplares censados extendiéndose principalmente por toda la Comunidad autónoma de Castilla y León. El cruzamiento por absorción con las razas selectas para la producción láctea, Assaf y Lacaune, principalmente, ha originado la regresión de los censos; tanto que el censo a día del 31 de

diciembre de 2018 fue de 147,435 animales con un total de 124 explotaciones inscritas en la asociación de criadores (ANCHE, 2019a).

1.1.1. Animales, pedigrí, fenotipos y variables explicativas usadas para el estudio de la raza Churra.

Los caracteres recogidos para el análisis de la raza Churra estuvieron basados en controles diarios y recopilados entre los años 1981 y 2016. Los caracteres fueron: producción de leche (MY, gramos), producción de proteínas (PY, gramos), producción de grasa (FY, gramos), porcentaje de proteína (PP, %), porcentaje de grasa (FP, %) y porcentaje de sólidos totales (TSP, %). Todos los registros diarios tenían un máximo de cuatro controles por lactación. Se realizó un control de calidad de los datos basado principalmente en tres criterios. En primer lugar, se eliminaron los controles con valores atípicos e información faltante sobre las diferentes variables explicativas (edad, nacimiento y rebaño). En segundo lugar, todos los controles incluidos en los análisis cumplieron con los criterios establecidos por el Comité Internacional para el Registro de Animales (ICAR, 2016). En tercer lugar, incluía solamente rebaños conectados por Inseminación Artificial (AI) que tenían un porcentaje superior al 17% de las hijas descendientes de machos de IA para evitar problemas de estimación debido a la falta de conexión y posibles problemas de asignación incorrecta de la paternidad. En la Tabla 2 se muestra el número de registros para cada carácter que se analizó en este estudio, así como algunos parámetros estadísticos descriptivos tanto de la población completa de Churra, como del conjunto de hembras genotipadas que usamos en este estudio que describiremos más adelante. Después de aplicar el control de calidad a cada uno de los seis caracteres, se construyó un pedigrí para cada uno que vinculaba a todos los animales con registro fenotípico disponible para el carácter en cuestión. El número de generaciones aproximadamente fue 21 generaciones.

El número de animales incluidos en el pedigrí para el conjunto de datos de MY fue de 107,523 animales, PP y PY implicó 87,657 animales, FP y FY incluyeron un total de 87,110 animales, y TSP consistió en 84,094 animales.

Tabla 2. Estadística descriptiva de los fenotipos recogidos para los datos analizados de la raza Churra.

Carácter		Estadísticos de los caracteres			
		Registros	N	μ	SD
Producción de leche (g)	Todos	1,410,748	96,357	997.99	560.3
	Genotipados	33,923	1,667	1,108.28	571.4
Producción de proteínas (g)	Todos	595,845	72,387	58.52	29.35
	Genotipados	25,979	1,667	65.47	33.44
Producción de grasa (g)	Todos	561,473	71,626	67.44	35.72
	Genotipados	24,807	1,667	75.25	40.71
Porcentaje de proteínas (%)	Todos	595,845	72,387	5.68	0.84
	Genotipados	25,979	1,667	5.68	0.87
Porcentaje de grasa (%)	Todos	561,473	71,626	6.78	1.87
	Genotipados	24,807	1,667	6.75	1.86
Porcentaje de sólidos totales (%)	Todos	513,441	67,053	18	2.4
	Genotipados	25,937	1,667	17.88	2.56

Registros: números de registros. N: número de animales con registros. μ : media del carácter. SD.: desviación estándar.

Adicionalmente a los seis caracteres de este estudio, se tuvieron en cuenta cinco variables explicativas para incluir en los análisis. Estas variables fueron: rebaño-día-control (FTD), orden de parto (BO), cordero nacidos (CNV), edad a la hora del parto (EDAD) y días en lactación (DIM). Las variables explicativas FTD, BO, CNV y EDAD fueron tratadas como discretas y DIM como continua. La distribución de cada una de las variables explicativas es mostrada en la Tabla 3.

Tabla 3. Distribución de las cinco variables explicativas utilizadas en este estudio.

Carácter		Variables explicativas				
		FTD	BO	CNV	EDAD	DIM ($\mu \pm SD$)
Producción de leche (g)	Todos	9,731	10	2	7	134 \pm 37
	Genotipados	3,029	10	2	7	81.25 \pm 31
Producción de proteínas (g)	Todos	8,939	10	2	7	80 \pm 34.3
	Genotipados	2,828	10	2	7	79.43 \pm 34.2
Producción de grasa (g)	Todos	8,944	10	2	7	81.6 \pm 33.7
	Genotipados	2,796	10	2	7	81.4 \pm 33.7
Porcentaje de proteínas (%)	Todos	8,113	10	2	7	80 \pm 33.8
	Genotipados	2,808	10	2	7	80 \pm 34.1
Porcentaje de grasa (%)	Todos	8,939	10	2	7	80 \pm 34.3
	Genotipados	2,828	10	2	7	79.43 \pm 34.2
Porcentaje de sólidos totales (%)	Todos	8,944	10	2	7	81.6 \pm 33.7
	Genotipados	2796	10	2	7	81.4 \pm 33.7

μ : media del carácter. SD.: desviación estándar. FTD: rebaño-día-control. BO: orden de parto (mínimo 1, máximo 10). CNV: corderos nacidos (1=parto simple, 2=parto múltiple). EDAD: edad a la hora del parto (7 niveles). DIM: días en lactación.

1.1.2. Genotipos usados para la predicción genómica de la raza Churra.

Un total de 1,902 individuos fueron genotipados con Illumina OvineSNP50 BeadChip. Los individuos genotipados pertenecían a dos grupos: un grupo de 1,667 hembras nacidas entre 1999-2008 y un grupo de 235 carneros nacidos entre 1986-2015 (ver Tabla 4). El conjunto de ovejas pertenecían a 16 familias de medio hermanas (García-Gómez et al., 2013) con registros disponibles para todos los caracteres. En el momento de este estudio, entre los 235 carneros, 219 tenían hijas con registros fenotípicos y 16 eran carneros jóvenes sin hijos. Todos los carneros genotipados pertenecían al programa de IA dentro del esquema de selección de ANCHE y todas las ovejas genotipadas se obtuvieron con IA. Es importante notar que los individuos genotipados eran principalmente animales históricos y no pertenecían a la última generación, la mayoría de las ovejas genotipadas (nacidas entre 1999 y 2008) tenían descendientes hembras con sus propios registros, al igual que los machos genotipados.

Se aplicó un control de calidad de los datos genotípicos utilizando el software PLINK (Purcell et al., 2007), donde se aplicaron los siguientes criterios en dos pasos. (i) El control de calidad por individuo excluyó a éstos con más del 10% de genotipos faltantes y (ii) el control de calidad por marcador excluyó aquellos que no pasaron los siguientes filtros: una tasa de genotipado inferior al 95%, MAF inferior a 0.05 y una desviación del HWE con un valor de $p < 0.00001$. Los SNPs en el cromosoma X y con posiciones desconocidas no se incluyeron en los análisis. Después del control de calidad, quedaron disponibles para el análisis 43,909 SNP autosómicos de los 54,241 SNP genotipados originales en el conjunto de datos sin procesar de los 26 cromosomas autosómicos.

Tabla 4. Resumen de la distribución de los animales genotipados con hijos en el pedigrí por año de nacimiento.

Año de nacimiento	machos	hijos
1986-1990	5	3,714
1991-1995	8	2,656
1996-2000	55	9,045
2001-2005	72	12,183
2006-2010	72	7,537
2011-2013	7	694
2013-2015	16	-
total	235	35,829
	hembras	hijos
1999-2005	1,009	1,754
2006-2008	658	1,461
total	1,667	3,215

1.2. Muestra de animales de la raza Assaf.

La oveja Assaf es una raza foránea, integrada en España, que proviene de importaciones de una población originaria de Israel. Procede del cruzamiento entre dos razas distintas de ovejas: hembras de la raza Awassi y machos de la raza Milschschaf. El primer núcleo de ovejas Assaf

fue introducido en España entre los años 1977 y 1980 en la provincia de León. Luego se fue extendiendo y formándose la raza Assaf española en Castilla y León en primer lugar, y en el resto de España posteriormente (De la Fuente et al., 2006). Sin embargo, La Raza Assaf es reconocida en España como raza el 5 de agosto de 2003 (Orden APA/ 2420/2003), donde figura en el catálogo de razas ovinas de España, como raza de terceros países. El número total de rebaños de Assaf bajo el sistema oficial de registro de leche en España es de 131 (MAPAMA, 2019). La mayoría de estos rebaños pertenecen a la Asociación Nacional de Criadores de Assaf (ASSAFE) y están controlados a través del sistema oficial de registro de leche. En los últimos años, la raza Assaf se ha convertido en una de las principales razas de ovejas lecheras (160,565 cabezas), ya que muestra doble aptitud basada en la producción de leche y carne, además las hembras poseen buena precocidad sexual y tienen buena fertilidad y prolificidad con una media de 1.6 crías por parto (ASSAFE, 2019).

En el año 2005 comenzó el programa de mejora genética de la raza Assaf, creándose así ASSAFE. Esta asociación es la responsable de gestionar el libro genealógico de la raza, así como la gestión y coordinación del programa de mejora, también dirigen la estructura de los rebaños, conectándolos por inseminación artificial con machos de referencia ubicados en los diferentes Centros de Selección y Mejora Genética (OVIGEN y CENSYRA ubicados en León y Colmenar Viejo, respectivamente) (ASSAFE, 2011). Además, se realiza el control parental mediante marcadores moleculares y la valoración genética la realiza el Departamento de Mejora Genética Animal del INIA de Madrid. Los controles de producciones son llevados a cabo por diferentes organismos autonómicos, por ejemplo, Unión de Asociaciones Ganaderas en Castilla y León (UAGCYL) (ASSAFE, 2019).

1.1.1. Animales, pedigrí, fenotipos y variables explicativas de la muestra de ovejas de la raza Assaf.

La muestra de Assaf estuvo compuesta por 1,172 hembras Assaf, donde finalmente después del control de calidad (valores atípicos por cada fenotipo y variable explicativa), el tamaño de la muestra resultante fue de 1,143 individuos. Además, se nos facilitó la genealogía de estos animales, con antecesores de hasta 6 generaciones atrás. Finalmente, 11,118 identidades compusieron el pedigrí, donde 629 eran padres y estos a su vez eran hijos de 148 padres y 309 madres, por otro lado, habían 4,824 madres, las cuales eran hijas de 396 machos y 1,803 hembras. Esta muestra fue recogida de tres rebaños pertenecientes a la comunidad de Castilla y León, específicamente en la zona de Zamora. Los tres rebaños fueron escogidos principalmente porque las condiciones de manejo y alimentación eran similares. Cada oveja fue muestreada una vez, entre noviembre de 2016 y febrero de 2017. La distribución de la recogida de las muestras es mostrada en la Tabla 5.

Tabla 5. Distribución de las muestras de leche recogidas y analizadas para el estudio de los parámetros genéticos de la raza Assaf.

Rebaño	Año	Días	N	NA
Rebaño 1	2016	1	97	6
		2	87	8
		3	97	11
	2017	1	80	14
		2	100	14
		3	84	5
Rebaño 2	2016	1	100	10
	2017	1	98	7
Rebaño 3	2016	1	100	5
		2	94	7
	2017	1	100	31
		2	106	29

La mayoría de la producción de leche del ganado ovino se destina a la producción de queso, por lo que el programa de mejora genética de esta raza también podría considerar caracteres referentes a la capacidad de la aptitud quesera de la leche, como nuevos caracteres de selección en ovino de leche. Dentro de los indicadores de producción de queso están las propiedades de coagulación de la leche (MCP) (Bynum and Olson, 1982; Ikonen et al., 1999; McMahon and Brown, 1982) y el rendimiento individual de queso de laboratorio (ILCY) (Othmane et al., 2002c, 2002a). Los MCP más estudiados en la literatura se miden principalmente mediante cinco parámetros: el tiempo de coagulación del cuajo luego de la adición de la enzima en el inicio del proceso de la coagulación (RCT, minutos), el tiempo necesario para que la cuajada alcance una firmeza de 20 milímetros (K_{20} , minutos) y la firmeza de la cuajada en tres momentos dado, a los 30 minutos (A_{30} , milímetros), a los 45 minutos (A_{45} , milímetros) y a los 60 minutos (A_{60} , milímetros). Sólo como breve descripción, estos MCP son obtenidos a través del análisis de una pequeña muestra de leche de 10 mililitros usando el dispositivo mecánico Formagraph (Foss Electric A/S, Hillerød, Dinamarca). Este instrumento grafica las diferentes fases de la coagulación basada en las señales transmitidas por un péndulo de acero inmerso en la muestra de la leche y mezclado con un agente coagulante que contiene la enzima (Bittante et al., 2012; Cipolat-Gotet et al., 2012; McMahon and Brown, 1982; Pazzola, 2019). Más adelante se explicarán detalles del proceso completo llevado a cabo para estas muestras de la raza Assaf.

Los estudios sobre los parámetros genéticos para estos indicadores en ovejas son escasos, y la mayoría de ellos se basan en la oveja Sarda (Bittante et al., 2017; Pazzola et al., 2018; Puledda et al., 2017; Vacca et al., 2015). En la raza española Churra, se estudiaron los parámetros genéticos para el carácter ILCY (Othmane et al., 2002a, 2002c), y en Jaramillo et al. (2008) evaluaron las correlaciones fenotípicas entre los caracteres MCP y ILCY en las razas de ovejas Manchega y Guirra. Bittante et al. (2012) revisaron los diversos estudios basados en los

caracteres MCP. Encontraron que diferentes estudios realizados en ganado bovino para los MCPs, principalmente en RCT y A₃₀, presentaban valores moderados de heredabilidad y una alta correlación genética entre ellos. Sin embargo, pocos estudios han estudiado los fenotipos K₂₀ y A₆₀. El pequeño número de reportes sobre parámetros genéticos de caracteres de coagulación de la leche de diferentes razas ovinas, como las ovejas italianas, Sarda y Alpina, describen valores moderados de heredabilidad para RCT y menores para el carácter A₃₀ en comparación con el ganado bovino (Bittante et al., 2017; Puledda et al., 2017).

Por lo tanto, para este conjunto de datos de Assaf, los caracteres referentes a las propiedades de la coagulación de la leche para cada oveja fueron obtenidos mediante una muestra de 50 ml de leche en el ordeño matutino. Las muestras se mantuvieron refrigeradas durante el transporte desde la granja hasta el laboratorio de la Universidad de Córdoba, donde se analizaron para determinar las propiedades de producción de queso 15 horas después de la recolección. Los caracteres MCP se monitorizaron a 32°C con un viscosímetro Formagraph (Foss Electric) usando extracto de cuajo líquido comercial (1: 15,000; > 70% de quimosina, <30% de pepsina bovina, 185 IMCU/ml) diluida al 4% en agua destilada. Se obtuvieron valores para los siguientes caracteres: RCT (min), tiempo de coagulación del cuajo o el tiempo entre la adición de la encima y el inicio de la coagulación de la leche; K₂₀ (min) referente al tiempo necesario para que la cuajada alcance una firmeza de 20 mm y A₃₀ y A₆₀ (mm), que son la firmeza de la cuajada a los 30 y 60 minutos después de la adición de la enzima. Mientras que, para determinar el rendimiento individual de queso de laboratorio (ILCY, g/10 ml de leche), los geles resultantes se cortaron con una espátula y se centrifugaron durante 30 minutos a 2.800×g a 37°C para separar la cuajada del suero de leche (el suero se desecha). Finalmente, los residuos de la centrifuga (cuajos drenados) se pesaron individualmente para estimar el ILCY. Para estimar el rendimiento de la cuajada seca de laboratorio (ILDCY), las cuencas escurridas se mantuvieron

en el horno (100°C) durante 24 horas y, después de enfriar en un secador, las muestras se pesaron (también expresadas en g/10 ml). Los seis caracteres fueron agrupados en dos grupos, los caracteres dinámicos (RCT, K₂₀, A₃₀ y A₆₀) y los caracteres basados en la cuajada (ILCY y ILDCY), además del pH de la leche.

Por otro lado, como parte del programa de mejora genética, ASSAFE rutinariamente mide registros de diversos caracteres relacionados con la leche, incluyendo caracteres de producción, composición y funcionales para todos los rebaños perteneciente a la asociación. Entre estos caracteres están producción de leche (MY, kilogramos), producción de grasa (FY, kilogramos), producción de proteínas (PY, kilogramos) y producción de lactosa (LY, kilogramos). Entre los caracteres de composición de leche se encuentran porcentaje de proteínas (PP, %), porcentaje de grasa (FP, %) y porcentaje de lactosa (LP, %) y finalmente dentro de los caracteres funcionales están Urea (mg/ml) y conteo de células somáticas (SCC, número de células por ml), este último carácter fue considerado como el logaritmo binario de SCC (LSCC). De ahora en adelante nos referiremos a estos tres grupos de caracteres como caracteres de la leche. Adicionalmente, cuatro variables explicativas fueron recogidas. Tres de ellas tratadas como variables discretas: rebaño-día-control (FTD) con 12 niveles, edad a la hora del parto (Edad) con siete niveles (Nivel 1: animales con edad menor de 13 meses. Nivel 2: animales con edad entre 13 y 18 meses. Nivel 3: animales dentro del rango de edad de 19 y 24 meses. Nivel 4: animales con edad entre 25 y 36 meses. Nivel 5: animales con rango de edad entre 37 y 48 meses. Nivel 6: animales con edad entre 49 y 84 meses. Nivel 7: animales con edad mayor que 84 meses.), y corderos nacidos (NBL) con dos niveles (1=parto simple, 2=parto múltiple). Por último, la variable días en lactación (DIM) analizada como una variable continua.

2. Métodos.

Para la elaboración de esta tesis, diferentes análisis se realizaron para los diferentes conjuntos de datos. Se llevaron a cabo diferentes estudios con datos reales y simulados. Para todos los conjuntos de datos, reales o simulados, se calcularon las componentes de varianzas usando el método de estimación de máxima verosimilitud residual (REML) (Patterson and Thompson, 1971). REML es un método de estimación de las componentes de varianzas y covarianzas en los modelos lineales. Este método toma en cuenta la pérdida de grados de libertad en la estimación de la media y produce ecuaciones de estimación insesgadas para las componentes de varianzas. Para la estimación de las componentes de varianzas usa una distribución libre de la media, esencialmente basada en contraste de errores o residuales, que son derivadas de una función de verosimilitud condicional exacta (Smyth and Verbyla, 1996; Verbyla, 1990). En todos los REML realizados en esta tesis, la versión 4.1 del software ASREML (Gilmour et al., 2014) fue usada, el cual utiliza REML como método de estimación de los parámetros genéticos basado en el desarrollo descrito por Verbyla (1990). Para el conjunto de datos de Churra, tanto datos reales como simulados (basados en los datos reales) fueron usados y diferentes metodologías de GS fueron aplicadas, y para el conjunto de datos de Assaf, solamente análisis de datos reales fueron realizados, todos ellos basados en el cálculo de parámetros genéticos y selección indirecta.

2.1. Análisis con datos reales.

2.1.1. Análisis aplicados a los datos reales de Churra.

Se realizaron análisis REML univariados en los diferentes caracteres (MY, PY, FY, PP, FP y TSP) usados en la raza Churra para calcular sus heredabilidades. El método BLUP (Henderson,

1984, 1975) fue desarrollado (utilizando las heredabilidades estimadas) para calcular los EBV y ajustar los valores fenotípicos corregidos correspondientes (y^*) para todos los efectos ambientales incluidos en el modelo.

Los análisis REML y BLUP se realizaron asumiendo un modelo de repetibilidad para tener en cuenta el efecto ambiental permanente de los individuos, así como sus efectos poligénicos. El modelo completo utilizado en cada uno de los caracteres es:

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xb} + \mathbf{Zu} + \mathbf{Pp} + \mathbf{Ft} + \mathbf{Dd} + \mathbf{e} \quad [1]$$

donde \mathbf{y} es el vector de las observaciones de los controles para el carácter en cuestión; \mathbf{b} es el vector de efectos fijos que incluye la media; \mathbf{u} es el vector de efectos poligénicos aditivos aleatorios para cada animal distribuido $N(\mathbf{0}, \mathbf{A}\sigma_u^2)$, donde \mathbf{A} es la matriz numerador de relaciones aditivas calculada utilizando la información del pedigrí; \mathbf{p} es el vector que contiene los efectos aleatorios ambientales permanentes; \mathbf{t} es el vector de efectos ambientales aleatorios para la variable día-control-rebaño (FTD); \mathbf{d} los efectos aleatorios para los coeficientes de “*spline*” no lineales para los días de lactación; y \mathbf{e} es el vector de efectos residuales independientes e idénticamente distribuidos (i.i.d.). Las matrices \mathbf{X} , \mathbf{Z} , \mathbf{P} , \mathbf{F} y \mathbf{D} son matrices de incidencia que relacionan las observaciones y con sus respectivos efectos. Los efectos fijos incluidos en \mathbf{b} fueron el número de corderos nacidos (CNV), la edad de la fecha de parto (EDAD), los días de lactación después del parto (DIM) y el orden de parto (BO). Todas ellas son variables categóricas, excepto DIM que fue tratada como continua.

Los fenotipos corregidos fueron calculados como: $\mathbf{y}^* = \mathbf{y} - \mathbf{X}\hat{\mathbf{b}} - \mathbf{P}\hat{\mathbf{p}} - \mathbf{F}\hat{\mathbf{t}} - \mathbf{D}\hat{\mathbf{d}}$. Básicamente, los fenotipos corregidos contendrán solamente los valores genéticos poligénicos y las desviaciones residuales (i.e. $\mathbf{y}^* = \mathbf{Z}\hat{\mathbf{u}} + \hat{\mathbf{e}}$).

El modelo descrito en [1] es similar al usado actualmente en ANCHE para las evaluaciones genéticas de la población completa de Churra, con la única diferencia en cómo el efecto de la lactación es tenido en cuenta en el modelo. Esto fue hecho usando una regresión “*spline*” no lineal en DIM, mientras que ANCHE lo que hace es adicionar un efecto categórico de las semanas en lactación (Luis Fernando de la Fuente, comunicación personal). Resultados preliminares mostraron que los valores genéticos estimados y los fenotipos corregidos fueron los mismos usando tanto una vía como la otra.

2.1.1.1. Métodos de predicción genética y genómica.

El beneficio de incluir información genómica en la evaluación genética fue evaluado cuantificando la precisión de los valores genéticos estimados con tres diferentes métodos de evaluación genética usando información genómica y comparándolos con el método estándar BLUP. Los tres métodos de evaluación genómica usados son variantes del tradicional BLUP, modificados para incluir información genómica. Primero describiremos el método BLUP usado y luego los métodos de GS.

BLUP estándar. El método BLUP estándar no usa información genómica, pero en su lugar utiliza la información del pedigrí para calcular las relaciones genéticas entre los animales. El modelo implementado con BLUP es:

$$\mathbf{y}^* = \mu + \mathbf{Za} + \mathbf{e}^* \quad [2]$$

Donde \mathbf{y}^* es el fenotipo corregido de cada control, μ es la media global, \mathbf{a} es el vector de los valores genéticos poligénicos distribuidos como $N(\mathbf{0}, \mathbf{A}\sigma_a^2)$, y \mathbf{e}^* es el vector de las desviaciones residuales i.i.d. Note que los efectos poligénicos \mathbf{a} son básicamente los mismo que el efecto \mathbf{u} en la ecuación [1] (la correlación entre \mathbf{a} y \mathbf{u} fue superior a 0,98 cuando ambos análisis usaron

la misma información). Se han usado diferentes nomenclaturas para los efectos poligénicos, **a** y **u**, para dejar claro que los valores genéticos estimados usados para calcular los fenotipos deregresados son los calculados con los fenotipos corregidos usando la ecuación [2].

En este estudio, BLUP se implementó (i) usando los registros de los controles corregidos y disponibles para todos los animales (menos el grupo de validación) incluidos en el pedigrí; o (ii) usando sólo los registros de los controles corregidos del grupo de ovejas genotipadas (menos el grupo de validación). En ambos casos, la matriz de relación genética (**A**) se calculó utilizando toda la información de pedigrí, además, se obtuvieron las estimaciones de los valores genéticos para todos los animales incluidos en el pedigrí, independientemente de si sus registros fenotípicos estaban incluidos o no en el análisis.

BLUP genómico (GBLUP). El método GBLUP (Meuwissen et al., 2001; VanRaden, 2008) es similar al BLUP pero la matriz de relación entre individuos es calculada usando información genómica. Por lo tanto, el modelo GBLUP usado tenía la siguiente forma:

$$\mathbf{y}^* = \mu + \mathbf{Zg} + \mathbf{e}^* \quad [3]$$

Donde **g** es el vector de los valores genéticos genómicos asumidos a ser distribuidos $N(\mathbf{0}, \mathbf{G}\sigma_g^2)$.

La matriz **G** es la matriz de relaciones genómicas entre los individuos genotipados obtenida con los SNPs usando el “método 2” de VanRaden (2008). Este método consiste en que la relación genómica entre el individuo *j* y *k* es igual a $\frac{1}{m} \sum_{i=1}^m [(x_{j,i} - 2p_i) * (x_{k,i} - 2p_i)] / (2p_i(1 - p_i))$, donde $x_{j,i}$ ($x_{k,i}$) es el valor genotípico del individuo *j* (individuo *k*) en el locus *i* (o sea, asumiendo que B es el alelo de referencia, $x=0,1,2$ para individuos con genotipos bb, bB y BB, respectivamente); p_i es la frecuencia del alelo referencia en el locus *i* y *m* es el número de SNP usados para calcular la matriz **G**. Por lo tanto, GBLUP usa la matriz **G** para estimar los valores genéticos genómicos solamente de aquellos animales genotipados. Similarmente que BLUP,

GBLUP permite tener múltiples registros de los individuos. La inversa generalizada de Moore-Penrose de la matriz G se utilizó como entrada para ASREML para calcular las componentes de varianza y los GEBVs (Ben-Israel and Greville, 2003).

BLUP Genómico Deregresado (DGBLUP). El método DGBLUP estima los valores genéticos genómicos a través de un modelo mixto ponderado usando los fenotipos corregidos deregresados. El método es similar al GBLUP en el sentido de que este usa la información genotípica de los individuos para estimar sus $\hat{\mathbf{g}}$. Sin embargo, la información de los animales no genotipados es también tenida en cuenta ya que ellos fueron usados a priori para calcular los valores genéticos deregresados (este enfoque a veces es referido como “*two-stage* GBLUP”). El método DGBLUP asume que los individuos tienen solamente un registro o ninguno si pertenecen al grupo de validación. El método DGBLUP desarrollado aquí tiene la siguiente forma:

$$\tilde{\mathbf{y}} = \mu + \mathbf{Z}\mathbf{g} + \tilde{\mathbf{e}} \quad [4]$$

Donde $\tilde{\mathbf{y}}$ es el vector de los valores genéticos deregresados, \mathbf{g} es el vector de los valores genéticos genómicos distribuidos como en [3], $\tilde{\mathbf{e}}$ es un vector aleatorio de los efectos residuales distribuidos como $N(\mathbf{0}, \mathbf{W}^{-1}\sigma_{\tilde{\mathbf{e}}}^2)$, y \mathbf{W} es una matriz diagonal, donde los elementos de la diagonal son los pesos dados a los valores genéticos deregresados.

Los valores genéticos deregresados ($\tilde{\mathbf{y}}$) y sus pesos (\mathbf{w}) usan una variante del método propuesto por Garrick et al. (2009). Asume que los valores genéticos estimados ($\hat{\mathbf{a}}$) fueron obtenidos independientemente, por lo que los valores genéticos deregresados son calculados como $\tilde{\mathbf{y}} = \hat{\mathbf{a}}/r^2$, donde r^2 es la fiabilidad de $\hat{\mathbf{a}}$ igual a $r^2 = 1 - \frac{PEV}{Var(a)} = 1 - \frac{se^2}{Var(a)}$, y PEV es la varianza del error de predicción. Sin embargo, n Garrick et al. (2009) destacaron que dicha estimación duplicaría la información cuando el DGBLUP incluyera el $\tilde{\mathbf{y}}$ de un individuo y sus parientes

calculados con \hat{a} obtenidos del mismo análisis BLUP. Para evitar esa posible fuente de información de sesgo, ellos propusieron un método para eliminar el efecto del promedio de los padres de \tilde{y} . Aquí nosotros extendemos el método para tener en cuenta cuando los individuos o sus padres son endogámicos y también cuando sólo un padre tiene sus \tilde{y} incluidos en el DGBLUP. El método es descrito en el material suplementario del Chapter 1 de la sección de los resultados.

El peso de los valores genéticos deregresados fue calculado como: $w_i = \frac{1-h^2}{\left[c + \frac{1-r_i^2}{r_i^2}\right]h^2}$, donde h^2 es

la heredabilidad obtenida con el modelo BLUP utilizando la información de todos los animales disponibles en el pedigrí y c es la fracción de la varianza genética no explicada por los marcadores, o sea, la heredabilidad perdida. Los valores de c ($c = \frac{\hat{\sigma}_{a_{BLUP}}^2 - \hat{\sigma}_{g_{GBLUP}}^2}{\hat{\sigma}_{a_{BLUP}}^2}$) fueron calculados empíricamente usando la varianza genética estimada de los modelos BLUP y GBLUP utilizando solamente los fenotipos de las ovejas genotipadas. Si los estimados de c eran negativos, este era asumido a ser cero, significando que los SNPs explicaban completamente toda la varianza genética del carácter en cuestión. Los valores de c fueron 0 (MY), 0.3318 (PY), 0 (FY), 0.2443 (PP), 0.0263 (FP) y 0.2005 (TSP).

BLUP genómico de un solo paso (ssGBLUP). El método ssGBLUP permite integrar la información fenotípica de animales genotipados como no genotipados en un simple proceso de evaluación. El método modela los efectos genéticos con una matriz de relación genética el cual combina información obtenida del pedigrí y los genotipos (Legarra et al., 2014b, 2009; Misztal et al., 2009). El modelo usado para el ssGBLUP fue:

$$\mathbf{y}^* = \mu + \mathbf{Z}\mathbf{h} + \mathbf{e}^* \quad [5]$$

Donde \mathbf{h} es el vector genético genómico que es asumido a tener una distribución $N(\mathbf{0}, \mathbf{H}\sigma_h^2)$, siendo \mathbf{H} la matriz de relación el cual combina la información obtenida del pedigrí y los genotipos. Aquí nosotros sólo proveeremos una rápida descripción para \mathbf{H}^{-1} , el cual es la única necesaria para resolver el modelo mixto relevante para estimar $\hat{\mathbf{h}}$. Para una descripción más detallada sobre la matriz \mathbf{H} y su inversa, esta puede ser encontrada en Legarra et al. (2014b).

Asumiendo que el pedigrí es ordenado de tal manera que los individuos genotipados son agrupados, tenemos que la inversa de la matriz \mathbf{H} tiene la siguiente forma:

$$\mathbf{H}^{-1} = \mathbf{A}^{-1} + \begin{bmatrix} \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & (\mathbf{G}^{*-1} - \mathbf{A}_{22}^{-1}) \end{bmatrix}$$

Donde \mathbf{A}_{22}^{-1} es la inversa de una submatriz de \mathbf{A} (matriz de relación numerador) que incluye solamente a los animales genotipados, y \mathbf{G}^* es la matriz de relación genómica ajustada a tener la misma escala de \mathbf{A}_{22} (Vitezica et al., 2011). Por lo tanto, $\mathbf{G}^* = \alpha + \beta \mathbf{G}$, donde α y β son escogidos de tal forma que la media para todos los elementos de \mathbf{G}^* y \mathbf{A}_{22} son los mismos, así como la media de los elementos de la diagonal son los mismos.

2.1.1.2. Grupos candidatos de interés.

En este estudio, la población de referencia disponible estaba compuesta por un conjunto de 1,667 ovejas históricas de 16 familias de medias hermanas y un conjunto de 235 carneros. Debido a que estos animales están muy distantes de los individuos más jóvenes considerados en este estudio, nos propusimos comprobar el valor del uso de esta población de referencia para mejorar los valores genéticos estimados de cuatro grupos candidatos diferentes (ovejas o carneros) que usan el mismo modelo genético aplicado por ANCHE. Para cada grupo objetivo, estimamos sus GEBV asumiendo que ellos o sus descendientes no tienen información

fenotípica disponible, y calculamos su calidad como su capacidad para predecir su y^* que no se usó durante la evaluación. Los resultados de los diferentes métodos genómicos se compararon con las estimaciones del valor genético obtenido del BLUP estándar. Para cada grupo de candidatos objetivo, utilizamos validación cruzada (CV) de 5 iteraciones, o sea, los animales de un grupo objetivo se dividieron en cinco grupos y uno de esos grupos se asumió que era el de validación. Este proceso consiste en que la información fenotípica del grupo de validación se elimina y la evaluación genética se realiza para estimar su valor genético y luego la precisión entre los registros de controles corregido no utilizados (y^*) y los GEBV se evaluaron usando el coeficiente de correlación de Pearson. Se repitió el mismo proceso en los otros cuatro grupos y se calculó el valor promedio para las correlaciones de Pearson. Este procedimiento se utilizó para los diferentes grupos candidatos seleccionados y para los seis caracteres de producción.

Los grupos candidatos seleccionados en el estudio fueron:

(i) Ovejas genotipadas medias hermanas de las ovejas genotipadas en la población de entrenamiento. Este grupo de candidatas formaba parte de las 1,667 ovejas pertenecientes a las 16 familias de ovejas genotipadas y el objetivo era evaluar la capacidad de predecir las candidatas que tienen medias hermanas genotipadas en la población en formación. Para crear los grupos para el estudio de CV, cada una de las 16 familias de medias hermanas se dividió aleatoriamente en cinco grupos de igual tamaño y se asignaron a cada grupo de validación, para garantizar que cada una de las 16 familias tenga la misma representación en cada grupo para que fueran siempre representado en la población de formación. Para este grupo de candidatos, se cuantificó el beneficio de la selección genómica considerando los métodos GBLUP, DGBLUP y ssGBLUP y se comparó el valor de sus GEBV con el estimado a través del BLUP estándar. Las ovejas que formaban parte del grupo de validación y sus hijas tenían sus registros de controles fenotípicos eliminados de la evaluación genética.

(ii) Ovejas no genotipadas de carneros genotipados. Este grupo de candidatas son descendientes de los 235 carneros genotipados, exceptos las aquellas ovejas de las 16 familias a las que pertenecían las 1,667 ovejas genotipadas. El objetivo de este escenario era evaluar si la información de los genotipos de los carneros es propagada a sus hijas no genotipadas y mejoraba sus valores genéticos estimados. Como en el grupo objetivo anterior, las hijas de un carnero genotipado se dividieron en partes iguales y se asignaron a cada uno de los cinco grupos de validación. Con el fin de garantizar que la precisión de la predicción fuera más precisa, en el estudio de CV sólo se utilizaron hijas con más de 10 registros de controles. De manera similar, los registros fenotípicos de las ovejas en el grupo de validación y sus propias hijas no se incluyeron en el análisis.

(iii) Ovejas más jóvenes en el pedigrí. El objetivo de evaluar a este grupo de candidatas era medir el impacto que tienen los animales más viejos como población de referencia en un escenario de predicción avanzada (más actual). Las ovejas seleccionadas para este grupo de candidatas objetivo fueron 1,667 ovejas de los últimos años sin relación directa con las ovejas genotipadas. Del mismo modo, sólo se utilizaron ovejas con un mínimo de 10 registros de controles en el estudio de CV, y además estos registros fenotípicos se excluyeron de la evaluación de las ovejas que formaban parte del grupo de validación.

(iv) Carneros genotipados. El objetivo de estudiar este grupo de candidatos fue para evaluar el valor de usar esta población histórica como referencia y así predecir el rendimiento de los carneros genotipados no testados, o sea, carneros sin hijas genotipadas. Los 219 carneros (excluyendo los 16 carneros padres de las 16 familias de medias hermanas genotipadas) se dividieron y asignaron a cada uno de los cinco grupos de validación. Similar a los demás escenarios, se eliminaron los registros fenotípicos de todos los descendientes y nietos de los carneros en validación. Debido a que los carneros no tienen registros fenotípicos, el GEBV obtenido para los carneros validados se comparó con el EBV estimado a partir del modelo

BLUP asumiendo toda la información disponible. Por lo tanto, los resultados sobre las magnitudes absolutas obtenidas cuando es usado una población de referencia de carneros u ovejas no deben compararse directamente, pero la comparación del beneficio de los métodos de predicción genómica en relación con el BLUP es válida.

2.1.2. Análisis aplicados a los datos reales de Assaf.

2.1.2.1. Estimación de los parámetros genéticos para los caracteres de coagulación y rendimiento quesero.

Análisis REML fueron llevados a cabo para estimar las heredabilidades y correlaciones fenotípicas y genéticas entre los caracteres de coagulación y rendimiento quesero. Idealmente un análisis multivariado con todos los caracteres hubiera sido más apropiado para estimar las relaciones genéticas entre ellos, sin embargo, esto no fue factible debido a el tamaño de la muestra y la alta correlación entre algunos caracteres. Por lo tanto, los valores perdidos de cada par de caracteres fueron eliminados, y la correlación ambiental y genética entre estos pares de caracteres fue estimada con un análisis bivariado, incluyendo los dos caracteres en cuestión. El siguiente modelo bivariado fue usado en todos los análisis y descrito como en Mrode, (2014):

$$\begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_1 & 0 \\ 0 & X_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} Z_1 & 0 \\ 0 & Z_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a_1 \\ a_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \end{bmatrix} \quad [6]$$

donde y_i es el vector de observaciones del carácter i-th; b_i es el vector de efectos fijos para el carácter i-th, a_i es el vector que contiene los efectos animales aleatorio del carácter i-th, e_i es el vector de los efectos residuales para el carácter i-th; y X_i y Z_i son las matrices de incidencia que relacionan las observaciones y_i con b_i y a_i , respectivamente, para el carácter i-th. Los efectos fijos fueron DIM como covariable, y FTD, Edad y NBL como factores.

2.1.2.2. Estimación de las correlaciones fenotípicas y genéticas de los caracteres de coagulación y rendimiento quesero con los caracteres de leche.

La estimación de las correlaciones fenotípicas y genéticas entre los caracteres de coagulación, rendimiento quesero y de leche se llevaron a cabo como un análisis exploratorio adicional. Para este análisis, los registros fenotípicos usados para los caracteres de la leche no fueron obtenidos en la misma muestra de los caracteres de coagulación y rendimiento quesero, sino que fueron facilitados por la asociación, y eran los registros más cercanos al día de muestreo de los caracteres relacionados con la coagulación y producción de queso. Nuestra primera intención fue coordinar los caracteres de coagulación y rendimiento quesero con el control oficial de leche de ASSAFE, pero debido a la imposibilidad logística de juntar los dos grupos de muestreos en los rebaños en el mismo día, los registros fenotípicos de los caracteres de leche fueron tomados en un día tan cerca como fuera posible a las muestras de los caracteres de coagulación y rendimiento quesero. Tal diseño experimental no es óptimo para estimar correlaciones fenotípicas y genéticas entre un carácter de coagulación o rendimiento quesero con un carácter de leche, o sea, no es ideal ya que los registros se midieron a partir de dos muestras de leche diferentes, pero esperamos que las estimaciones sean lo suficientemente confiables. Dada la corta distancia entre las mediciones (entre 1 y 13 días), es esperado que las estimaciones de la correlación genética se vean poco afectadas. Por el contrario, la correlación ambiental, y por lo tanto la correlación fenotípica, pueden estar ligeramente sesgada hacia cero. Aunque creemos que las estimaciones de las correlaciones entre un carácter de leche y un carácter de coagulación o rendimiento quesero sean lo suficientemente confiables, éstas deberían considerarse como resultados preliminares y puede ser necesario un estudio adicional para validarlos. Sin embargo, previos estudios de nuestro grupo de investigación han demostrado que la leche muestreada con pequeñas diferencias producen aceptables precisiones en los resultados de análisis adicionales

(Gonzalo et al., 2003), aunque reconocemos que las correlaciones pueden estar afectadas ligeramente. Los parámetros genéticos entre los caracteres de leche con los caracteres de coagulación y rendimiento quesero también se estimaron utilizando análisis bivariados que se ajustan al mismo modelo descrito anteriormente en [6].

En general, un total de 120 modelos bivariados fueron desarrollados para estimar las correlaciones entre los 16 caracteres finalmente considerados. Las heredabilidades fueron estimadas usando la varianza ambiental y genética estimadas en el correspondiente análisis bivariado. Ya que cada carácter fue incluido en 15 análisis bivariado, había el mismo número de estimas para las varianzas genéticas y ambientales. Por lo tanto, el promedio ponderado fue calculado para cada parámetro usando la inversa de su error estándar cuadrático y luego usado como factor de ponderación. Además, con el objetivo de realizar un estudio exploratorio de las correlaciones entre los caracteres estudiados, se desarrolló un análisis de componentes principales usando el software R (R Core Team, 2019).

2.1.2.3. Selección Indirecta.

Asumiendo que todos los caracteres de producción, composición y funcionales de leche son rutinariamente medidos por la asociación, pero no así los caracteres de coagulación y rendimiento quesero, metodologías de selección indirecta pueden ser aplicadas para la mejora genética de estos caracteres.

Ya que los caracteres de leche están limitados al sexo, la respuesta genética esperada que surge de la selección de machos y hembras de Assaf, fueron estimadas separadamente basadas en dos suposiciones diferentes para la información disponible en el tiempo de la selección. Para hembras fue asumido que cada candidata tenía un solo registro de control para todos los caracteres medidos, mientras que los machos fueron asumidos a ser progenitores testados con

10 hijas medias hermanas, cada una con un registro de control para todos los caracteres medidos.

El esquema de selección actual de la raza Assaf española tiene como objetivo de selección primario incrementar PY y FY usando un índice el cual asigna el mismo peso económico a ambos caracteres, el cual denotaremos como índice de ASSAFE. Hasta ahora, los caracteres de coagulación y rendimiento quesero no son incluidos en los objetivos de selección de la asociación, pero la dirección deseada para los cambios genéticos en los caracteres de coagulación y rendimiento quesero es: reducir RCT y $\log K_{20}$, aumentar A_{60} , ILCY y ILDCY. Además, dos caracteres adicionales referentes a la producción total de ILCY y ILDCY fueron creados: producción total de queso individual de laboratorio (ILCYT, gramos) y producción total de queso seco individual de laboratorio (ILDCYT, gramos), donde la dirección deseada para estos dos últimos caracteres nuevos es aumentarlos también. Cambios en los niveles genéticos de los caracteres funcionales no fueron considerados aquí, pero decrecer SCC puede ser de interés a los ganaderos y por lo tanto un peso económico se debería tener en cuenta. Haciendo un paréntesis aquí, debemos aclarar que el carácter A_{30} no fue usado en este análisis del cálculo de la selección indirecta debido a la cantidad de valores perdidos que presentó.

Todos los parámetros usados aquí fueron estimados en la raza Assaf y reportadas en Sánchez-Mayor et al. (2019). Ya que las correlaciones fueron calculadas en una serie de análisis REML bivariados, las matrices de covarianzas fenotípicas y genotípicas fueron modificadas para asegurar que ellas fueran definidas positivas mediante un ajuste a los valores propios negativos, como es descrito en Schaeffer (2019, 2014). Adicionalmente, para facilitar la interpretación de los resultados, todos los caracteres fueron reescalados para que la varianza fenotípica de cada uno de ellos fuera uno, o sea, el carácter en la escala estandarizada era obtenido al dividir cada carácter por su desviación estándar fenotípica. Este reescalamiento, sin embargo, no tiene influencia en las conclusiones, ya que los resultados en la escala estandarizada son directamente

proporcionales a estos obtenidos cuando se usa la escala original. Además, la respuesta esperada y los valores económicos de un carácter estandarizado puede ser fácilmente transformado a la escala original multiplicando los valores por sus desviaciones estándares fenotípicas (Cameron, 1997).

2.1.2.4. La respuesta genética directa a la selección en hembras y machos de Assaf.

La respuesta genética esperada de la selección directa (donde el carácter de interés es medido en los candidatos y/o parientes, y es usado como criterio de selección) fue calculada para todos los caracteres y usada como referencia para evaluar el desarrollo de las estrategias de selección adicionales.

Teniendo en cuenta la información disponible para ser usada como criterio de selección (o sea, un registro de control para las hembras candidatas y el valor medio de 10 hijas medias hermanas en los machos candidatos), la respuesta directa esperada (DR) de la selección en ovejas y machos son (Cameron, 1997):

$$DR_{oveja} = i * h^2 \sigma \quad [7]$$

$$DR_{macho} = i * h^2 \sigma \sqrt{\frac{n}{4+(n-1)h^2}} \quad [8]$$

Donde i es la intensidad de selección estandarizada, h^2 es la heredabilidad del carácter, σ su desviación estándar fenotípica y n es el número de descendientes medias hermanas, donde aquí asumimos a ser 10. La proporción de la selección directa entre machos y oveja es:

$$\frac{DR_{macho}}{DR_{oveja}} = \sqrt{\frac{n}{4+(n-1)h^2}} \quad [9]$$

lo que destaca que el beneficio de usar la prueba de progenie es mayor con un carácter de baja heredabilidad y con un mayor número de descendientes.

2.1.2.5. La respuesta correlacionada a la selección a través de un proxy y su eficiencia de selección relativa.

Aquí asumimos que el carácter objetivo de interés, o sea, los caracteres de coagulación y rendimiento quesero, no son medidos, por lo que la respuesta genética es alcanzada a través de la selección en un carácter correlacionado o proxy (es decir, caracteres de producción, composición y funcionales). Por lo tanto, la respuesta correlacionada en el carácter objetivo mediante la selección en el proxy es, para machos y ovejas, de la siguiente forma (Cameron, 1997; Syrstad, 1970):

$$CR_{oveja} = i * r_{gtp} h_t h_p \sigma_t \quad [10]$$

$$CR_{macho} = i * r_{gtp} h_t h_p \sigma_t \sqrt{\frac{n}{4+(n-1)h_p^2}} \quad [11]$$

Donde r_{gtp} es la correlación genética entre los caracteres objetivo y proxy, h_t , h_p son las raíces cuadradas de las heredabilidades del carácter objetivo y proxy, respectivamente; y σ_t es la desviación estándar fenotípica del carácter objetivo.

Definiendo la eficiencia de selección relativa (RSE) como la proporción de la respuesta correlacionada de seleccionar a través del proxy sobre la respuesta directa, el valor respectivo para ovejas y machos es (Syrstad, 1970):

$$RSE_{hembra} = \frac{h_p}{h_t} r_{gtp} \quad [12]$$

$$RSE_{macho} = \frac{h_p}{h_t} \sqrt{\frac{4+(n-1)h_t^2}{4+(n-1)h_p^2}} r_{g_{tp}} \quad [13]$$

Por lo tanto, la ventaja de seleccionar a través de un proxy incrementará mientras mayor sea la heredabilidad del proxy y más baja la heredabilidad del carácter objetivo. También se puede apreciar que la RSE es independiente de la varianza fenotípica de los caracteres, mostrando que su magnitud es la misma independientemente de si los caracteres están en su escala original o no.

2.1.2.6. Índice de selección y sus respuesta correlacionada y eficiencia relativa.

Respuesta a la selección en los caracteres de coagulación y rendimiento quesero fueron también cuantificados para diferentes escenarios usando índices de selección, el cual combina información de diversos proxys (medido en el mismo candidato o sus parientes), para mejorar genéticamente uno o muchos objetivos de selección variándole el peso económico. Los índices de selección considerados aquí fueron optimizados basados en la teoría del índice de selección tradicional (Cameron, 1997; Hazel, 1943).

Sea un conjunto de m caracteres recogidos a ser usados como proxys (denotado como criterio de selección) con el objetivo de mejorar genéticamente k caracteres (denotados como objetivos de selección). Los caracteres en el objetivo de selección pueden o no ser usados como criterio de selección. El puntaje de índice (I) para un candidato es:

$$I = \mathbf{b}'\mathbf{x} \quad [14]$$

Donde \mathbf{x} es el vector de mediciones fenotípicas para los m criterios de selección en el candidato (o la media fenotípica en un conjunto de parientes) y \mathbf{b} son sus pesos relativos dados en el índice.

Para maximizar la respuesta global (es decir, la suma de la respuesta correlacionada para todos los caracteres en el objetivo de selección multiplicado por su peso económico), el valor óptimo para **b** es calculado como:

$$\mathbf{b} = \mathbf{P}^{-1}\mathbf{G}\mathbf{a} \quad [15]$$

Donde **P** es la matriz de covarianza fenotípica entre los caracteres incluidos como criterio de selección, **G** es la matriz de covarianza genética entre los caracteres en el criterio de selección y en el objetivo de selección; y **a** es el vector de pesos económicos relativos de los caracteres en el objetivo de selección. Si la dirección deseada de la selección es reducir el valor medio de un carácter dado en el objetivo de selección, entonces sus pesos económicos serían negativos (por ejemplo, esto sería el caso para RCT y logK₂₀, donde muestras de leche con valores bajos para estos caracteres tienen un impacto favorable en el proceso quesero).

Recordando que la selección de hembras y machos está basada en diferentes tipos de información disponibles, los índices de selección para machos y hembras candidatas están calculadas con diferentes matrices **P** y **G**.

Para ilustrar cómo estas matrices son calculadas, asumamos dos caracteres (x=1,2). Por lo tanto, para el caso de hembras donde la selección está basada en sus propios registros de controles (para cada carácter en el criterio de selección), las matrices **P** y **G** son:

$$\mathbf{P}_{hembras} = \begin{bmatrix} \sigma_1^2 & r_{12}\sigma_1\sigma_2 \\ r_{12}\sigma_1\sigma_2 & \sigma_2^2 \end{bmatrix} \quad [16]$$

Y

$$\mathbf{G}_{hembras} = \begin{bmatrix} h_1^2\sigma_1^2 & r_{g12}h_1h_2\sigma_1\sigma_2 \\ r_{g12}h_1h_2\sigma_1\sigma_2 & h_2^2\sigma_2^2 \end{bmatrix} \quad [17]$$

Donde h_x^2 y σ_x^2 son las heredabilidades y varianza fenotípica del carácter x respectivamente (siendo h_x y σ_x sus respectivas raíces cuadradas); r_{xy} y $r_{g_{xy}}$ son las correlaciones fenotípicas y genéticas entre x y y , respectivamente.

Por otro lado, para el caso de los machos, \mathbf{P} es la matriz de covarianza fenotípica para el promedio de las n hijas medias hermanas y \mathbf{G} es la matriz de covarianza genética entre el macho y el valor promedio de las hijas. Entonces, las respectivas matrices son:

$$\mathbf{P}_{machos} = \begin{bmatrix} \left(\frac{4+(n-1)h_1^2}{4n}\right)\sigma_1^2 & \frac{r_{12}\sigma_1\sigma_2+(n-1)(0.25r_{g_{12}}h_1h_2\sigma_1\sigma_2)}{n} \\ \frac{r_{12}\sigma_1\sigma_2+(n-1)(0.25r_{g_{12}}h_1h_2\sigma_1\sigma_2)}{n} & \left(\frac{4+(n-1)h_2^2}{4n}\right)\sigma_2^2 \end{bmatrix} \quad [18]$$

Y

$$\mathbf{G}_{machos} = 0.5 \begin{bmatrix} h_1^2\sigma_1^2 & r_{g_{12}}h_1h_2\sigma_1\sigma_2 \\ r_{g_{12}}h_1h_2\sigma_1\sigma_2 & h_2^2\sigma_2^2 \end{bmatrix} \quad [19]$$

Finalmente, las matrices son expandidas para incluir todos los caracteres, y el índice es optimizado usando filas y columnas asociados al criterio y objetivo de selección.

Una vez que los pesos relativos para el criterio de selección (\mathbf{b}) fueron calculados, la respuesta a la selección (CR) para el carácter j (el cual puede o no tener un peso económico en el índice) es igual a:

$$CR_j = i * \frac{\mathbf{b}'\mathbf{G}_j}{\sqrt{\mathbf{b}'\mathbf{P}\mathbf{b}}} \quad [20]$$

Donde \mathbf{G}_j es la columna en \mathbf{G} correspondiente al carácter j , y las matrices \mathbf{P} y \mathbf{G} son usadas tanto en los candidatos machos como hembras.

Finalmente, RSE en el carácter j cuando seleccionamos por el índice es calculado dividiendo la respuesta correlacionada por la respuesta directa obtenida con las ecuaciones [7] y [8].

Para el caso del índice de ASSAFE, se asume que PY y FY están dentro de los objetivos de selección y, al mismo tiempo, en el criterio de selección. Este índice también asigna igual peso económico a ambos caracteres, el cual en la escala estandarizada, son proporcionales a la inversa de sus desviaciones estándares fenotípicas (es decir, $a_{PY} = \frac{\sigma_{PY}^{-1}}{(\sigma_{PY}^{-1} + \sigma_{FY}^{-1})}$, $a_{FY} = \frac{\sigma_{FY}^{-1}}{(\sigma_{PY}^{-1} + \sigma_{FY}^{-1})}$). Basados en estos pesos económicos estandarizados, el vector **b** (y por lo tanto las respectivas respuestas correlacionadas y RSEs) pueden ser fácilmente calculadas para cuando se usa el índice de ASSAFE para la selección.

2.1.2.7. Balanceando la respuesta a la selección para los caracteres de coagulación, rendimiento quesero y producción de leche.

Para asegurar los esquemas de selección multiobjetivo usando un índice, se requieren conocimientos de los pesos económicos para los caracteres objetivos, para así maximizar la ganancia genética global. Sin embargo, debido a la naturaleza dinámica y compleja de la industria lechera, estimar estos pesos no es una simple tarea y se necesitaría reestimar muy frecuentemente. Por lo que, en lugar de construir un índice de selección para maximizar la eficiencia económica del esquema de mejora dado el peso económico actual de los diferentes caracteres objetivos, buscamos un índice de ‘compromiso’ que proporcione un nivel equilibrado de progreso genético tanto para los caracteres de producción de leche como para los de queso (Bichard, 1977).

Un índice de selección que maximice la eficiencia económica y que contenga varios caracteres objetivos separados en dos grupos (por ejemplo, caracteres de producción de leche y queso) puede ser creado en conjunto con los pesos relativos a cada grupo de caracteres objetivos. Sean z y $1-z$ los pesos relativos de los caracteres en el primer y segundo grupo, respectivamente, que

usaremos para optimizar el índice de selección y calcular la respuesta correlacionada expresada como RSE.

Asignando valores entre 0 y 1 a z , la tendencia de RSE puede ser calculada para el rango completo de valores desde un extremo (donde el peso completo es sólo dado al grupo de caracteres de leche) al otro extremo (donde el peso completo es sólo dado a los caracteres de queso). Por lo tanto, el índice de 'compromiso' sería aquel que produjera un nivel de respuesta 'aceptable' para todos los caracteres relevantes (Bichard, 1977). Y aunque el proceso de elección del índice de "compromiso" es de alguna manera subjetivo, ya que el nivel de respuesta 'aceptable' lo definen los propios criadores, evita la necesidad de reestimar el índice debido a los continuos cambios en los pesos económicos de los caracteres objetivos.

Los caracteres incluidos como criterios de selección en el índice fueron cuatro de producción de leche (PP, FP, PY, FY) y los tres caracteres funcionales (pH, Urea, LSCC), que se eligieron porque son o podrían ser medidos rutinariamente por ASSAFE y porque eran buenos proxis para algunos caracteres relacionados con la coagulación y rendimiento quesero. Los objetivos de selección incluyeron cuatro caracteres: dos caracteres de coagulación y dos caracteres de producción de queso. Los caracteres de coagulación y rendimiento quesero incluidos en los objetivos de selección fueron: uno relacionado con los caracteres de MCP (RCT o A_{60}) y uno relacionado con el rendimiento quesero (ILCY). Los caracteres de producción de leche incluidos en los objetivos de selección fueron PY y FY, ya que son los principales objetivos del actual índice ASSAFE.

2.2. Análisis con datos simulados.

Los diferentes estudios de datos simulados se basaron en datos reales de la raza Churra. Las dos primeras simulaciones se realizaron con el objetivo de entender e interpretar los resultados obtenidos de los análisis realizados con datos reales de la raza Churra. Y una tercera simulación con el objetivo de evaluar el efecto de la estrategia de genotipado en la respuesta a la selección entre múltiples generaciones usando ssGBLUP cuando no todos los candidatos son genotipados.

2.2.1. Estudio de simulación 1.

El objetivo de este estudio de simulación fue evaluar si el panel de chip de SNPs usado en la población de Churra tenía suficiente información para mejorar las predicciones genéticas. Aquí, los registros fenotípicos fueron simulados basados en la información genómica disponible para las 1,667 hembras. Un total de 500 SNPs aleatoriamente seleccionados del panel de SNPs fueron asumidos a ser QTLs y se les asignó un efecto aditivo muestreado de una distribución normal. Los valores genéticos totales para cada hembra genotipada fueron calculados asumiendo los efectos de todos los QTLs, y reescalados para que su varianza coincida con la varianza genética objetivo. Luego, los fenotipos fueron simulados en cada hembra adicionando una desviación ambiental al valor genético total. El número de registros fenotípicos simulados para cada hembra es el mismo que se observó con los datos reales. Este enfoque simula sólo datos para individuos genotipados, que se usaron para comparar los métodos BLUP y GBLUP cuando la predicción es realizada en el grupo de candidatas genotipadas y sus medias hermanas no genotipadas.

2.2.2. Estudio de simulación 2.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la estructura de los datos de la raza Churra en el beneficio de la selección genómica. La simulación fue diseñada para recrear el mismo patrón de información del pedigrí, fenotipos y genotipos de las bases de datos de Churra, y las comparaciones de métodos fueron realizadas usando los mismos grupos de candidatos aplicados en datos reales.

El pedigrí de la población de Churra y los genotipos fueron simulados para cada individuo en dos pasos (i) muestreando los genotipos de los fundadores (con padres desconocidos) usando el algoritmo de equilibrio mutación-deriva (Meuwissen et al., 2001); y (ii) un enfoque “*gene-dropping*” para simular los genotipos del resto de los individuos (con padres conocidos) en el pedigrí. Una población histórica inicial (todos fijados para el mismo alelo) fue creada para involucrar individuos aleatoriamente apareados para producir la próxima generación. Los genotipos de los hijos fueron muestreados dadas las reglas de herencia mendelianas, permitiendo mutaciones para producir nuevas variantes y derivas para dirigir sus pérdidas y cambios en las frecuencias. El proceso fue repetido sobre un número de generaciones hasta que el patrón de LD de los genotipos simulados alcanzó un equilibrio. Por lo tanto, la población histórica fue continuada por muchas generaciones de expansión, y los animales de la última generación fueron escogidos a ser los animales fundadores del pedigrí de Churra. Finalmente, los genotipos de los animales no fundadores fueron muestreados usando el enfoque “*gene-dropping*”.

Para imitar el mismo LD en la población de Churra, los siguientes supuestos fueron tenidos en cuenta: (i) la población histórica fue de tamaño 200 (100 machos y 100 hembras); (ii) el genoma fue dividido en 26 cromosomas, cada uno con 500,000 SNPs equidistantes; (iii) la tasa de mutación fue de 1×10^{-6} ; (iv) la población histórica involucró 10,000 generaciones; (v) el

periodo de expansión fue de cuatro generaciones, con la población creciendo 5X por generación y la última fue de 13,000 individuos seleccionados como los animales fundadores de la población de la raza Churra. Luego, los genotipos fueron muestreados para el pedigrí completo, 2,000 y 100 SNPs segregando con $MAF > 0.05$ por cromosoma fueron aleatoriamente escogidos para ser parte del panel de SNP y QTLs, o sea, el total de loci en el panel de SNP y QTL fueron 52,000 y 2,600, respectivamente.

El efecto aditivo de cada QTL fue aleatoriamente muestreado de una distribución normal y el valor genético total calculado fue la suma de todos los QTLs, el cual más tarde fueron reescalados y así las varianzas de los animales fundadores fueran igual a la varianza genética objetivo. Además, los fenotipos fueron simulados adicionando una desviación ambiental a los valores genéticos totales (el mismo número de registros fenotípicos observados en los conjuntos de datos reales fueron simulados para cada hembra).

2.2.3. Estudio de simulación 3.

Este estudio de simulación fue realizado para evaluar el efecto de las estrategias de genotipado en la respuesta a la selección entre múltiples generaciones usando ssGBLUP teniendo en cuenta que no todos los animales serán genotipados. Un total de 100 réplicas fueron usadas para esta simulación.

Población de fundadores en LD. Para simular un genoma en LD, se simuló una población de fundadores usando el algoritmo de mutación-deriva sugerido por Meuwissen et al. (2001). Después, una población inicial de n individuos fue creada como reproductora, donde cada individuo produce dos hijos (un macho y una hembra). El genoma se asumió dividido en diversos cromosomas con loci bialélicos mutando con una tasa dada. Como la población se

desarrolló a lo largo de un número de generaciones, nuevas mutaciones aparecen, y éstas se pierden o aumentan en su frecuencia debido a la deriva. Como resultado obtenemos una población con un genoma con loci segregando en LD. Luego, la población fue expandida para producir la población de los fundadores, la cual es usada para muestrear los haplotipos de los animales base de la población reproductora. Para simular el genoma con un patrón de LD similar a la estructura de las ovejas, nosotros asumimos una población inicial de 100 individuos y la dejamos reproducirse durante 10,000 generaciones. El genoma fue compuesto por 26 cromosomas de 1 Morgan de longitud. Cada cromosoma tenía 500,000 loci bialélicos equidistantes y una tasa de mutación de 10^{-6} . Después de esto, la población en LD se le aplicó tres generaciones de 5X de expansión y finalmente 4,000 de ellos fueron escogidos aleatoriamente para ser la población fundadora y aproximadamente 5,000 loci por cromosoma estaban segregando.

Estructura de la población. La población reproductora asumió generaciones discretas, con 900 individuos (300 machos y 600 hembras) por generaciones. En cada generación, 30 machos y 300 hembras fueron seleccionados y apareados con cada hembra teniendo 3 hijos (un macho y dos hembras). Para todos los individuos se asumió que tenían un registro fenotípico disponible para sus evaluaciones genéticas. La estructura de la población simulada estuvo basada en recrear una población reproductora de ovejas con largas familias paternas y cortas familias maternas. Nótese, que el supuesto del tamaño de camada de tres es irrealista en una población de ovejas, pero éste fue el tamaño mínimo posible para poder asumir generaciones discretas y aún poder tener presión de selección en candidatos de hembras y machos.

Las dos primeras generaciones (G-2 y G-1) fueron asumidas a ser la población de referencia inicial, ya que todos los individuos eran genotipados. Luego, nueve generaciones más fueron simuladas (G0–G8), donde sólo una proporción p de individuos fueron genotipados. El esquema de selección usando el método ssGBLUP comenzó en la generación G0, por lo tanto,

la comparación entre estrategias fue hecha desde la G0 a la G8. Entonces, para un momento determinado de selección utilizando el ssGBLUP, los candidatos disponibles para la selección serían una mezcla de individuos genotipados y no genotipados. Se asume que todos los candidatos están fenotipados.

Arquitectura genética. El genoma fue dividido en 26 cromosomas autosómicos, cada uno con 1,000 loci usados como QTLs afectando al carácter. El genoma de los animales de la población base (es decir, G-2) se simuló mediante el muestreo aleatorio de haplotipos de la población fundadora, y en las siguientes generaciones, el genoma de un animal fue muestreado asumiendo la herencia mendeliana dado el haplotipo de sus padres.

Para seleccionar los loci incluidos en el panel de SNPs y los QTLs, calculamos la frecuencia de todos los loci que estaban segregando en la G0, y dentro de cada cromosoma, seleccionamos 1,100 con los valores más altos de MAF. Luego, 1,000 loci fueron asignados aleatoriamente a ser parte del panel de SNPs y 100 a ser QTLs (es decir, a lo largo del genoma, el panel de chip fue de 26,000 loci y 2,600 fueron QTL afectando al carácter).

La heredabilidad del carácter fue asumida a ser 0.2. El efecto aditivo para cada QTL fue muestreado de una distribución normal estandarizada y el alelo favorable se asignó aleatoriamente con igual probabilidad. El TBV de cada individuo fue calculado como la suma de los efectos de los QTLs, dado sus genotipos y el efecto aditivo. El efecto del QTL fue reescalado para que la varianza genética en G-2 fuera 0.2. El fenotipo de cada individuo fue simulado como la suma de sus TBV y un efecto ambiental asumido a ser distribuido normal con media cero y varianza 0.8.

Evaluación genética y selección. La evaluación genética fue llevada a cabo asumiendo que fue realizada usando el método ssGBLUP, pero también se simularon escenarios donde se comparaba el ssGBLUP con otras metodologías de evaluación (BLUP y GBLUP). Los tres

métodos de selección fueron implementados usando las ecuaciones del modelo mixto de Henderson (Henderson, 1984, 1975).

El modelo lineal asumido es:

$$\mathbf{y} = \mu + \mathbf{Za} + \mathbf{e} \quad [21]$$

Donde \mathbf{y} es el vector de fenotipos, μ es la media global, \mathbf{a} es el vector de valores genéticos poligénicos aleatorios distribuido como $N(\mathbf{0}, \mathbf{G}\sigma_a^2)$, siendo \mathbf{G} la matriz de relaciones genética asociada al método de evaluación y \mathbf{e} es el vector de desviaciones residuales i.i.d. $N(\mathbf{0}, \mathbf{I}\sigma_e^2)$.

Los métodos de evaluaciones BLUP, GBLUP y ssGBLUP son definidos en dependencia de cómo la \mathbf{G} fue calculada. Para el método de evaluación BLUP, se asume que la información genotípica no es conocida y la matriz de relación genética es la matriz relación numerador (\mathbf{A}), calculada usando la información del pedigrí. Para el método GBLUP, todos los individuos incluidos en la evaluación están genotipados y la matriz de relación genética es la matriz relación genómica (\mathbf{G}) calculada usando los genotipos SNPs (VanRaden, 2008). Finalmente, ssGBLUP asume que sólo una proporción de individuos son genotipados, por lo que el cálculo de la matriz relación genética (\mathbf{H}) combina información del pedigrí e información de los SNPs (Legarra et al., 2014b). En este estudio, la matriz \mathbf{G} fue calculada usando el segundo método propuesto por VanRaden (2008), y la inversa de \mathbf{H} fue calculada como la combinación de la matriz \mathbf{A} , que incluía todos los individuos, genotipados y no genotipados, y la matriz \mathbf{G} la cual sólo incluye individuos genotipados. Adicionalmente, a la combinación de ambas matrices, la matriz \mathbf{G} fue ajustada para hacerla compatible con la matriz \mathbf{A} , como $\mathbf{G}_{adj} = a + b*\mathbf{G}$, donde a y b fueron calculadas como en Legarra et al. (2014b).

El esquema de selección simulado asumió múltiples generaciones discretas de selección. Por lo tanto, en una generación dada, la evaluación genética de los actuales candidatos a la selección

fue hecha en un modelo incluyéndolos a ellos más toda la información (fenotípica y genotípica disponibles) de animales de previas generaciones, o sea, la información genotípica y fenotípica incrementan con el número de generaciones.

Para el período de selección (G0-G8), los candidatos fueron seleccionados suponiendo una selección de truncamiento estándar basada en los valores genéticos genómicos calculados usando el modelo lineal descrito anteriormente.

Escenarios comparados. Los escenarios que se compararon aquí incluyeron seis proporciones diferentes de candidatos genotipados y tres estrategias de genotipado utilizadas para seleccionar a esos candidatos para ser genotipados. Adicionalmente, los métodos BLUP y GBLUP fueron también incluidos como equivalentes a la situación donde ninguno o todos los candidatos disponibles eran genotipados y eran considerados como los límites inferiores y superiores, respectivamente, para el desarrollo esperado de los escenarios basados en el ssGBLUP.

La proporción de candidatos genotipados para los diferentes escenarios del ssGBLUP fueron 10%, 20%, 30%, 40%, 50% y 70%, además, del BLUP y el GBLUP, los cuales son equivalentes al 0% y 100%, respectivamente. La misma proporción de candidatos genotipados se realizó en machos y hembras.

Las tres estrategias de genotipado fueron: (i) RANDOM, donde la proporción de candidatos a ser genotipados fueron escogidos al azar de todos los disponibles; (ii) TOP, donde los animales genotipados eran una proporción p de candidatos con los mejores fenotipos; y (iii) EXTREME, donde los animales genotipados eran aquellos con $p/2$ mejores valores fenotípicos y $p/2$ peores valores fenotípicos.

Criterios de comparación. Los criterios de comparación entre los escenarios fueron la ganancia genética acumulativa (g), la fiabilidad (r^2) de los GEBV y la varianza genética retenida (σ_a^2).

La ganancia genética acumulativa fue relativa a G_0 (o sea, el TBV fue ajustado, por lo que la media en G_0 es igual a cero), correspondiendo a la primera generación cuando algunos candidatos no eran genotipados y el ssGBLUP necesitaba ser implementado. La fiabilidad de los GEBV es la correlación al cuadrado entre el GEBV y el TBV en el grupo de candidatos en un momento dado de la selección. La varianza genética retenida en una generación dada es la varianza de los TBV de todos los candidatos nacidos en dicha generación.

Adicionalmente, ya que el BLUP y el GBLUP son equivalentes a los escenarios con 0% y 100% de candidatos genotipados, respectivamente, ellos pueden ser considerados a ser los límites inferiores y superiores del desarrollo esperado de los diferentes escenarios del ssGBLUP. Por lo tanto, nosotros definimos un parámetro denotado como eficiencia (E) para comparar los diferentes escenarios usando el ssGBLUP. Básicamente, E indica el beneficio adicional que se observa en los diferentes escenarios del ssGBLUP sobre el escenario que utiliza el método BLUP expresado como una proporción del beneficio que el GBLUP tiene sobre el BLUP (i.e. $E = \frac{(\text{ssGBLUP} - \text{BLUP})}{(\text{GBLUP} - \text{BLUP})}$). Por lo tanto, cuando $E=1$ esto significa que teniendo una proporción p de candidatos a ser genotipados produciría la misma ganancia extra como cuando todos los candidatos están genotipados. Por lo contrario, cuando $E=0$, esto significa que el ssGBLUP no tiene ventajas sobre la evaluación del BLUP donde ninguno de los candidatos son genotipados.

Resultados y Discusión.

Chapter 1. Accuracy of pedigree and genomic predictions of a small genotyped Spanish National Population of Churra Sheep Breed.

Accuracy of pedigree and genomic predictions of a small genotyped Spanish National Population of Churra Sheep Breed.

Milagros Sánchez-Mayor[†], Pau Navarro[‡], Chris S. Haley[‡], Beatriz Gutiérrez-Gil[†], Luis Fernando de la Fuente[†], Ricardo Pong-Wong[#] and Juan José Arranz Santos^{†*}

[†] Dpto. Producción Animal, Universidad de León, 24071, León, Spain.

[‡]MRC Human Genetics Unit, University of Edinburgh, Institute of Genetics and Molecular Medicine, Western General Hospital, Crewe Road, Edinburgh EH4 2XU, UK.

[#]The Roslin Institute and R(D)SVS, University of Edinburgh, Easter Bush, EH25 9RG, UK.

*Correspondence : Juan José Arranz Santos

jjarrs@unileon.es

Under review by the co-authors.

Abstract

The benefit of genomic prediction to increase the accuracy of the estimates depends, mainly, on the characteristics of the reference population. In large and economically important populations, the choice of the reference population can be optimised to be representative of the target population. In smaller populations with limited resources, however, this may not be possible, and the initial reference population may be created with what it may be available, affecting the benefit of the genomic prediction scheme. The initial impact of implementing genomic prediction in the Spanish Churra sheep breed was measured in six milk production traits when using a training set composed by historical genotyped rams and ewes with suboptimal structure. Using multiple test-day records with the same genetic model currently applied to the Churra breed evaluation, the estimates from the traditional Best Linear Unbiased Prediction (BLUP) method were compared with the estimates from three genomic evaluation methods: Genomic BLUP (GBLUP), deregressed GBLUP (DGBLUP) and single-step GBLUP (ssGBLUP). We used simulations to explain the results observed in the real Churra dataset. The results showed that genomic prediction could provide benefit on the evaluation of genotyped male candidates, but not on female candidates even when they were closely related to the training set. This trend in genotyped female candidates was consistent across all six milk traits considered here. The simulation showed that the LD and structure of the population should be enough for the genomic prediction methods to improve the prediction of genotyped ewes closely related in the training population. Hence, the scheme design may be influencing the results observed in the real dataset, but it does not fully explain it. Another factor affecting the results may be the genetic model used in the current evaluation of the Churra population. Hence, under this model, the initial benefit of implementing genomic prediction in Churra would be restricted to male candidates, and probably, the improvement in female candidates may be

delayed until sufficient genotyped animals are cumulated to form a more optimal training population.

Introduction

Genomic prediction uses highly dense genotyping in the evaluation of animals, to increase the accuracy of the estimated breeding values (EBV) (Meuwissen et al., 2001). Several methods have been proposed, and the factors affecting their prediction have been under study. The most efficient method generally depends on the genetic architecture of the trait as well as the structure, the characteristics and the size of the population of interest. Nowadays, the GBLUP based methods (Garrick, 2007; VanRaden, 2008, 2007) are the most popular, as they have the practical convenience that their implementation is similar to traditional pedigree-based BLUP, with the numerator relationship matrix (A) being replaced by the genomic relationship matrix (G) which is calculated with genotype information (VanRaden, 2008). Furthermore, an useful development of GBLUP is the single-step GBLUP (ssGBLUP), which allows to include information of genotyped and non-genotyped animals on the same analysis, by using a relationship matrix that combines the numerator relationship matrix and the genomic relationship matrix (Aguilar et al., 2010; Christensen and Lund, 2010; Legarra et al., 2009; Misztal et al., 2009).

Many factors affect the accuracy of genomic prediction. Among them, some of the most characterised are the size of the reference population, the genetic relationship between candidates and individuals from the reference population, and the amount of linkage disequilibrium (LD) in the population under selection (Calus, 2016; Habier et al., 2007; Meuwissen et al., 2001; Pszczola et al., 2012; Wientjes et al., 2013). Hence, to ensure maximum benefit from the genomic prediction, the choice of the initial reference population needs to be

optimised, so the required number of animals which are representative of the targeted global population are genotyped and phenotyped.

Genomic prediction has been fully implemented in dairy cattle, poultry, pigs and some major beef cattle breeds (Daetwyler et al., 2010; Hayes et al., 2009a; VanRaden et al., 2009). Similarly, in sheep breeding, genomic prediction has been quickly implemented in several large and economically important breeds/populations (Auvray et al., 2014; Baloché et al., 2014; Bolormaa et al., 2017; Duchemin et al., 2012; Legarra et al., 2014a; Swan et al., 2014), but at a slower rate in less economically important breeds, like the Spanish Churra sheep. One reason for the differences in the level of implementation is the high genotyping cost that makes breeders of smaller breeds less able to afford the initial cost for creating the reference population.

A possible solution would be to create the initial reference population using historical animals which were sampled and/or genotyped for SNP chips for other (research) purposes (e.g. from previous QTL studies (García-Gómez et al., 2013; García-Gómez et al., 2012a)). However, these sets of historical animals may be small and have specific population structures, which could make them suboptimal for their use as the reference population in a genomic prediction scheme. For instance, individuals from large interval mapping studies can be used to create a sizeable reference population. However, because they were based on the analysis of segregation patterns within families, the genotyped animals are generally restricted to a cluster of few (half-sib) families. Similarly, several key sires with a significant contribution of the current gene pool may also be genotyped, but they would generally be ancestors little related from the current population. Hence, the suboptimal characteristics from historically genotyped animals when used as a reference population may have a detrimental effect on the potential benefit of genomic prediction (Calus et al., 2013; Clark et al., 2012; Lourenco et al., 2015; Van Grevenhof et al., 2012; VanRaden et al., 2009).

The Spanish Churra sheep is an autochthonous breed of the Castilla y León northwest region of Spain, which shows a double aptitude based on milk and lamb production (ANCHE, 2019). The National Association of Spanish Churra Breeders (ANCHE) is responsible for the breeding program in the Churra sheep breed, implementing standard BLUP (Henderson, 1975) for their genetic analysis. Over their selection programme, the model of analysis for milk production traits based on test-day records has been optimised and used in the genetic evaluation of this breed. Additionally, the breeding population of this breed includes animals that were part of QTL mapping studies and were genotyped with high-density SNP genotyping arrays. These animals have been used to assess the LD structure of the genome of this breed (Chitneedi et al., 2017; García-Gómez et al., 2012b), and to identify QTLs for traits of economic interest (Atlija et al., 2016; Garcia-Gómez et al., 2013; García-Gómez et al., 2012a). Furthermore, genotype information is also available for a group of sires with a substantial contribution to the current population.

The objective of this study is to assess the potential benefits of genomic prediction in the Spanish Churra breed when using an initial suboptimal reference population composed by historical animals from a previous QTL mapping study. Several GBLUP-type methods were used to predict milk production traits and the accuracy of the genomic prediction was calculated for various groups of candidates. The results were validated with simulations.

Materials and Methods

Phenotypic Data and Pedigree

The phenotypic data used in this study included six traits collected on the Spanish Churra dairy sheep between 1981 and 2016, through the official milk recording system from ANCHE (www.anche.org). The traits were test-day records for: Milk yield (MY, grams), Protein yield

(PY, grams), Fat yield (FY, grams), Protein percentage (PP, %), Fat percentage (FP, %) and Total solids percentage (TSP, %). Each animal had a maximum of four test-day records per lactation per trait.

A quality control (QC) within each trait was performed based mainly on three criteria. Firstly, records with outlier values and missing information on the fixed effect levels (i.e. age, birth and flock) were excluded. Secondly, only records fulfilling the criteria established by The International Committee for Animal Recording (ICAR) were included in the analyses. Thirdly, only animals from flocks connected by artificial insemination (AI) that had a percentage greater than 17% of daughters descended from AI males were included, to avoid estimation problems due to lack of connectedness and paternity problems. Table 1 shows the number of records per trait used in this study. As it can be noticed, the genotyped ewes have higher mean for most traits, showing that genotyping strategies were biased towards the more productive individuals.

The relevant pedigree was constructed for each trait linking all animals with an available phenotypic record for the trait in question. The number of animals included in the individual pedigree files was 107,523 for MY, 87,657 for PP and PY, 87,110 for FP and FY, and 84,094 for TSP.

Genotype Data

The genotyped individuals were historical ewes and rams not belonging to the last generation: most of the genotyped ewes had female descendants with their own records, as well as the genotyped males (see Table 2). A total of 1,902 individuals were genotyped with the Illumina OvineSNP50 BeadChip. The genotyped individuals belonged to two groups: a group of 1,667 ewes born between 1999-2008 and a group of 235 rams born between 1986-2015 (see Table 2). The ewes came from 16 half-sib families (García-Gómez et al., 2013; García-Gómez et al., 2012a) with available records for all traits. At the moment of this study among the 235 rams

available, 219 rams had daughters with phenotypic records, and 16 rams did not. All the genotyped rams were used for AI within the selection scheme of ANCHE, and all the genotyped ewes were obtained by AI.

A QC of the genotypic data was performed using PLINK software (Purcell et al., 2007). The following criteria were applied in two steps: (i) the per-individual QC step excluded the individuals with more than 10% missing genotypes; (ii) the per-marker QC step excluded the markers that did not pass the following filters: a genotyping rate lower than 95%, a minor allele frequency (MAF) lower than 0.05, and a deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) at a P-value < 0.00001. SNPs on the sex chromosomes and with unknown positions were not included in the analyses. After QC, 43,909 autosomal SNPs from the original 54,241 genotyped SNPs in the raw dataset remained available for analysis.

Heritability and Calculation of Corrected Phenotype

Univariate Restricted Maximum Likelihood (REML) analyses were carried out on the different traits (MY, PY, FY, PP, FP, TSP) to calculate their heritabilities. Thereafter, Best Linear Unbiased Prediction (BLUP) model (Henderson, 1984, 1975) was performed using the estimated heritability to calculate the estimated breeding values (EBV) and to adjust the corresponding corrected phenotypic values (y^*) for all the environmental effects included in the model. All REML analyses were carried out using the ASREML Software Version 4.1 (Gilmour et al., 2014).

The REML and BLUP analyses were done assuming a repeatability model to account for the individual permanent environment effect as well as their polygenic effects. The full model used in each of the traits is:

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xb} + \mathbf{Zu} + \mathbf{Pp} + \mathbf{Ft} + \mathbf{Dd} + \mathbf{e} \quad [1]$$

where \mathbf{y} is the vector of the test-day observations for the trait in question; \mathbf{b} is the vector of fixed effects including the mean; \mathbf{u} is the vector of random additive polygenic effects for each animal distributed as $N(\mathbf{0}, \mathbf{A}\sigma_u^2)$, with \mathbf{A} being the numerator relationship matrix calculated using pedigree information; \mathbf{p} is the vector containing the random permanent environment effects of the ewe; \mathbf{t} is the vector of random environmental effects for flock test-day; \mathbf{d} is the vector for the random effects for the non-linear spline coefficients for days in milk, and \mathbf{e} is a vector of independent and identically distributed (i.i.d.) residual effects. The matrices \mathbf{X} , \mathbf{Z} , \mathbf{P} , \mathbf{F} and \mathbf{D} are incidence matrices relating the observations \mathbf{y} to their respective effects. The fixed effects included in \mathbf{b} were: number of born lambs, age at parturition or control date, days in milk and parity number. All of them are categorical variables, except days in milk treated as continuous.

The corrected phenotype was calculated as: $\mathbf{y}^* = \mathbf{y} - \mathbf{X}\hat{\mathbf{b}} - \mathbf{P}\hat{\mathbf{p}} - \mathbf{F}\hat{\mathbf{t}} - \mathbf{D}\hat{\mathbf{d}}$. Basically, the corrected phenotype will contain only the polygenic breeding values and residual deviation (i.e. $\mathbf{y}^* = \mathbf{Z}\hat{\mathbf{u}} + \hat{\mathbf{e}}$).

The model described in [1] is similar to the one used by ANCHE for the genetic evaluation of the entire Spanish Churra population, with the only difference on how the effect of lactation period is accounted in the model. Here this was done by using a non-linear spline regression on days in milk after parturition, while for the Spanish Churra evaluation, this is done by adding a categorical effect on weeks after parturitions (Luis Fernando de la Fuente, personal communication). Preliminary results showed that the estimated breeding values and the corrected phenotypes were the same when using both ways of including the effect of lactation period on the model (results not shown).

Genetic Prediction Methods

The benefit of including genomic information on the genetic evaluation was assessed by quantifying the accuracy of the breeding values estimated with three different genetic evaluation methods using genomic information and comparing them with those from standard BLUP. The three genomic evaluation methods used here (i.e. GBLUP, DGBLUP and ssGBLUP, which are described below) are variants of the standard BLUP modified to include genomic information. All evaluation methods were implemented using the ASREML Software Version 4.1 (Gilmour et al., 2014).

Standard BLUP. The standard BLUP method does not use genomic information, but instead, pedigree information is used to calculate the genetic relationship between animals (\mathbf{A}). The model implemented with BLUP is:

$$\mathbf{y}^* = \mu + \mathbf{Z}\mathbf{a} + \mathbf{e}^* \quad [2]$$

where \mathbf{y}^* is the vector of corrected test-day phenotype, μ is the overall mean, \mathbf{a} is the polygenic breeding value vector distributed as $N(\mathbf{0}, \mathbf{A}\sigma_a^2)$, and \mathbf{e}^* the vector of i.i.d. residual deviations. Note that the polygenic effect \mathbf{a} is basically, the same effect \mathbf{u} in equation [1] (in fact the correlation between $\hat{\mathbf{a}}$ and $\hat{\mathbf{u}}$ is higher than 0,98 when both analyses use the same information, results not shown). Here, they were labelled differently to make it clear that the estimated breeding values used to calculate the deregressed phenotypes are the ones calculated with the corrected phenotype using equation [2]. Deregressed phenotypes are used as the records in a genomic method described below.

In this study, BLUP was implemented using either (i) the available corrected test-day records for all animals (minus the validation group) included in the pedigree; or (ii) only the corrected test-day phenotypes from the group of genotyped ewes (minus the validation group). In both cases, the numerator relationship matrix (\mathbf{A}) was calculated using all pedigree information, and

breeding values estimates were obtained for all the animals included in the pedigree regardless their phenotypic records are included in the analysis or not.

Genomic BLUP (GBLUP). The GBLUP method (Meuwissen et al., 2001; VanRaden, 2008) is similar to BLUP, but the relationship matrix among individuals is calculated using genotypic information. Hence, the model for GBLUP is:

$$\mathbf{y}^* = \mu + \mathbf{Zg} + \mathbf{e}^* \quad [3]$$

where \mathbf{y}^* , μ and \mathbf{e}^* are the same as described in [2] and \mathbf{g} is the genomic breeding value assumed to be distributed $N(\mathbf{0}, \mathbf{G}\sigma_g^2)$. The matrix \mathbf{G} is the genomic relationship matrix among genotyped individuals calculated with SNP genotypes using the “method 2” from VanRaden (2008). The genomic relationship between individuals j and k equal to $\frac{1}{m} \sum_{i=1}^m [(x_{j,i} - 2p_i) * (x_{k,i} - 2p_i)] / (2p_i(1 - p_i))$, where $x_{j,i}$ ($x_{k,i}$) is the genotype score of individual j (individual k) at locus i (i.e. assuming A being the reference allele, $x=0, 1, 2$ for individuals with genotype aa, Aa and AA, respectively); p_i is the frequency of the reference allele at locus i and m the number of SNPs used to calculate \mathbf{G} . As GBLUP uses the \mathbf{G} matrix for modelling the breeding values, it calculates EBVs only for the group of genotyped animals. Similarly, to the BLUP analyses, the GBLUP allows for individuals having multiple records. The generalised Moore-Penrose inverse of \mathbf{G} matrix was used as input for ASREML to calculate variance components and GEBVs (Ben-Israel and Greville, 2003).

Deregressed GBLUP (DGBLUP). The DGBLUP method estimates the genomic breeding values by implementing a weighted mixed model on deregressed corrected phenotypes, which are weighted to account for the difference in the accuracy of the EBVs with which they were estimated. The method is similar to GBLUP in the sense that the analysis includes only genotyped individuals and their \mathbf{G} matrix to estimate their $\hat{\mathbf{g}}$. However, the information from

non-genotyped individuals is also accounted for as they were used *a priori* to calculate the (deregressed) breeding values (an approach which is sometimes referred to as the two-stage GBLUP). The DGBLUP assumes that individuals have one record only (or none if it belongs to the validation group). The model for DGBLUP is:

$$\tilde{\mathbf{y}} = \mu + \mathbf{Z}\mathbf{g} + \tilde{\mathbf{e}} \quad [4]$$

where $\tilde{\mathbf{y}}$ is the vector of deregressed breeding values, \mathbf{g} is a vector of genomic breeding value distributed as in [3], $\tilde{\mathbf{e}}$ is a random vector of residual effects distributed as $N(\mathbf{0}, \mathbf{W}^{-1}\sigma_{\tilde{\mathbf{e}}}^2)$, and \mathbf{W} being a diagonal matrix where the diagonal elements are the weights given to the deregressed breeding values.

The deregressed breeding values ($\tilde{\mathbf{y}}$) and their weight (\mathbf{w}) were calculated using a variant of the method proposed by Garrick et al. (2009). Assuming that the estimated breeding value ($\hat{\mathbf{a}}$) was obtained independently, the deregressed breeding value is $\tilde{\mathbf{y}} = \hat{\mathbf{a}}/r^2$, where r^2 is the reliability of $\hat{\mathbf{a}}$ equal to $r^2 = 1 - \frac{PEV}{Var(a)} = 1 - \frac{se^2}{Var(a)}$. However, Garrick et al. (2009) highlighted that such estimate would “double count” information when the DGBLUP includes $\tilde{\mathbf{y}}$ from an individual and its parents calculated with $\hat{\mathbf{a}}$ obtained from the same BLUP analysis. To avoid such potential source of bias, they proposed a method to remove the parent-average effects from $\tilde{\mathbf{y}}$. Here we extended their method to account for when the individual or its parents are inbred and also when only one parents has its $\tilde{\mathbf{y}}$ included in the DGBLUP. The method is described in Supplementary Material Appendix 1.

The weight for the deregressed breeding value was calculated as: $w_i = \frac{1-h^2}{\left[c + \frac{1-r_i^2}{r_i^2}\right]h^2}$, where h^2 is

the heritability obtained with the BLUP model using the information of all available ewes in the pedigree and c is the fraction of genetic variance not explained by SNP genotypes (i.e. the

missing heritability). The value for c was calculated empirically using the estimated genetic variance from the BLUP and GBLUP models using only phenotypes of the genotyped ewes so $c = \frac{\hat{\sigma}_{a_{BLUP}}^2 - \hat{\sigma}_{g_{GBLUP}}^2}{\hat{\sigma}_{a_{BLUP}}^2}$. If the c estimate was negative, it was rounded to zero, meaning that the SNPs fully explain all the genetic variance for the trait in question. The c values were 0 (MY), 0.3318 (PY), 0 (FY), 0.2443 (PP), 0.0263 (FP) and 0.2005 (TSP).

Single-Step Genomic BLUP (ssGBLUP). The ssGBLUP method allows integrating phenotypic information of both genotyped and ungenotyped individuals in a single evaluation process. This is done by modelling the genetic effects with a genetic relationship matrix which combines both pedigree and genotype information (Legarra et al., 2014b, 2009; Misztal et al., 2009). In addition to ssGBLUP evaluating genotyped and ungenotyped candidates in a single analysis, it also allows the genotype information to propagate across the pedigree so potentially improving the accuracy of the EBVs of ungenotyped candidates (Legarra et al., 2014b). The model used for ssGBLUP is:

$$\mathbf{y}^* = \mu + \mathbf{Z}\mathbf{h} + \mathbf{e}^* \quad [5]$$

where \mathbf{y}^* , μ and \mathbf{e}^* are the same as described in [2]; \mathbf{h} is the vector of genomic breeding values assumed to be distributed as $N(\mathbf{0}, \mathbf{H}\sigma_h^2)$, and \mathbf{H} is a relationship matrix which combines pedigree and genotype information. Here we will only provide a quick description for \mathbf{H}^{-1} , which is the one needed to solve the relevant mixed model to estimate $\hat{\mathbf{h}}$. A more detailed description of the \mathbf{H} and its inverse can be found in Legarra et al. (2014b).

Assuming the pedigree be sorted so genotyped individuals are the last ones:

$$\mathbf{H}^{-1} = \mathbf{A}^{-1} + \begin{bmatrix} \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & (\mathbf{G}^{*-1} - \mathbf{A}_{22}^{-1}) \end{bmatrix}$$

where \mathbf{A}_{22}^{-1} is the inverse of a submatrix of \mathbf{A} including the genotyped animals only, and \mathbf{G}^* is the adjusted genomic relationship matrix to have the same scale and base as \mathbf{A}_{22} (Vitezica et al., 2011). Hence, $\mathbf{G}^* = \alpha + \beta\mathbf{G}$, where α and β are chosen so the mean for all elements of \mathbf{G}^* and \mathbf{A}_{22} are the same, as well as the mean of their diagonal element are also the same. The inverse of \mathbf{G}^* was the Moore-Primrose generalise inverse (Ben-Israel and Greville, 2003).

Targeted candidate groups

In this study, the available training population was composed of a set of 1,667 historical ewes from 16 half-sib families and a set of 235 tested sires. Because these animals are very distant from the youngest individuals considered in this study, we tested the value of using this training population to improve the EBVs of four different targeted (ewes or rams) candidate groups using the same test-day genetic model applied by ANCHE in their genetic evaluation. For each targeted candidate group, we estimated their GEBVs assuming that they or their offspring do not have phenotypic information available, and calculated their quality as their ability to predict their corrected test-day record \mathbf{y}^* , which was not used during the evaluation. The results from the different genomic methods were compared with the EBVs using standard BLUP. For each targeted candidate group, we used a 5-fold cross-validation (CV) approach. Briefly, the animals from a targeted candidate group were divided into five groups, and one of them assumed to be the validation one. Phenotypic information from the validation group is removed, and the genetic evaluation is performed to estimate their breeding values, with their quality assessed as the Pearson's correlation coefficient between their unused corrected test-day record (\mathbf{y}^*) and GEBVs. The same process was repeated on the four other groups, and the average value for the Pearson's correlation was calculated. This protocol was used for the different targeted candidate groups and for the six production traits.

Here, the targeted candidate groups under study were:

(i) Genotyped ewes half-sibs of genotyped ewes in the training population. This group of candidates were part of the 1,667 ewes belonging to the 16 genotyped families, and the aim was to assess the ability to predict female candidates which have genotyped half-sibs in the training population. To create the groups for the CV study, each of the 16 half-sib families was randomly divided into five groups of equal size and assigned to each validation group, so ensuring that each of the 16 families has equal representation in each group, so they were always represented in the training population. For this group of candidates GBLUP, DGBLUP and ssGBLUP were considered and the value of their GEBV to predict y^* was compared with that when using the estimate obtained with standard BLUP. Ewes which were part of the validation group and their female offspring have their phenotypic test-day records removed from the genetic evaluation.

(ii) Ungenotyped ewes offspring of genotyped rams. This candidate group consisted of offspring from the 235 genotyped rams, excluding those ewes from the 16 families where the 1,667 genotyped ewes belonged. This scenario aimed to assess whether the genotype information of rams propagates to their non-genotyped daughters and improves their EBVs. As in the previous targeted group, daughters from a genotyped ram were equally divided and assigned to each of the five validation groups. In order to ensure the precision of the prediction was accurate, only daughters with more than 10 test-day records were used in the CV study. Similarly, the phenotypic records from ewes in the validation group and their offspring were not included in the analysis of this specific validation group.

(iii) Youngest ewes in the pedigree. The aim of assessing this candidate group was to assess the impact of having very old animals as the training population in a forward prediction scenario. The ewes selected for this targeted group of candidates were 1,667 ewes from the latest years with no direct relationship with the genotyped ewes. Similarly, only ewes with a minimum of 10 test-day records were used in the CV study. Still, these phenotypic records were excluded from the evaluation for ewes, which were part of the validation group.

(iv) Genotyped rams. The aim to study this target candidate group was to assess the value of using this historical population as training to predict the performance of genotyped untested rams, i.e., rams without genotyped offspring. The 219 rams (excluding the 16 rams' parent of the 16 genotyped families) were divided and assigned to each of the five validation groups. To mimic the situation of the genetic evaluation of untested rams, phenotypic records of all offspring and grand offspring from rams being validated were eliminated. Because the rams do not have phenotypic records, the GEBVs obtained for the validated rams were compared with the EBVs estimated from the BLUP model assuming all information available. Hence, the results on the absolute magnitudes from rams and ewes should not be directly cross-compared, but the comparison of the benefit of the genomic prediction methods relative to BLUP is valid.

Simulation Study

Two simulation studies were carried out to aid with the understanding and interpretation of results observed in the real data from the Churra population.

Simulation Study 1: The objective of this simulation study was to assess whether the SNP genotype array panel used in the Churra population has enough information to improve genetic prediction. Here, phenotypic records were simulated based on the real genotype information available for the 1,667 ewes. A total of 500 randomly selected SNP from the genotype array panel were assumed to be QTL and assigned an additive effect sampled from a normal distribution. The total breeding values for each genotyped ewe was calculated by summing the effects of all QTLs, and rescaled, so their variance matches the targeted genetic variance. Thereafter, phenotypes were simulated for each ewe by adding an environmental deviation to the total breeding value. The number of phenotypic records simulated for each ewe is the same as the one observed in the real data. Because this approach simulates data only for the genotyped

individuals, they were used to compare the performance of BLUP and GBLUP when the prediction is made on genotyped candidates which are half-sibs of the training animals.

Simulation study 2: The objective of this study was to evaluate the effect of the Churra data structure on the benefit of genomic selection. The simulation was designed to mimic the same pattern of pedigree, phenotype and genotype information of the Churra real dataset; and the comparison of methods was done using the targeted candidates used on the real data.

The pedigree of the Churra population was used as input and genotypes were simulated for each individual by (i) sampling the genotypes of the founders (with unknown parents) using a mutation-drift equilibrium algorithm (Meuwissen et al., 2001); and then (ii) a gene dropping approach to simulate the genotypes for the rest of the individuals (with known parents) in the pedigree. Briefly, an initial historical population (all fixed for the same alleles) was allowed to evolve, with individuals randomly mated to produce the next generation. Offspring's genotypes were sampled given Mendelian inheritance rules, allowing for mutation events to produce new variants and drift to drive their loss or change in frequency. The process was repeated over several generations until the LD pattern of the simulated genotypes reached an equilibrium. Thereafter, the historical population was continued for several generations of expansion, and animals from the last generation were chosen to be as the founder animals of the Churra pedigree. Finally, the genotypes of the non-founder animals in the Churra population were sampled using gene dropping approach.

To mimic the same LD observed in the Churra population, the following assumptions were taken: (i) the historical population was of size 200 (100 males, 100 females); (ii) the genome was divided in 26 autosomal chromosomes, each with 500,000 equidistant SNP; (iii) the mutation rate was 1×10^{-6} ; (iv) the historical population evolved for of 10,000 generations; (v) the expansion period ran for 4 generations, with the population growing 5X per generation and

the last 13,000 individuals selected as the founder animals of the Churra pedigree. After the genotype was sampled for the entire pedigree, 2,000 and 100 segregating SNP with $MAF > 0.05$ per chromosome were randomly chosen to be part of the SNP panel and QTL, respectively (i.e. the total number of loci in SNP panel and QTL were 52,000 and 2,600, respectively).

The additive effect of each QTL was randomly sampled from a normal distribution and the total breeding values calculated as the sum of all QTLs, which later were rescaled, so their variance in the founder animals is equal to the targeted genetic variance. Thereafter, phenotypes were simulated by adding an environmental deviation to the total breeding value (the same number of phenotypic records observed in the real dataset was simulated for each ewe).

Results

Variance Component Estimates

Table 3 shows the heritability and repeatability estimates for all traits. The heritability and repeatability estimates were very similar; regardless they were calculated using all data or only those from genotyped animals. All heritabilities were low to moderate, with the lowest estimates being for traits FP and FY. The repeatabilities were moderate for all traits except for FP and FY.

Benefit of genomic prediction in the Churra dataset

The performance of the genomic prediction in the Churra dataset was assessed on three ewe groups varying on their degree of relationship with the training population and a set of genotyped rams. The criterion used to measure the quality of the estimates on the ewe groups was the Pearson's correlation between the EBV/GEBV ($\hat{\mathbf{a}}$, $\hat{\mathbf{g}}$ or $\hat{\mathbf{h}}$) and the corrected test-day records (\mathbf{y}^*). For the genotyped rams, the criterion was the Pearson's correlation between the

GEBV/EBV obtained when the rams are tested (i.e. $\hat{\mathbf{u}}$, their daughters' phenotypes are included in the evaluation) and that obtained when they are untested (i.e. $\hat{\mathbf{a}}$, $\hat{\mathbf{g}}$ or $\hat{\mathbf{h}}$, estimates for the rams in the validation group, so their daughters' phenotype are not included in the evaluation).

Performance of genomic prediction in ewes. The quality of the prediction on the ewe groups is shown in Table 4. As expected, when comparing among similar methods, the genetic evaluations carried out with the information of the entire Churra dataset was always more accurate than evaluations done using only data from the genotyped training ewes belonging to the 16 families. For the set of female candidates which are half-sibs of the genotyped training ewes, there was a relatively small gain in the precision of their GEBV, when the information used in the evaluation was restricted to the training ewes' test-day records. Across the six traits, the improvement (in term of increase the GEBV accuracy of the GBLUP relative to BLUP) ranged between 1% and 7.5% observed in MY and PY, respectively. However, when the information used in the evaluations was from the entire Churra dataset (excluding records from validated ewes and their daughters), the methods using genomic information had not advantage over BLUP. In fact, in this group of female candidates, the quality of their prediction was unexpectedly worse than BLUP prediction. The correlation between GEBV and corrected phenotypes were between 8.2% and 22.6% lower in DGBLUP, and between 0% and 6.4% lower in ssGBLUP than the correlation observed with EBV from the standard BLUP evaluation. Whilst the poorer performance of ssGBLUP relative to BLUP is just marginal, this was not the case for DBGLUP, which yielded GEBVs with substantially lower ability to predict the unobserved phenotype. It is a common opinion that the use of deregressed EBV in a weighted GBLUP analysis allows to incorporate information from ungenotyped animals and further improve the accuracy of GEBVs of genotyped animals. For the Churra dataset, it seems that this approach incorporates little extra information from ungenotyped ewes, so the performance

of DGBLUP is more in line with that observed with the GBLUP, where only records from the genotyped training population are used.

Furthermore, the methods using genomic information did not improve the GEBV of ewes belonging to the other two groups of female candidates. The correlation between the predictions and the unobserved corrected phenotypes were the same in the ssGBLUP and BLUP, suggesting that genomic information did not propagate across the pedigree to have an impact on the prediction of ungenotyped animals.

Performance of genomic prediction in genotyped rams. Contrary to the trend observed with female candidates, the genomic prediction methods improved the GEBV of genotyped rams (Table 5). When the information used in the evaluation was restricted to test-day records from daughters of training rams, the GEBVs were between 15% and 150% more accurate than those obtained with standard BLUP. Using the information of the entire Churra dataset (but excluding records from daughters and granddaughters of validated rams), ssGBLUP is around 50% more accurate than BLUP across the six traits considered in this study.

Benefit of Genomic prediction in the simulated data

In order to understand the results obtained on the Churra dataset, two simulation studies were carried out. The first study aimed to test whether the LD pattern in the genotypes of the historical ewes had useful information to improve prediction when used as a training population. This was done by simulating phenotypic records based on the available genotype information from 1,667 training ewes. The second simulation study aimed at evaluating the effect of the Churra population structure on the prediction. For this purpose, the data was simulated mimicking the same pedigree, and pattern of phenotypic and genotypic information available in the real data (see Material and Methods) and then, they were analysed with the

same evaluation methods to calculate GEBV for the four groups of candidates considered in the real Churra data.

Simulation study 1. The results of the simulation study 1 are shown in Table 6. They are based on ten replicates for each trait using the same polygenic and environmental variance of the real data. Similar to the analysis of the Churra dataset, GBLUP improved the prediction with respect to BLUP in all traits considered in the simulations. However, the relative advantage over BLUP was substantially higher than that observed in the analysis of the real Churra dataset. Overall, the average benefit of GBLUP over BLUP in the simulated data was between 27.2% and 32.9% (for TSP and MY, respectively) compared with the 1% and 7.5 % (for MY and PY, respectively) extra advantage observed in the real dataset (see Tables 4 and 6).

Simulation study 2. The results of the simulation study 2 are shown in Table 7 for the three groups of female candidates. The results are the average of ten replicates. Similarly, as observed in the analysis of Churra real dataset, the inclusion of all information available in the population yields more accurate predictions than when using only the records from genotyped training animals. But, this added advantage of including records from ungenotyped ewes was much lower with the genomic methods. The advantage of adding the extra data from ungenotyped ewes with BLUP yielded EBVs with 19% to 33.9% of increased accuracy. This added benefit was much lower with genomic, where GEBVs obtained with ssGBLUP is between 2.3% and 8.5% more accurate than GEBVs from GBLUP. This difference has an impact on the benefit of using genomic data in the genetic evaluation. When considering the group of genotyped female candidates, GBLUP evaluation with records from genotyped training ewes ranged between 49.4% and 64.6 %, compared with the 27.2% to 39.8% extra benefit of ssGBLUP relative to BLUP using all available information. However, regardless the evaluation is done using records from genotyped training ewes only or using all available in the population (from genotyped and ungenotyped ewes), the benefit of using genomic information in the simulated

data was substantially higher than that observed in the Churra dataset. Additionally, when comparing the results from the other two groups of ungenotyped female candidates, ssGBLUP yielded slightly more accurate GEBV than BLUP, but the added advantage was just marginal to be of practical value. The added accuracy of ssGBLUP for ungenotyped daughters of genotyped rams was between 0.32% and 1.4% higher than BLUP; and the accuracy of the youngest ungenotyped ewes was only 0.7% to 1.6% more accurate with ssGBLUP. Another interesting observation in the results for the female candidates is that the accuracy of DGBLUP was more similar in magnitude to the GBLUP evaluation using information from genotyped training ewes only than to those observed with ssGBLUP using all data available. This suggests that either: (i) the method of using deregressed EBV does not incorporate much information from the ungenotyped animals as previously thought; or (ii) the fact that genotyped training animals have multiple records means that there is enough information in these animals so little to gain from adding extra information of ungenotyped individuals to improve the prediction of female candidates.

Table 8 shows the results for the group of genotyped ram candidates based on an average of 10 simulations. Similarly, as in the Churra dataset, the results from the simulation show a substantial increase in the accuracy of the predictions when using genomic data relative to the BLUP evaluation. Furthermore, the comparisons show that the accuracy of the predictions observed from the simulations was much higher in magnitude than that found in the Churra real dataset, but for the relative advantage over BLUP (i.e. the benefit), the values were more comparable (see Tables 5 and 8).

Discussion

In this study, we have evaluated the initial impact of implementing genomic prediction in the Spanish Churra population using: (i) the same test-day genetic model currently used by ANCHE

for the breed evaluation of six production traits; and (ii) a suboptimal training set created from a group of historical ewes (from few families) and rams which were sampled/genotyped for other research purposes. We have used simulation to explain the results observed in the real Churra dataset.

A relatively large set of the Churra population was used. The information available across the six milk traits ranged between half and one million test-day records, collected on 67,053 to 96,357 ewes over 28 years. The number of genotyped animals were, however, more modest with only 1,667 ewes from 16 half-sib families which were used in a previous QTL mapping study (García-Gómez et al., 2013; García-Gómez et al., 2012b), and 235 widely used AI rams.

A quick inspection on the trait raw means values shows that the genotyped ewes were more productive than the average of the population (i.e. they produced 11% extra milk, protein and fat yield. See Table 1). The heritability estimates, however, were the same regardless they were calculated using the data from the whole population or from only the genotyped ewes (the maximum difference between the heritability estimates with either subset was up to 0.029). These estimates were also very similar to those reported in previous studies carried out in the Churra dairy sheep population (el-Saied et al., 1998; Othmane et al., 2002a, 2002c, 2002b). Moreover, the heritability estimates on the subset of genotyped animals calculated with the GRM matrix showed that the genomic information in the SNP chip captures most of the genetic variation explained by the pedigree information (see the proportion of variance not explained by SNPs in Methods section). Hence, the genotyped ewes were elite animals, but they display similar genetic architecture about the traits as the whole population does, which may justify their use as the training set for implementing genomic evaluation in the Churra population.

Here we found that genomic prediction can provide benefit on the evaluation of Churra male candidates. The results from the 5-fold cross-validation study showed a substantial increase in

the GEBV accuracy of the 235 genotyped rams relative to that observed with standard BLUP. This was the case when the evaluation was carried out using phenotypic records from either (i) daughters of genotyped training rams (with GBLUP) or (ii) all ewes in the Churra population under study (with ssGBLUP). The benefit when using information from only daughters of training rams was very variable across the different traits ranging from 15% to 150% extra accuracy relative to BLUP, but they are in line to what has been reported in the literature with a training population size of the order of hundreds. The accuracy for PP was 0.549, which is comparable with those found in French Lacaune sheep with 681 rams using GBLUP (0.56) or Bayes $C\pi$ (0.57) (Duchemin et al., 2012). The accuracy for PY (0.536) was lower than this obtained in dairy cattle of 0.69 (Hayes et al., 2009b), and the value of 0.375 for MY is slightly lower than that reported in Lacaune sheep using GBLUP (0.42) and Bayes $C\pi$ (0.44) (Duchemin et al., 2012). The benefit of ssGBLUP when using information from all the Churra ewes included in the study (but excluding those from daughters and granddaughters of validated rams) ranged between 49.7% and 52.5% across the traits. The accuracies observed here for MY, PP and FP (0.723, 0.813 and 0.828, respectively) were slightly higher than the of 0.47, 0.70 and 0.71 observed by Baloché et al. (2014) in French Lacaune sheep.

However, the trend in the GEBV accuracy observed in the genotyped rams was not the same when predicting any of the three groups of female candidates. For closely related genotyped females, which were half-sibs to the training animals, the genomic prediction methods had an almost negligible benefit on the accuracy when the phenotypic information used in the evaluation were from genotyped training animals only (i.e. BLUP vs GBLUP). This very minor benefit disappeared when the prediction was made using all information from genotyped, and ungenotyped animals in the population studied here (BLUP vs ssGBLUP/DGBLUP). The results for the other two groups of ungenotyped female candidates showed no gain or loss in the accuracy; regardless they were closely- or distant-related (i.e. the group of daughters of

genotyped rams or the youngest females in the pedigree). This indicates that the genotype information does not propagate across the pedigree to have an impact on the GEBV of ungenotyped animals (at least on the female ones).

Studies showing that genomic prediction does not improve the accuracy of GEBV have been reported in the literature. Clark et al. (2012) measured the benefit of genomic prediction for several traits in Merino sheep considering three groups of animals with different relationships: close, distant and unrelated. They observed that for a close relationship, the empirical benefit of GBLUP over BLUP was negative for ultrasound scanned eye muscle depth, however it was positive and high for live weight at ultrasound scanning. In a study with multiple breeds and several traits, lower accuracies with the genomic prediction for some traits were also observed (Daetwyler et al., 2012). In the Merino breed, the genomic prediction in eye muscle depth, carcass fat depth and hot carcass weight had lower or equal accuracies to those obtained with the traditional BLUP. The Border Leicester breed had higher precisions with pedigree-based predictions than when using the genomic methods in several traits (0.05 versus -0.05 and -0.01 for hot carcass weight and 0.11 versus 0.01 and -0.01 for docosapentaenoic acid). When the adjusted phenotypes were analysed, the genomic information failed to improve prediction in Border Leicester and Polled Dorset. For the trait dressing percentage, the Border Leicester breed had an accuracy from pedigree equal to 0.28 and for the genomic methods of 0.20 (GBLUP) and 0.22 (BayesR). For the trait eicosapentaenoic acid, the pedigree evaluation accuracy was 0.18 for Polled Dorset breed, and the genomic accuracies were 0.17 (GBLUP) and 0.15 (BayesR). A study in Spanish and French dairy sheep tended to show better accuracy with ssGBLUP than with BLUP, except for the Latxa Cara Negra Euskadi breed where the accuracy of the genomic prediction in the milk yield trait was 0.19 versus 0.34 observed pedigree-based accuracy (Legarra et al., 2014a).

Here we evaluated the benefit of genomic prediction on three different groups of female animals, including the youngest ungenotyped ewes, which would represent the set of candidates for the current round of selection. A more interesting finding is the outcome when assuming this set being genotyped, but unfortunately, this was not possible to assess because the available genotyped animals in this study were historical ewes only. However, considering that the genomic prediction methods using this training population failed to improve the GEBV accuracy for genotyped half-sibs of the training animals, it is also unlikely that it would happen on more distantly related ewes.

The lack of benefit reported in the literature tends to be restricted to some traits only, but interestingly, in this study, the genomic prediction did not improve the accuracy of female candidates in all six traits considered. This raises the question on whether the outcome observed here may be related to more general attributes in the design of the scheme or to the genomic properties of the Churra population rather than specific characteristics on the genetic architecture of the traits themselves. We performed simulations to test such hypotheses.

A possible reason why the lack of benefit in females could be the level of LD in the SNP chip used here. Low LD level would result in the genotyped SNP not capturing the effect from linked QTLs and the genomic prediction having low accuracy in all traits. The results from the simulation study 1 showed that GBLUP improves the accuracy of genotyped females which are half-sibs of the training animals when data is simulated using the real SNP genotype information from these animals. The relative advantage of GBLUP over BLUP ranged between 23% and 32% of extra accuracy, compared with 1% to 7.5% observed in the Churra dataset for the same analysis. This substantial benefit observed in the simulated data suggests that the level of the LD pattern in the Churra population should be suitable to yield extra benefit in the accuracy of female candidates (at least when the genomic prediction is implemented using only information from genotyped ewes).

Another factor influencing the results is the design of the scheme, characterised by a suboptimal structure for the training population (i.e. half-sibs from few families) and their position within the whole Churra population (i.e. historical animals). Mimicking the same pedigree, genotypic and phenotypic data structure of the Churra dataset, the results from the simulation study 2 showed that GEBVs for the genotyped female candidates using ssGBLUP has greater accuracy than the prediction using BLUP. The ssGBLUP accuracy for the other two sets of ungenotyped ewes showed just a marginal improvement relative to the BLUP accuracy, so either propagation of the genotypic information across the pedigree does not occur or it is too small to have a practical impact. The results from the simulation study 2 also confirmed that GEBVs from genotyped rams have higher accuracy with ssGBLUP than BLUP. Hence, the scheme design may be influencing the results observed in the real dataset, but it does not fully explain it.

An important characteristic from this study is that the genetic evaluations were carried out using multiple test-day records as it is done by ANCHE in their routine evaluation of the Churra population, where the lactation curve is modelled at the phenotypic level with the genetic merit assumed to be the same across the lactation length. Since the simulated data were created with this assumption, and if this were not to be the true model for the real data, it would be reasonable to believe that this is the cause for their discrepancies in predicting the unobserved ewes' test-day records. However, the prediction of unobserved records in the real dataset was made on corrected phenotypes (y^*), which were reconstructed assuming a single genetic merit regardless when the test-day record was collected within the lactation. Hence, a true genetic model with genetic effects varying across the lactation length should not be the cause for the differences observed on the results obtained with the simulated and the real dataset. Further studies are still required to determine if genomic prediction methods would improve the prediction of unobserved test-day phenotypes when fitting a model accounting for the lactation curve at the genetic level.

The initial implementation of genomic prediction in the Churra population using a training population composed of historical genotyped animals with suboptimal structure will yield immediate improvement in the GEBV accuracy of male candidates only. Probably the improvement in female candidates may be delayed until sufficient genotyped animals are cumulated to create a more optimal training population.

Conclusions

The results from this study show that the initial implementation of genomic prediction in the Churra population using this suboptimal training population of historical genotyped ewes and rams will improve the genetic prediction of male candidates but not that of female ones. The incorporation of information from ungenotyped animals using ssGBLUP yielded a substantial extra benefit compared to using the information of genotyped animals only. However, the genomic information from genotyped individuals does not propagate across the pedigree with ssGBLUP to have a positive impact on the GEBV accuracy of the ungenotyped animals.

References

- Aguilar, I., I. Misztal, D.L. Johnson, A. Legarra, S. Tsuruta, and T.J. Lawlor. 2010. Hot topic: a unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score. *J. Dairy Sci.* 93:743–52. doi:10.3168/jds.2009-2730.
- ANCHE, 2019. Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino de Raza Churra. <http://www.anche.org>. (accessed 4.4.19).
- Atlija, M., J.J. Arranz, M. Martinez-Valladares, and B. Gutiérrez-Gil. 2016. Detection and replication of QTL underlying resistance to gastrointestinal nematodes in adult sheep using the ovine 50K SNP array. *Genet. Sel. Evol.* doi:10.1186/s12711-016-0182-4.
- Auvray, B., J.C. McEwan, S.A.N. Newman, M. Lee, and K.G. Dodds. 2014. Genomic prediction of breeding values in the New Zealand sheep industry using a 50K SNP chip. *J. Anim. Sci.* 92:4375–4389. doi:10.2527/jas2014-7801.
- Baloche, G., A. Legarra, G. Sallé, H. Larroque, J.-M. Astruc, C. Robert-Granié, and F. Barillet. 2014. Assessment of accuracy of genomic prediction for French Lacaune dairy sheep. *J. Dairy Sci.* 97:1107–1116. doi:10.3168/jds.2013-7135.
- Ben-Israel, A., Greville, T.N.E., 2003. *Generalized Inverses: Theory and Applications*, CMS Books in Mathematics. Springer, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/b97366>
- Bolormaa, S., D.J. Brown, A.A. Swan, J.H.J. van der Werf, B.J. Hayes, and H.D. Daetwyler. 2017. Genomic prediction of reproduction traits for Merino sheep. *Anim. Genet.* 48:338–348. doi:10.1111/age.12541.
- Calus, M.P.L., de Haas, Y., Veerkamp, R.F., 2013. Combining cow and bull reference populations to increase accuracy of genomic prediction and genome-wide association studies. *J. Dairy Sci.* 96, 6703–6715. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6013>
- Calus, M.P.L. 2016. Editorial: Genomic selection with numerically small reference populations. *Animal* 10:1016–1017. doi:10.1017/S1751731116000379.
- Chitneedi, P.K., Arranz, J.J., Suarez-Vega, A., García-Gómez, E., Gutiérrez-Gil, B., 2017. Estimations of linkage disequilibrium, effective population size and ROH-based inbreeding coefficients in Spanish Churra sheep using imputed high-density SNP genotypes. *Anim. Genet.* <https://doi.org/10.1111/age.12564>
- Christensen, O.F., and M.S. Lund. 2010. Genomic prediction when some animals are not genotyped. *Genet. Sel. Evol.* 42:2. doi:10.1186/1297-9686-42-2.
- Clark, S.A., J.M. Hickey, H.D. Daetwyler, and J.H.J. van der Werf. 2012. The importance of information on relatives for the prediction of genomic breeding values and the implications for the makeup of reference data sets in livestock breeding schemes. *Genet. Sel. Evol.* 44:4. doi:10.1186/1297-9686-44-4.
- Daetwyler, H.D., Pong-Wong, R., Villanueva, B., Woolliams, J.A., 2010. The impact of genetic architecture on genome-wide evaluation methods. *Genetics* 185, 1021–1031. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.116855>

- Daetwyler, H.D., A.A. Swan, J.H. van der Werf, and B.J. Hayes. 2012. Accuracy of pedigree and genomic predictions of carcass and novel meat quality traits in multi-breed sheep data assessed by cross-validation. *Genet. Sel. Evol.* 44:33. doi:10.1186/1297-9686-44-33.
- Duchemin, S.I., C. Colombani, A. Legarra, G. Baloche, H. Larroque, J.-M. Astruc, F. Barillet, C. Robert-Granié, and E. Manfredi. 2012. Genomic selection in the French Lacaune dairy sheep breed. *J. Dairy Sci.* 95:2723–2733. doi:10.3168/jds.2011-4980.
- el-Saied, U.M., J. a Carriedo, and F. San Primitivo. 1998. Heritability of test day somatic cell counts and its relationship with milk yield and protein percentage in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 81:2956–2961. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75858-8.
- García-Gámez, E., B. Gutiérrez-Gil, G. Sahana, J.P. Sánchez, Y. Bayón, and J.J. Arranz. 2012a. GWA Analysis for Milk Production Traits in Dairy Sheep and Genetic Support for a QTN Influencing Milk Protein Percentage in the LALBA Gene. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0047782.
- García-Gámez, E., B. Gutiérrez-Gil, A. Suarez-Vega, L.F. de la Fuente, and J.J. Arranz. 2013. Identification of quantitative trait loci underlying milk traits in Spanish dairy sheep using linkage plus combined linkage disequilibrium and linkage analysis approaches. *J. Dairy Sci.* 96:6059–69. doi:10.3168/jds.2013-6824.
- García-Gámez, E., G. Sahana, B. Gutiérrez-Gil, and J.J. Arranz. 2012b. Linkage disequilibrium and inbreeding estimation in Spanish Churra sheep. *BMC Genet.* 13. doi:10.1186/1471-2156-13-43.
- Garrick, D.J. 2007. Equivalent mixed model equations for genomic selection. *J. Anim. Sci.* 85:376–376.
- Garrick, D.J., J.F. Taylor, and R.L. Fernando. 2009. Deregressing estimated breeding values and weighting information for genomic regression analyses. *Genet. Sel. Evol.* 41:55. doi:10.1186/1297-9686-41-55.
- Gilmour, A.R., B.J. Gogel, B.R. Cullis, S.J. Welham, and R. Thompson. 2014. ASReml User Guide Release 4.1 Functional Specification. VSN Int. Ltd, Hemel Hempstead, HP1 1ES, UK www.vsn.co.uk.
- Habier, D., R.L. Fernando, and J.C.M. Dekkers. 2007. The impact of genetic relationship information on genome-assisted breeding values. *Genetics* 177:2389–2397. doi:10.1534/genetics.107.081190.
- Hayes, B.J., P.J. Bowman, A.J. Chamberlain, and M.E. Goddard. 2009b. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *J. Dairy Sci.* 92:433–443. doi:10.3168/jds.2008-1646.
- Hayes, B.J., P.M. Visscher, and M.E. Goddard. 2009a. Increased accuracy of artificial selection by using the realized relationship matrix. *Genet. Res. (Camb.)* 91:47–60. doi:10.1017/S0016672308009981.
- Henderson, C.R. 1975. Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. *Biometrics* 31:423–447. doi:10.2307/2529430.
- Henderson, C.R. 1984. *Applications of Linear Models in Animal Breeding Models*. Univ. Guelph 384.

- Legarra, a, I. Aguilar, and I. Misztal. 2009. A relationship matrix including full pedigree and genomic information. *J. Dairy Sci.* 92:4656–4663. doi:10.3168/jds.2009-2061.
- Legarra, A., G. Baloche, F. Barillet, J.M. Astruc, C. Soulas, X. Aguerre, F. Arrese, L. Mintegi, M. Lasarte, F. Maeztu, I. Beltrán de Heredia, and E. Ugarte. 2014a. Within- and across-breed genomic predictions and genomic relationships for Western Pyrenees dairy sheep breeds Latxa, Manech, and Basco-Béarnaise. *J. Dairy Sci.* 97:3200–3212. doi:10.3168/jds.2013-7745.
- Legarra, A., O.F. Christensen, I. Aguilar, and I. Misztal. 2014b. Single Step, a general approach for genomic selection. *Livest. Sci.* 166:54–65. doi:10.1016/j.livsci.2014.04.029.
- Lourenco, D.A.L., Fragomeni, B.O., Tsuruta, S., Aguilar, I., Zumbach, B., Hawken, R.J., Legarra, A., Misztal, I., 2015. Accuracy of estimated breeding values with genomic information on males, females, or both: An example on broiler chicken. *Genet. Sel. Evol.* 47. <https://doi.org/10.1186/s12711-015-0137-1>
- Meuwissen, T.H.E., B.J. Hayes, and M.E. Goddard. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157:1819–1829. doi:11290733.
- Misztal, I., A. Legarra, and I. Aguilar. 2009. Computing procedures for genetic evaluation including phenotypic, full pedigree, and genomic information. *J. Dairy Sci.* 92:4648–4655. doi:10.3168/jds.2009-2064.
- Othmane, M.H., J.A. Carriedo, L.F. De la Fuente, and F. San Primitivo. 2002a. Factors affecting test-day milk composition in dairy ewes, and relationships amongst various milk components. *J. Dairy Res.* doi:10.1017/S0022029901005234.
- Othmane, M.H., J.A. Carriedo, F. San Primitivo, and L.F. De la Fuente. 2002b. Genetic parameters for lactation traits of milking ewes: protein content and composition, fat, somatic cells and individual laboratory cheese yield. *Genet. Sel. Evol.* 34:581–596. doi:10.1051/gse.
- Othmane, M.H., L.F. De La Fuente, J. a Carriedo, and F. San Primitivo. 2002c. Heritability and genetic correlations of test day milk yield and composition, individual laboratory cheese yield, and somatic cell count for dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 85:2692–2698. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74355-5.
- Pszczola, M., T. Strabel, H.A. Mulder, and M.P.L. Calus. 2012. Reliability of direct genomic values for animals with different relationships within and to the reference population. *J. Dairy Sci.* 95:389–400. doi:10.3168/jds.2011-4338.
- Purcell, S., B. Neale, K. Todd-Brown, L. Thomas, M.A.R. Ferreira, D. Bender, J. Maller, P. Sklar, P.I.W. de Bakker, M.J. Daly, and P.C. Sham. 2007. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 81:559–575. doi:10.1086/519795.
- Swan, A.A., D.J. Brow, H.D. Daetwyle, B.J. Haye, M. Kelly, N. Moghadda, J.H.J. va, de, and Wer. 2014. Genomic Evaluations in the Australian Sheep Industry. *Proc. 10th World Congr. Genet. Appl. to Livest. Prod.*
- Van Grevenhof, E.M., J.A. Van Arendonk, and P. Bijma. 2012. Response to genomic selection: The Bulmer effect and the potential of genomic selection when the number of phenotypic records is limiting. *Genet. Sel. Evol.* 44. doi:10.1186/1297-9686-44-26.

VanRaden, P.M. 2007. Genomic Measures of Relationship and Inbreeding. *Interbull Bull.* 111–114. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.

VanRaden, P.M. 2008. Efficient methods to compute genomic predictions. *J. Dairy Sci.* 91:4414–23. doi:10.3168/jds.2007-0980.

VanRaden, P.M., C.P. Van Tassell, G.R. Wiggans, T.S. Sonstegard, R.D. Schnabel, J.F. Taylor, and F.S. Schenkel. 2009. Invited Review: Reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 92:16–24. doi:10.3168/jds.2008-1514.

Vitezica, Z.G., I. Aguilar, I. Misztal, and A. Legarra. 2011. Bias in genomic predictions for populations under selection. *Genet. Res. (Camb.)* 93:357–366. doi:10.1017/S001667231100022X.

Wientjes, Y.C.J., R.F. Veerkamp, and M.P.L. Calus. 2013. The effect of linkage disequilibrium and family relationships on the reliability of genomic prediction. *Genetics* 193:621–631. doi:10.1534/genetics.112.146290.

Tables

Table 1. Descriptive statistics of the Churra dataset.

Trait		Statistics of phenotypic traits			
		Records	N	μ	SD
Milk Yield (grams)	All	1,410,748	96,357	997.99	560.3
	Genotyped	33,923	1,667	1,108.28	571.4
Protein Yield (grams)	All	595,845	72,387	58.52	29.35
	Genotyped	25,979	1,667	65.47	33.44
Fat Yield (grams)	All	561,473	71,626	67.44	35.72
	Genotyped	24,807	1,667	75.25	40.71
Protein Percentage (%)	All	595,845	72,387	5.68	0.84
	Genotyped	25,979	1,667	5.68	0.87
Fat Percentage (%)	All	561,473	71,626	6.78	1.87
	Genotyped	24,807	1,667	6.75	1.86
Total Solid Percentage (%)	All	513,441	67,053	18	2.4
	Genotyped	25,937	1,667	17.88	2.56

Records: number of records in the datasets. N: number of animals with records. μ : mean of the trait. SD.: standard deviation of the trait.

Table 2. Summary of the distribution of the genotyped animals with offspring in the pedigree by birth year.

Animals birth year	males	offspring
1986-1990	5	3,714
1991-1995	8	2,656
1996-2000	55	9,045
2001-2005	69	12,183
2006-2010	70	7,537
2011-2013	12	694
2013-2015	16	-
total	235	35,829
	females	offspring
1999-2005	1,009	1,754
2006-2008	658	1,461
total	1,667	3,215

Table 3. Heritabilities and Repeatibilities (and their standard errors in brackets) for each trait. They were estimated either using all animals in the pedigree as described for each trait (“All animals”) or only using phenotypic records of genotyped ewes (“Genotyped”).

	Trait					
	MY	PY	FY	PP	FP	TSP
Heritability						
All animals	0.1799 (0.0034)	0.1528 (0.0034)	0.0562 (0.0021)	0.2253 (0.0042)	0.0969 (0.0028)	0.1661 (0.0038)
Genotyped	0.2097 (0.0120)	0.1649 (0.0108)	0.0750 (0.0069)	0.2375 (0.0125)	0.1092 (0.0085)	0.1929 (0.0119)
Repeatability						
All animals	0.3657 (0.0016)	0.2411 (0.0019)	0.1078 (0.0013)	0.3128 (0.0042)	0.1604 (0.0016)	0.2395 (0.0021)
Genotyped	0.3703 (0.0057)	0.2289 (0.0057)	0.1049 (0.0041)	0.2923 (0.0064)	0.1531 (0.0049)	0.2334 (0.0065)

MY: Milk yield (grams), PY: Protein yield (grams), FY: Fat yield (grams), PP: Protein percentage (%), FP: Fat percentage (%), TSP: Total solids percentage (%).

Table 4. Precision of estimated breeding values for the three groups of ewe candidates with BLUP, and genomic prediction methods (GBLUP, DGBLUP and ssGBLUP) for the Churra dataset. Results are the Pearson’s correlation between corrected phenotypes and GEBV/EBV calculated with different evaluation methods where the animals in training population are either (i) ewes from the 16 genotyped families or (ii) all genotyped and ungenotyped ewes in pedigree with available phenotypic information. The correlations were calculated for three ewe groups: (a) genotyped ewes half-sib of genotyped training ewes, (b) ungenotyped daughters from genotyped rams and (c) youngest ungenotyped ewes (i.e. forward prediction).

Training animals	Method	Trait					
		MY	PY	FY	PP	FP	TSP
Genotyped ewes with genotyped half sibs in training population							
genotyped ewes only ¹	BLUP	0.197 (0.007)	0.254 (0.009)	0.147 (0.005)	0.282 (0.009)	0.180 (0.002)	0.228 (0.017)
	GBLUP	0.199 (0.005)	0.273 (0.011)	0.154 (0.004)	0.303 (0.010)	0.189 (0.003)	0.237 (0.026)
	Benefit	1.0%	7.5%	4.8%	7.4%	5.0%	3.9%
All ewes in pedigree ²	BLUP	0.265 (0.007)	0.309 (0.008)	0.170 (0.004)	0.357 (0.008)	0.217 (0.004)	0.271 (0.020)
	DGBLUP	0.205 (0.003)	0.273 (0.010)	0.156 (0.005)	0.303 (0.009)	0.192 (0.004)	0.238 (0.024)
	ssGBLUP	0.248 (0.004)	0.316 (0.007)	0.173 (0.004)	0.362 (0.007)	0.219 (0.003)	0.271 (0.026)
	Benefit DGBLUP	-22.6%	-11.7%	-8.2%	-15.1%	-11.5%	-12.2%
	Benefit ssGBLUP	-6.4%	2.3%	1.8%	1.4%	0.9%	0.0%
Ungenotyped ewe’s offspring of genotyped sires							
All ewes in pedigree ²	BLUP	0.245 (0.004)	0.276 (0.006)	0.158 (0.003)	0.317 (0.004)	0.205 (0.004)	0.295 (0.003)
	ssGBLUP	0.245 (0.005)	0.277 (0.006)	0.158 (0.003)	0.317 (0.005)	0.205 (0.004)	0.295 (0.003)
Forwards prediction youngest ewes in pedigree (few generations after the 16 training families)							
All ewes in pedigree ²	BLUP	0.381 (0.015)	0.291 (0.017)	0.159 (0.020)	0.324 (0.017)	0.203 (0.019)	0.246 (0.018)
	ssGBLUP	0.381 (0.015)	0.291 (0.017)	0.161 (0.021)	0.325 (0.017)	0.204 (0.019)	0.247 (0.018)

1: analysis done using corrected phenotypes from genotyped ewes in training population. 2: analysis done using data from genotyped ewes in training plus all other non-genotyped animals excluding those in the validation group or their offspring. MY: Milk yield (grams), PY: Protein yield (grams), FY: Fat yield (grams), PP: Protein percentage (%), FP: Fat percentage (%), TSP: Total solids percentage (%). The values represented are arithmetic averages of the 5-fold cross-validations. The SEM is shown in brackets.

Table 5. Precision of estimated breeding values for the genotyped rams with BLUP, and genomic prediction methods (GBLUP and ssGBLUP) for the Churra dataset. Results are the Pearson’s correlation between EBV of genotype rams calculated with all information and GEBV/EBV calculated with the training population excluding daughters of the validated rams.

	Trait					
	MY	PY	FY	PP	FP	TSP
Phenotypes from daughters of training rams only						
BLUP ¹	0.326 (0.044)	0.214 (0.051)	0.327 (0.044)	0.219 (0.051)	0.323 (0.044)	0.301 (0.046)
GBLUP ²	0.375 (0.041)	0.536 (0.030)	0.513 (0.032)	0.549 (0.029)	0.512 (0.032)	0.534 (0.031)
Benefit	15.0%	150.5%	56.9%	150.7%	58.5%	77.4%
Phenotypes from all ewes in population except validation offspring and their own offspring ²						
BLUP ³	0.474 (0.034)	0.544 (0.029)	0.569 (0.028)	0.535 (0.031)	0.556 (0.029)	0.544 (0.030)
ssGBLUP ³	0.723 (0.017)	0.825 (0.011)	0.852 (0.009)	0.813 (0.012)	0.828 (0.011)	0.829 (0.011)
Benefit	52.5%	51.7%	49.7%	52.0%	48.9%	52.4%

1: BLUP carried out using test-day records of training rams’ daughters only. 2: information used in the GBLUP was the training rams’ EBV calculated in the BLUP evaluation. 3: BLUP and ssGBLUP using test-day records of entire dataset, excluding the validates ram’s daughters and granddaughters. MY: Milk yield (grams), PY: Protein yield (grams), FY: Fat yield (grams), PP: Protein percentage (%), FP: Fat percentage (%), TSP: Total solids percentage (%). The values represented are arithmetic averages of the 5-fold cross-validations. The SEM is shown in brackets.

Table 6. Precision of estimated breeding values of ewes with BLUP and GBLUP for simulation dataset 1. Mean (SD) correlation between simulated phenotypes and estimated breeding values calculated in the testing sets of a 5-fold cross-validation with BLUP and GBLUP.

	Trait					
	MY	PY	FY	PP	FP	TSP
Phenotypes from offspring of training rams only						
BLUP	0.188 (0.009)	0.189 (0.012)	0.162 (0.009)	0.218 (0.013)	0.137 (0.006)	0.148 (0.005)
GBLUP	0.250 (0.005)	0.243 (0.009)	0.199 (0.006)	0.290 (0.007)	0.178 (0.006)	0.188 (0.004)
Benefit	32.9%	28.7%	23.2%	32.7%	30.5%	27.2%

MY: Milk yield (grams), PY: Protein yield (grams), FY: Fat yield (grams), PP: Protein percentage (%), FP: Fat percentage (%), TSP: Total solids percentage (%).

Table 7. Precision of estimated breeding values for the three groups of ewe candidates with BLUP, and genomic prediction methods (GBLUP, DGBLUP and ssGBLUP) for the simulation dataset 2. Results are the Pearson’s correlation between corrected phenotypes and GEBV/EBV calculated with different evaluation methods where the animals in training population are either (i) ewes from the 16 genotyped families or (ii) all genotyped and ungenotyped ewes in pedigree with available phenotypic information. The correlations were calculated for three ewe groups: (a) genotyped ewes half-sibs of genotyped training ewes, (b) ungenotyped daughters from genotyped rams and (c) youngest ungenotyped ewes (i.e. forward prediction).

Training animals	Method	Trait					
		MY	PY	FY	PP	FP	TSP
Genotyped ewes with genotyped half sibs in training population							
genotyped ewes only ¹	BLUP	0.218 (0.015)	0.195 (0.013)	0.121 (0.012)	0.256 (0.021)	0.156 (0.007)	0.198 (0.025)
	GBLUP	0.346 (0.013)	0.321 (0.011)	0.184 (0.008)	0.393 (0.012)	0.233 (0.010)	0.313 (0.022)
	Benefit	58.7%	64.6%	52.1%	53.5%	49.4%	58.1%
All ewes in pedigree ²	BLUP	0.292 (0.013)	0.244 (0.012)	0.144 (0.010)	0.316 (0.018)	0.193 (0.008)	0.252 (0.019)
	DGBLUP	0.346 (0.012)	0.318 (0.010)	0.179 (0.008)	0.391 (0.012)	0.231 (0.10)	0.312 (0.022)
	ssGBLUP	0.373 (0.011)	0.341 (0.010)	0.198 (0.007)	0.402 (0.018)	0.253 (0.009)	0.336 (0.020)
	Benefit DGBLUP	18.5%	30.3%	24.3%	23.7%	19.7%	23.8%
	Benefit ssGBLUP	27.7%	39.8%	37.5%	27.2%	31.1%	33.3%
Ungenotyped ewe’s offspring of genotyped sires							
All ewes in pedigree ²	BLUP	0.288 (0.006)	0.248 (0.004)	0.139 (0.004)	0.304 (0.008)	0.185 (0.005)	0.247 (0.006)
	ssGBLUP	0.289 (0.006)	0.250 (0.004)	0.141 (0.004)	0.305 (0.008)	0.187 (0.005)	0.249 (0.006)
Forwards prediction youngest ewes in pedigree (few generations after the 16 training families)							
All ewes in pedigree ²	BLUP	0.293 (0.003)	0.246 (0.005)	0.139 (0.005)	0.305 (0.004)	0.191 (0.006)	0.254 (0.007)
	ssGBLUP	0.295 (0.004)	0.250 (0.005)	0.141 (0.005)	0.308 (0.004)	0.194 (0.006)	0.257 (0.007)

1: analysis done using corrected phenotypes from genotyped ewes in training population. 2: analysis done using data from genotyped ewes in training plus all other non-genotyped animals excluding those in the validation group or their offspring. The values represented are arithmetic averages of the 5-fold cross-validations. The SEM is shown in brackets.

Table 8. Precision of estimated breeding values for the genotyped rams with BLUP, and genomic prediction methods (GBLUP and ssGBLUP) for the simulation dataset 2. Results are the Pearson's correlation between EBV of genotype rams calculated with all information and GEBV/EBV calculated with the training population excluding daughters of the validated rams.

	Trait					
	MY	PY	FY	PP	FP	TSP
Phenotypes from offspring of training rams only						
BLUP ¹	0.366 (0.022)	0.410 (0.026)	0.324 (0.021)	0.339 (0.024)	0.349 (0.020)	0.367 (0.021)
GBLUP ²	0.765 (0.011)	0.766 (0.009)	0.659 (0.015)	0.764 (0.012)	0.722 (0.020)	0.718 (0.013)
Benefit	109.0%	86.8%	103.4%	125.4%	106.9%	95.6%
Phenotypes from all ewes in population except validation offspring and their own offspring						
BLUP ³	0.666 (0.011)	0.648 (0.014)	0.614 (0.019)	0.642 (0.014)	0.621 (0.011)	0.627 (0.013)
ssGBLUP ³	0.910 (0.005)	0.895 (0.003)	0.845 (0.006)	0.894 (0.006)	0.864 (0.009)	0.875 (0.005)
Benefit	36.6%	38.1%	37.6%	39.3%	39.1%	39.6%

1: this BLUP carried out using test-day records of training rams' daughters only. 2: information used in the GBLUP was the training rams' EBV calculated in the BLUP evaluation. 3: BLUP and ssGBLUP using test-day records of entire dataset, excluding the validates ram's daughters and granddaughters. MY: Milk yield (grams), PY: Protein yield (grams), FY: Fat yield (grams), PP: Protein percentage (%), FP: Fat percentage (%), TSP: Total solids percentage (%).

Supplementary Material.

Appendix 1. Removing parents' effect from deregressed breeding value when the individual or its parents are inbred.

The following appendix describes the derivation of the method proposed by Garrick et al. (2009) to calculate deregressed estimated breeding value (DEBV) corrected by their parent's contribution, when either of the parents or the individual itself are inbred. The DEBV is to be used in a GBLUP evaluation where information is weighted by a value (w) to account for differences in EBV reliability among the training individuals.

EBVs obtained from a BLUP evaluation are weighted functions of the information from the individual itself plus those of its relatives including its parents. Hence, when the parents of a training individual are also part of the training population, the individual's DEBV needs to be corrected to remove the contribution of their parent's information, and avoid double counting of the information rising from the parents' EBV.

Garrick et al. (2009) showed that, given the EBV and its reliability, the DEBV and its weight for an individual i , is equal to:

$$DEBV_i = \frac{EBV_i}{r_i^2} \quad [1]$$

and

$$w_i = \frac{1-h^2}{\left(c2 + \frac{(1-r_i^2)}{r_i^2}\right)h^2} \quad [2]$$

where h^2 is the heritability of the trait and $c2$ the proportion of the genetic variance not explained by the markers.

To correct for the parent's contribution when they also are in the training population, they proposed a method based on fitting a BLUP analysis including only the individual's effect and its parents average's one, assuming that both of them have phenotypic information. By reverse engineering the mixed model equation (MME), the number of records (ZZ_p and ZZ_i) and average phenotype (DYD_p and DYD_i) of both the parents and individual, required to yield the original EBV and reliability given as input. Then the individual's EBV and its reliability can be recalculated based on the individual's information only (i.e. without the parent's contribution), and thereafter, used to calculate the weight w_i . Garrick et al., (2009) derived the formula to calculate these figures under the assumption that individual and its parents were not inbred, those resulting in simpler equations. Here, we derive these formulae taking into account that any of them may be inbred. In our derivation, we follow similar steps as in Garrick et al., (2009) when possible, to ensure clarity for readers familiar with the original derivation.

Let the MME be $\mathbf{LHS} [\mathbf{ebv}] = \mathbf{rhs}$, where

$$\mathbf{LHS} = [\mathbf{A}^{-1}\lambda + \mathbf{ZZ}] = \begin{bmatrix} iA^{pp}\lambda + ZZ_p & iA^{pi}\lambda \\ iA^{ip}\lambda & iA^{ii}\lambda + ZZ_i \end{bmatrix} \quad [3]$$

and

$$\mathbf{rhs} = \begin{bmatrix} rhs_p \\ rhs_i \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} ZZ_p * DYD_p \\ ZZ_i * DYD_i \end{bmatrix} \quad [4]$$

with \mathbf{A}^{-1} being the inverse of the Numerator Relationship Matrix including the parent and the individual; ZZ_p and ZZ_i their number of records; DYD_p and DYD_i their average phenotype and $\lambda = \frac{1-h^2}{h^2}$. The parent effect refers to a single parent (the sire or the dam) or the average effect of both of them (further explained below).

Based on the rules for the inverse of a 2x2 matrix, the inverse of the left-hand side matrix (LHS) is equal to

$$\mathbf{LHS}^{-1} = \begin{bmatrix} \text{LHS}^{pp} & \text{LHS}^{pi} \\ \text{LHS}^{ip} & \text{LHS}^{ii} \end{bmatrix} = \frac{\begin{bmatrix} iA^{ii}\lambda + ZZ_i & -iA^{pi}\lambda \\ -iA^{ip}\lambda & iA^{pp}\lambda + ZZ_p \end{bmatrix}}{\det(\mathbf{LHS})}$$

with $\det(\mathbf{LHS}) = iA^{pp}iA^{ii}\lambda^2 + iA^{pp}ZZ_i\lambda + ZZ_p iA^{ii}\lambda + ZZ_p ZZ_i - (iA^{ip}\lambda)^2$.

Given the formula for reliability $r_i^2 = 1 - \frac{\text{LHS}^{ii}}{A^{ii}}\lambda$ and $r_p^2 = 1 - \frac{\text{LHS}^{pp}}{A^{pp}}\lambda$, they can be rearranged so the diagonal values of \mathbf{LHS}^{-1} (LHS^{ii} and LHS^{pp}) can be described respectively as:

$$\text{LHS}^{ii} = \frac{(iA^{pp}\lambda + ZZ_p)}{\det(\mathbf{LHS})} = (1 - r_i^2) \frac{A^{ii}}{\lambda} \quad [5]$$

$$\text{LHS}^{pp} = \frac{(iA^{ii}\lambda + ZZ_i)}{\det(\mathbf{LHS})} = (1 - r_p^2) \frac{A^{pp}}{\lambda}. \quad [6]$$

They can then be used to define a system of simultaneous equations and solve it for the unknown variables ZZ_p and ZZ_i .

Dividing equation [6] by [5] and rearranging the terms it leads to:

$$ZZ_i = \delta(iA^{pp}\lambda + ZZ_p) - iA^{ii}\lambda = \delta * ZZ_p + \lambda * (\delta iA^{pp} - iA^{ii}) \quad [7]$$

$$\text{where } \delta = \frac{(1-r_p^2)}{(1-r_i^2)} * \frac{A^{pp}}{A^{ii}}.$$

Now replacing ZZ_i by its expression as in [7] into the $\det(\mathbf{LHS})$ leads to:

$$\det(\mathbf{LHS}) = \delta ZZ_p ZZ_p + (2\delta iA^{pp}\lambda)ZZ_p + \lambda^2 (\delta(iA^{pp})^2 - (iA^{ip})^2)$$

Using the new expression of $\det(\mathbf{LHS})$ into [5] and rearranging the terms it leads to the quadratic equation:

$$(ZZ_p)^2 + \lambda(2iA^{pp} - \alpha)ZZ_p + \lambda^2 \left(iA^{pp}(iA^{pp} - \alpha) - \frac{1}{\delta}(iA^{ip})^2 \right) = \mathbf{0}$$

Where $\alpha = \frac{1}{(1-r_p^2)A^{pp}}$ and a positive solution for the quadratic equation is equal to:

$$ZZ_p = \frac{-\lambda(2iA^{pp}-\alpha) + \sqrt{\lambda^2\left(\alpha^2 + \frac{4}{\delta}(iA^{ip})^2\right)}}{2} = \frac{-\lambda(2iA^{pp}-\alpha) + \lambda\sqrt{\alpha^2 + \frac{4}{\delta}(iA^{ip})^2}}{2} \quad [8]$$

Once ZZ_i and ZZ_p have been calculated, the values of the **rhs** can be calculated as **LHS [ebv]**,

and from [4], $DYD_i = \frac{rhs_i}{ZZ_i}$ and $DYD_p = \frac{rhs_p}{ZZ_p}$. DYD_i (or DYD_p) is the DEBV of the individual

(or its parents) without accounting for the contribution from information from its parents (or the offspring).

Now given the DYD_i and ZZ_i , the individual's EBV and its reliability can be recalculated without accounting for the parent's information. The reliability for the new EBV is equal to:

$$r_i^{*2} = 1 - \frac{\lambda}{((1+f_i)ZZ_i + \lambda)}$$

Finally, the new reliability is used in [2] to calculate the new weight (w_i).

Let the trio composed by the two parents and the individual. The coefficient of inbreeding for the sire, dam and the individual are f_s , f_d and f_i , respectively. Hence the part of the numerator relationship matrix corresponding to these trio is:

$$A = \begin{bmatrix} 1 + f_s & 2f_i & 0.5 + \frac{f_s}{2} + f_i \\ 2f_i & 1 + f_d & 0.5 + \frac{f_d}{2} + f_i \\ 0.5 + \frac{f_s}{2} + f_i & 0.5 + \frac{f_d}{2} + f_i & 1 + f_i \end{bmatrix}$$

If only one parent is in the training population, the relevant column/row is chosen for the correction. But when both are known, as in Garrick et al., (2009), the average effect of both parents is used.

Let, the breeding value of animals are ebv_s , ebv_d and ebv_i , and accuracy r_s^2 , r_d^2 and r_i^2 . Hence, the Mid parent's effect and reliability are: $ebv_p = \frac{(ebv_s+ebv_d)}{2}$ and $r_p^2 = \frac{(r_s^2+r_d^2)}{4}$.

The relationship matrix including the average effect is:

$$A = \begin{bmatrix} 0.5 + \frac{f_s+f_d}{4} + f_i & 0.5 + \frac{f_s+f_d}{4} + f_i \\ 0.5 + \frac{f_s+f_d}{4} + f_i & 1 + f_i \end{bmatrix}$$

$$\text{Let } a = \frac{f_s+f_d}{4} + f_i$$

$$A = \begin{bmatrix} 0.5 + a & 0.5 + a \\ 0.5 + a & 1 + f_i \end{bmatrix}$$

Note that if we assume none them be inbred, the equations derived above will simplify to the ones reported by Garrick et al. (2009).

Hence, the calculation of the DEBV and its weight for an individual i are calculated as follow:

1. If neither parent is part of the training population, they are calculated without correction using [1] and [2].
2. If one parent is part of the training, calculate the A matrix taken into account their inbreeding coefficient, and use the corresponding column/row to do the correction as above.
3. If both parents are in the training, calculate the relationship of the average effect and do use it for the correction as above.

Chapter 2. Effect of the genotyping strategies on the sustained benefit of single step genomic BLUP over multiple generations.

Effect of the genotyping strategies on the sustained benefit of single step genomic BLUP over multiple generations.

Milagros Sánchez-Mayor¹, Valentina Riggio², Pau Navarro³, Chris S. Haley^{2,3}, Beatriz Gutiérrez-Gil¹, Luis Fernando de la Fuente¹, Juan José Arranz-Santos^{1*} and Ricardo Pong-Wong²

¹ Dpto. Producción Animal, Universidad de León, 24071, León, Spain

² The Roslin Institute and R(D)SVS, University of Edinburgh, Easter Bush, EH25 9RG, UK.

³ MRC Human Genetics Unit, University of Edinburgh, Institute of Genetics and Molecular Medicine, Western General Hospital, Crewe Road, Edinburgh EH4 2XU, UK

*Corresponding author: Juan José Arranz Santos

E-mail addresses:

MS-M: msancm@unileon.es

VR: valentina.riggio@roslin.ed.ac.uk

PN: Pau.Navarro@ed.ac.uk

CSH: Chris.Haley@igmm.ed.ac.uk

BG-G: beatriz.gutierrez@unileon.es

LFF: f.fuente@unileon.es

JJA-S: jjarrs@unileon.es

RP-W: ricardo.pong-wong@roslin.ed.ac.uk

Under review by the co-authors.

Abstract

Background: ssGBLUP allows to include information of genotyped and ungenotyped individuals in a single analysis. This avoid to genotype all candidates with a potential benefit of reducing overall cost. The aim of this study was to assess the effect of genotyping strategies and the proportion of genotyped candidates when using ssGBLUP evaluation. A simulation study was carried out assuming selection over several discrete generations where a proportion of the candidates were genotyped and evaluation was done using ssGBLUP. The scenarios compared were (i) three genotyping strategies defined by their protocol to choose candidates to be genotyped (RANDOM: candidates were chosen at random; TOP: best candidates based on their phenotype were genotyped; and EXTREME: genotyped candidates were those with the best and worse phenotype) and (ii) six proportion of genotyped candidates (p). The criteria of comparison were the cumulated gain and reliability of the genomic estimated breeding values (GEBV).

Results: The genotyping strategy with the greatest cumulated gain was TOP followed by RANDOM, with EXTREME behaving as RANDOM at low p and as TOP with high p . However, GEBV reliability were higher with RANDOM than with TOP. This disparity between the trend of the gain and the reliability is because TOP genotypes candidates with greater chances of being selected, so final selection decisions are more likely to be based on genomic data than with RANDOM. The increment of the ssGBLUP benefit when increasing p was slow at low p .

Conclusions: The best strategy to maximise genetic gain when only a proportion of the candidates are to be genotyped, is to genotype those candidates which are more likely to be selected. But, the strategy with the greatest GEBV reliability do not achieve the highest gain, so reliability cannot be considered as an absolute and sufficient criterion for determining the scheme which maximise genetic gain. The ideal proportion of genotype candidates may be

population specific, but it is likely that a substantial proportion is needed to achieve the maximum potential benefit expected from genomic prediction.

Keywords: ssGBLUP, genotyping-strategy, genotyping-proportion

Background

Genomic prediction (or Genomic selection, GS) uses information derived from high-throughput genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNP) in the genetic evaluation (Meuwissen et al., 2001). It has been successfully implemented in many commercial breeding populations from several livestock species significantly increasing the accuracy/reliability of the estimated breeding values (e.g.(Christensen et al., 2012; Hayes et al., 2009a; Knol et al., 2016; Riggio et al., 2014; Tsai et al., 2016; VanRaden et al., 2009; Wolc et al., 2016)). In addition, other advantages which have been observed with GS have been an increase in the intensity of the selection and shortening of the generational interval (Doublet et al., 2019; García-Ruiz et al., 2016); and potentially, a better management of the genetic variation (Gómez-Romano et al., 2016; Woolliams et al., 2015).

Several methods, defined by their assumption on their assumption on the prior distribution of the SNP effects, have been proposed and implemented (for a review of methods see (Gianola et al., 2009) and (Gianola, 2013)), with the most popular ones being the Genomic Best Linear Unbiased Prediction (GBLUP) (Hayes et al., 2009b), specially its further development, known as the single-step GBLUP or ssGBLUP (Christensen and Lund, 2010; Legarra et al., 2014, 2009). The attractiveness from ssGBLUP is that it allows to include information from genotyped and ungenotyped animals in a single joint analysis leading to better predictions in

the genotyped animals and, at some extent, it propagates into the group of ungenotyped ones (Legarra et al., 2014; Misztal et al., 2013).

Hence, an extra appeal from ssGBLUP is that it allows the option of not genotyping the whole group of candidate animals, and thereby, reducing the cost of the selection scheme. However, this raises the need to determine the optimum set of candidates to be genotyped to ensure that significant benefit from ssGBLUP is still achieved. In this study, the aim is to assess the effect of genotyping strategies and the proportion of genotyped candidates on the cumulated genetic gain when using ssGBLUP evaluation.

Methods

A simulation study was done to assess the effect of genotyping strategies on the response to selection across multiple generations using ssGBLUP to account for not all candidates being genotyped. A total of 100 replicates were used.

Founder population in linkage disequilibrium

To simulate a genome in linkage disequilibrium (LD), a founder population was simulated using a mutation-drift-equilibrium algorithm as suggested by Meuwissen et al., (2001). Briefly, an initial population of n individuals is allowed to reproduce, with each individual producing two offspring (one male and one female). The genome is assumed to be divided in several chromosomes with biallelic loci mutating at a given rate. As the population develops across a large number of generations, new mutations appear and they are lost or increase in their frequency due to drift, resulting in a population with a genome with segregating linked loci in

LD. Thereafter, the population is expanded to produce the founder population, which is used to sample the haplotype of the base animals of the breeding population. In order to simulate the genome with similar LD pattern as a sheep structure, we assumed the initial population of 100 individuals and it was allowed to reproduce for 10,000 generations. The genome was composed of 26 chromosomes of 1 Morgan length. Each chromosome has 500,000 biallelic loci located equidistantly and a mutation rate of 10^{-6} . Thereafter, the population has three generations of 5X expansion and 4,000 individuals of the last generation were randomly selected to be the founder population, and used to create the genome of the base population. In the founder population, approximately 5,000 loci per chromosome were segregating.

Population structure

The breeding population was assumed to have discrete generations, with 900 individuals (300 males and 600 females) per generation. At each generation, 30 males and 300 females were selected and mated, with each selected female having 3 offspring (1 male and 2 females). All individuals were assumed to have one phenotypic record available for their genetic evaluation. The simulated population structure aimed at mimicking a sheep breeding population with large paternal and small maternal families. The assumption of litter size of three can be considered to be a bit unrealistic in a sheep population, but it was the minimum possible size in order to assume discrete generations and still being able to have selection pressure on both male and female candidates. However, the assumption of discrete generation means that the results would not be affected by differences in generation interval, and the observed differences between scenarios would be due only to the quality of the estimates. Hence, the decision of assuming discrete generation, even though the litter size may be slightly higher than the average in sheep populations.

The first two generations (G-2, G-1) were assumed to be the initial reference population, so all individuals were genotyped. Thereafter, nine extra generations were simulated (G0 – G8), with only a proportion p of the individuals being genotyped. The selection scheme using ssGBLUP started at G0, therefore the comparison between strategies was done from G0 to G8. So, for a given time of selection using the ssGBLUP, the candidates available for selection are a mixture of genotyped and ungenotyped individuals. All candidates were assumed to be phenotyped.

Genetic architecture

The genome was divided in 26 autosomal chromosomes (i.e., mimicking the sheep genome), each with 1000 loci used as the SNP panel and 100 loci used as the QTL affecting the trait. The genome of animals of the base population (i.e. G-2) was simulated by randomly sampling haplotypes from the founder population, and in the following generations (i.e. G-1 to G8), an animal's genome was sampled assuming Mendelian inheritance given its parents' haplotype.

To select the loci included in the SNP panel and the QTL we calculated the frequency of all segregating loci at G0 and, within each chromosome, selected 1,100 with the highest MAF. Thereafter, 1000 loci were randomly assigned to be part of the SNP panel and 100 to be the QTL (i.e. across the genome, the SNP panel has 26,000 loci and 2,600 loci were QTL affecting the traits). This protocol means that the sets of SNPs used as QTL or as part of the chip panel were different in each replicate.

The heritability of the trait was assumed to be 0.2. The additive effect for each QTL was sampled from a standardised normal distribution and the favourable allele assigned randomly with equal probability. The true breeding value of each individual was calculated as the sum of the QTL effects, given its genotypes and the additive effect. The QTL effects were rescaled so

the genetic variance in G-2 was 0.2. The phenotype for each individual was simulated as sum of its true breeding value and an environmental effect sample assumed to be normal with mean zero and variance 0.8.

Genetic evaluation and selection

The genetic evaluation was carried out assuming that the genetic evaluation was done using ssGBLUP, but scenarios assuming BLUP (Best Linear Unbiased Prediction) and GBLUP evaluations were also simulated for comparison. All three methods of selection are implemented using the Henderson's mixed model equation (Henderson, 1984, 1975).

The assumed linear model is:

$$\mathbf{y} = \mu + \mathbf{Za} + \mathbf{e} \quad [6]$$

where \mathbf{y} is vector of phenotypes, μ is the overall mean, \mathbf{a} is the vector of polygenic breeding values distributed as $N(\mathbf{0}, \mathbf{G}\sigma_a^2)$, and \mathbf{e} the vector of i.i.d. residual deviations $N(\mathbf{0}, \mathbf{I}\sigma_e^2)$. \mathbf{G} is the genetic relationship matrix associated to the method of evaluation.

The BLUP, GBLUP and ssGBLUP evaluation methods are defined by the \mathbf{G} matrix used in the evaluation. For the BLUP evaluation, it is assumed that no genotype information is known for any animal and the relationship matrix is the numerator relationship matrix (\mathbf{A}) calculated using pedigree information. For GBLUP, all individuals included in the evaluation are genotyped and the relationship matrix is the genomic relationship matrix (\mathbf{G}) calculated using the SNP genotype (VanRaden, 2008). Finally, ssGBLUP assumes that only a proportion of the individuals are genotyped, so the calculation of the relationship matrix (\mathbf{H}) combines pedigree and dense SNP information (Legarra et al., 2014). In this study, the \mathbf{G} matrix was calculated using the second method proposed by VanRaden (2008), and the inverse of \mathbf{H} matrix was

calculated by joining the **A** matrix (including to all individuals, genotyped and ungenotyped) with the **G** matrix (including the genotyped individuals only) as described by Legarra et al. (2014). Additionally, prior to joining the matrices, the **G** matrix was adjusted to make it 'compatible' with the **A** matrix, as $\mathbf{G}_{adj} = a + b*\mathbf{G}$, where a and b were calculated as in Legarra et al. (2014).

The selection scheme simulated here assumed multiple discrete generations of selection. Hence, at a given generation the genetic evaluation of the current candidates to selection was done with a model including them plus all information (phenotypes and available genotypes) of animals from previous generations (i.e. the phenotype and genotype information increased with the number of generation).

For the period of selection (G0-G8), the candidates were selected assuming standard truncation based on the genomic breeding values calculated using the linear model described above.

Scenarios compared

The scenarios which were compared here included six different proportions of candidates being genotyped and three genotyping strategies used to select those candidates to be genotyped. Additionally, the BLUP and GBLUP scenarios were also included as they are equivalent to the situations where none or all candidates are genotyped and can be considered as the respective lower and upper limit for the expected performance of the ssGBLUP scenarios.

The proportion of candidates being genotyped used in the ssGBLUP scenarios were 10%, 20%, 30%, 40%, 50% and 70%. Additionally, BLUP and GBLUP are equivalent to scenarios with 0% and 100% genotyped, respectively. The same proportion of genotyped candidates were done in males and females.

The three genotyping strategies were: (i) RANDOM where the proportion of candidates to be genotyped were chosen at random from all available one; (ii) TOP where the genotyped animals were the p proportion of candidates (within sex) with the best phenotype; and (iii) EXTREME where the genotyped animals were those with the best $p/2$ and worse $p/2$ phenotypes.

Criteria of comparison

The criteria of comparison between scenarios were the cumulative genetic gain (g), reliability (r^2) of the genomic breeding values (GEBV) and the retained genetic variance σ_a^2 .

The cumulative genetic gain was relative to G0 (i.e. true breeding value was rebased so the mean at G0 is equal to zero), corresponding to the first generation where some candidates were ungenotyped and ssGBLUP needed to be implemented. The reliability of the GEBV is the squared of the Pearson's correlation between the GEBV and the true breeding values in the candidate group at a given time of selection. The retained genetic variance at a given generation is the variance of the true breeding values of all candidates born in that generation.

Because BLUP and GBLUP are equivalent to the scenarios with 0% and 100% of candidates being genotyped, they can be considered to be the respective lower and upper limit of the expected performance of ssGBLUP. Hence, we defined a parameter denoted as efficiency (E) to compare the different scenarios using ssGBLUP. Basically, E is the proportion of the extra benefit of GBLUP over BLUP, which is realised on the ssGBLUP scenario (i.e. $E = \frac{(ssGBLUP-BLUP)}{(GBLUP-BLUP)}$). Therefore, when $E=1$, it means that having a p proportion of candidates being genotyped yields the same extra gain as when having all candidates genotyped. On the contrary, when $E=0$, it means that the ssGBLUP has not advantage over BLUP evaluation where none of the candidates are genotyped.

Results

A total of 100 replicates were carried out in this simulation study, and the results shown here are the average over them.

Benefit of GBLUP when all candidates are genotyped

The response to selection when assuming all animals are genotyped is shown in Figure 1. Across the generations of selection, GBLUP performed substantially better than BLUP, due to a greater reliability of the EBV. The difference in reliability between the two methods increased over generations, such that, at G8, the reliability with GBLUP was up to 3-fold larger than with BLUP. But, the benefit of GBLUP remained relatively constant across all generations with selection, with the genetic gain of GBLUP consistently being between 28% and 33% higher than BLUP. This reflected the fact that the genetic variance decreased faster with GBLUP.

Benefit of ssGBLUP when only a proportion of candidates are genotyped

The response to selection for the different scenarios of ssGBLUP when only a proportion of the candidates are genotyped are shown in Figure 2. As expected, the cumulated genetic gain and the GEBV reliability increased with the proportion of candidates being genotyped, which also coincided with a greater loss on genetic variance. Figure 3 shows the results of genetic gain for all ssGBLUP schemes, expressed as efficiency relative to GBLUP (i.e. the extra gain of ssGBLUP expressed as proportion of the maximum achieved with GBLUP where all candidates are selected). When expressing the gain as efficiency, the results tended to be relatively

consistent across the generations, where the benefit of ssGBLUP did not improve or degrade with the generations.

Consistently, TOP was the scheme which achieved the greatest genetic gain within a given proportion of genotyped candidates, with RANDOM being the one with lowest gain (see Figures 2 and 3). In fact, RANDOM with 10% of candidates being genotyped was the only ssGBLUP scenario which failed to achieve greater gain than with standard BLUP. At G8, the advantage of TOP over RANDOM ranged between 38% to 108% when the proportion of selected candidates were 50% and 20%, respectively (ignoring $p=10%$ as RANDOM was even worse than BLUP). The behaviour of EXTREME tended to be in between with its performance being as low as RANDOM with small p but becoming as good as (or higher than) TOP when p increased. Overall, the advantage of EXTREME over RANDOM was between 12% ($p=20%$) to 62% ($p=70%$).

As expected, the performance of ssGBLUP improved as the proportion of genotyped candidates increased. However, the increment in performance as p increased was at relatively slow rate at low p and increasing only at higher values of p . This was particularly true for the case of RANDOM and EXTREME, where genotyping less than 50% of the candidates yielded only a small proportion of the maximum gain expected when all candidates are genotyped. Overall, the benefit of ssGBLUP was almost linear with the proportion of candidates genotyped: genotyping an $x%$ of the candidates achieved around $x%$ of observed benefit of GBLUP over BLUP (with TOP having slightly higher performance and RANDOM the lowest). For p between 30% and 50%, TOP yielded between 47% and 64% of the extra gain observed with GBLUP, RANDOM between 24% and 47% and EXTREME between 34% and 55%. These results are different to previous studies which reported that most of the maximum gain can be achieved by genotyping a relatively small proportion of candidates (Granleese et al., 2019; Howard et al., 2018).

The GEBV reliability for the different ssGBLUP schemes expressed as efficiency is shown in Figure 4. The genotyping strategy with the highest reliability was EXTREME, followed by RANDOM, and TOP being the strategy with the lowest reliability. For p between 20% and 50%, the reliability with TOP was between 7% to 14% lower than those observed with RANDOM and EXTREME being 7% to 15% higher than RANDOM. Only when $p=70%$, TOP has slightly higher reliability than RANDOM. The fact that, consistently, RANDOM has greater reliability than TOP, seems contradictory considering that the simulation assumed discrete generation so, the advantage of a scenario should only be due to GEBV being better estimated. The reliabilities were re-estimated as the square of the Spearman's rank correlation to remove any potential bias due to scale effect. The results had the same trend as when using the Pearson's correlation, suggesting that the values on the reliabilities are not an artefact due to differences on scale (results not shown). Similarly, as with the genetic gain, across the range of proportion of candidate genotyped, the extra gain in reliability by ssGBLUP was almost linear with p .

To better understand the results, the reliability of genotyped and ungenotyped candidates were re-calculated separately (Figure 5). The reliability on the genotyped candidate group increased over generations, and the ranking of the methods was the same as the overall reliability calculated with all genotyped and ungenotyped candidates together: the best method was EXTREME, followed by RANDOM, and TOP being the one with the lowest reliability. On the other hand, the reliability on ungenotyped candidates decreased over the generations and the best method was RANDOM, followed by TOP and EXTREME. The proportion of genotyped candidates did not have the same effect as observed on the overall reliability: the reliability was slightly higher with low genotyping proportion (i.e. 10%), but thereafter, the reliability was similar across all p . Across all scenarios, the GEBV reliability of genotyped candidates were more than twice the reliability observed in the GEBV of ungenotyped candidates.

A major difference between the genotyping strategy schemes was the proportion of genotyped candidates which ended being selected. TOP tended to have the highest proportion of candidates selected while RANDOM had the lowest proportion of selected candidates which were genotyped (See Figure 6). Hence, the highest reliability of RANDOM seems to be achieved in candidates which have low chance to be selected, and therefore, lower gain is achieved compared with the TOP genotyping scheme.

Discussion

In this study, we assessed the effect of genotyping strategies and the proportion of genotyped candidates on the cumulated genetic gain when using ssGBLUP evaluation. The results from our simulation study showed that the highest genetic gain across several generations of selection is achieved with TOP, where candidates chosen to be genotyped are the best based on their phenotype (assumed known at the moment of the genotyping decision), followed by EXTREME and RANDOM. The advantage of TOP over RANDOM ranged between 38-108% extra benefit (i.e. extra response over that achieved by standard BLUP), across the tested range of proportions of genotyped candidates. The performance of EXTREME was close to RANDOM when the proportion of genotyped candidates was low, but it improved as the proportion increased. However, when comparing the strategies in term of their GEBV reliability, EXTREME had the highest values followed by RANDOM, with TOP being the strategy yielding the lowest reliability. The ranking of the genotyping strategies presented the same trend when considering only the group of genotyped candidates.

Several studies have been reported in the literature about the effect of genotyping strategies on the GEBV reliability/accuracy using simulation or real data. Although they tended to consider GBLUP scenarios (where the aim of the genotyping strategy is to select the reference population

to genotype and phenotype, but all candidates are assumed to be genotyped), it has frequently been shown that selection of the best candidates to be genotyped leads to the lowest accuracy/reliability on the candidates' GEBV, with the EXTREME strategy having the highest one (e.g. (Boligon et al., 2012; Jenko et al., 2017; Jiménez-Montero et al., 2012; Pszczola and Calus, 2016)). A more recent study assessed the effect of genotyping strategies under ssGBLUP scenarios similar to ours, where only a proportion of the current candidates are genotyped (Howard et al., 2018). Under very different assumptions, the authors also found that their scheme equivalent to TOP yielded the highest cumulated genetic gain, even though the genotyping scheme did not lead to the highest GEBV accuracy. Granleese et al. (2019) also studied the effect of genotyping with ssGBLUP, but they mainly assessed the effect of genotyping proportion and genotyping of male or female candidates.

At first impression, the observation that the highest genetic gain is not achieved by the strategy with the greatest GEBV reliability appears odd. Our simulations assumed discrete generations, so the cumulated gain is only due to a better estimation of the GEBV. However, such disparity can be explained by the fact that the enhanced reliability from ssGBLUP is mainly on the genotyped individuals, and the genotyping strategy dictates which candidates benefit from it. Whilst the genotyping strategy has a significant impact on the GEBV reliability, the differences between the genotyped and the ungenotyped candidates is substantially higher than the differences between genotyping strategies. The reliability observed here across genotyping strategies were at most ~50% higher/lower between each other; but the reliability of genotyped candidates was between 200% and 300% higher than that of ungenotyped candidates (see Figure 5).

The TOP scheme genotypes candidates with the highest phenotype, meaning that they are also likely to have the highest genetic merit (and higher chance of having high GEBV and being selected). But the genotyping protocol used with RANDOM and EXTREME means that some

genotyped candidates may have poor genetic merit (and lower GEBV and less chance of being selected). Hence, the set of selected candidates chosen with TOP is more likely to be based on more reliable GEBV than with RANDOM (and EXTREME with low p). This would explain why TOP achieves the highest genetic gain, even though its GEBV are, in average, lower than those obtained within RANDOM or EXTREME. Therefore, when only a proportion of candidates are genotyped, the aim should not only be to improve the estimates of genotyped candidates, but which candidates should benefit from the extra enhanced reliability. The practical implication is that the overall GEBV reliability is not an absolute and sufficient criterion for determining which scheme would maximise genetic gain across multiple generations.

Our conclusions related to the selection strategies agree with those reported by Howard et al. (2018), but they do not when considering the effect of the proportion of genotyped candidates. Howard et al. (2018) concluded that most of the benefit of the genomic evaluation over standard BLUP is achieved with a low proportion of genotyped animals, where genotyping ~60% of the candidates with TOP (or 80% with RANDOM) would achieve the same genetic gain as when genotyping all candidates. Furthermore, the results from Granleese et al. (2019) are even more extreme, who reported that genotyping only 20% of the TOP candidates would yield as much as 80% of the maximum benefit obtained when all candidates are genotyped. Our results are more modest, showing that the benefit of genomic selection increases slower when the proportion of genotyped candidates is low. With 70% of genotyped candidates, TOP and EXTREME achieved only around 80% of the maximum benefit when candidates are genotyped, and RANDOM achieved less than 50%.

The disagreements between our results and those from Howard et al. (2018) can be partly explained by differences in the assumptions used in the simulations. Firstly, in our study, the selection period under ssGBLUP involved eight discrete generations, whilst theirs included

three rounds of selection within an overlapping generation population structure. Hence, the results from Howard et al. (2018) may include some effects due to differences in generation interval between the scenarios with different proportion of genotyped candidates. In fact, as they pointed out, the less likely to be selected ungenotyped candidates from their TOP scheme tended to have older parents, which means that selected candidates tended to have younger parents leading to lower generation interval. Secondly, their assumption also allowed greater intensity of selection than ours at a given round of selection. Our simulation assumes that 10% and 50% of the male and female candidates are selected (i.e. 30 out of 300 males and 300 out of 600 females), but in their simulation, this proportion was only 4% and 40% (i.e. 20 out of ~500 males and 200 out of ~500 females). Thirdly, we assumed that phenotypes were used to decide which candidates to genotype with TOP, compared with their index based on EBVs for the trait itself and a correlated trait. Using the index would provide a better estimate of the candidate true genetic merit, thus improving the genotyping decision in TOP and, thereby, the genetic gain. Finally, Howard et al. (2018) assumed that a proportion of candidates are genotyped *a priori* the selection process, but any selected ungenotyped candidates is, thereafter, genotyped. This means that the ssGBLUP evaluation was done with a slightly higher number of genotyped candidates, which could have improved the performance of the ssGBLUP evaluation, especially at low p (e.g. for their scheme labelled as swine population assuming 20% genotyped, the actual average proportion of genotyped candidates was 28% and 26% for their equivalent RANDOM and TOP schemes, see their Table 1)). The results reported by Granleese et al. (2019) are more extreme (i.e. genotyping only 20% of the best candidates yielded up to 80% of the maximum benefit of GS), but their simulation was based on pseudo genomic testing where the genomic evaluation is approximated with the infinitesimal model using a bivariate model. Such approximation does not model the changes in LD during the

selection period and assumes lower loss in genetic variance, so the results in genetic gain may be overestimated.

Our results suggest that, for our assumptions on the population structure, the expected benefit of ssGBLUP is poor at low proportion of genotyped candidates and it does not increase as fast as reported previously in other studies. The pattern of diminishing return as the proportion of genotyped candidates increases, was not as strong and a plateau at intermediate proportion was not observed. Hence, given the differences between our results and those reported by Howard et al. (2018), the optimum p to achieve significant benefit from ssGBLUP is likely to be population specific and will need to be optimised in each breeding scheme.

Hence, if only a proportion of the candidates is to be genotyped, the consensus conclusion (from this study and that from Howard et al., (2018)) dictates to prioritise the genotyping of candidates which are more likely to be selected. This raises the need of *a priori* estimated breeding value (EBV) to rank the candidates so the best ones are genotyped (of course, from a simpler evaluation with lower reliability to justify the following ssGBLUP evaluation). In this study we assumed that candidates' phenotype were available, and used as the preliminary EBV to inform during the genotyping decision (c.f. Howard et al., (2018) used an index with EBVs calculated with phenotypes of the trait itself and from a correlated one in a standard BLUP evaluation). However, phenotypes (from the trait itself and/or from correlated ones) may not be available in traits expressed late in life. Parental information (phenotypes or GEBVs) may be used to inform the genotyping process, but as the candidates are not genotyped yet, the scheme would basically identify the best families to genotype (as all candidates from the same family will have the same parental score). Genotyping individuals from few families may not be the best strategy even if they are the best ones. Performance of genomic prediction declines when the candidates belong to different families to those included in a training population (Legarra et al., 2008), and it is expected to worsen within a ssGBLUP framework. Additionally, restrictions on selected

candidates per family to control inbreeding also undermine the efficiency of the ssGBLUP scheme. Hence, in practice, if phenotype information is not available when decision of genotyping is to be taken, a mixture of the TOP and the RANDOM strategies is likely to be the only possible option, where the best families are selected but few individuals within the family are selected at random. This could have serious impact of the efficiency of the scheme and, the proportion of genotyped candidate may need to be much higher in order to ensure a significant impact of the genomic prediction in the selection scheme.

Conclusions

When only a proportion of the candidates are to be genotyped, the best strategy is to prioritise genotyping of candidates which are more likely to be selected to ensure that genetic gain is maximised. However, the efficiency of ssGBLUP does not improve as fast as reported in other studies, as the proportion of genotyped candidates increases. Since the highest genetic gain is not achieved by the strategy with the greatest GEBV reliability, the latter parameter cannot be considered as an absolute and sufficient criterion for determining which scheme would maximise genetic gain across multiple generations.

List of Abbreviations

EBV: estimated breeding values

TBV: true breeding values

LD: linkage disequilibrium

GEBV: genomic estimated breeding values

GS: genomic selection

BLUP: best linear unbiased predictor

ssGBLUP: single step genomic linear unbiased predictor

GBLUP: genomic linear unbiased predictor

TOP: top phenotypic values

EXTREME: extreme phenotypic values

RANDOM: random phenotypic values

Declarations (please see our editorial policies for more information:

The authors declare that there is no conflict of interest.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

MS-M is funded by an FPI from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) (Ref. BES-2013-063614). RP-W and VR are funded by the Biotechnology and Biological Sciences Research Council through Institute Strategic Programme Grant funding

(BBS/E/D/30002275) and they also have received funding from the European Union's Horizon 2020 Programme for Research & Innovation under grant agreement 772787.

Authors' contributions

MS-M, VR, BG-G, PN, CSH, LF, JA-S and RP-W contributed in the design of the study, MS-M and RP-W performed the simulation, MS-M, RP-W and VR wrote the first draft. All authors were involved in the interpretation of results and approved the final manuscript.

References

- Boligon, A. A., N. Long, L. G. Albuquerque, K. A. Weigel, D. Gianola et al., 2012 Comparison of selective genotyping strategies for prediction of breeding values in a population undergoing selection. *Journal of Animal Science* 90: 4716-4722. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-4857>
- Christensen, O. F., and M. S. Lund, 2010 Genomic prediction when some animals are not genotyped. *Genetics Selection Evolution* 42. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-42-2>
- Christensen, O. F., P. Madsen, B. Nielsen, T. Ostersen and G. Su, 2012 Single-step methods for genomic evaluation in pigs. *Animal* 6: 1565-1571. <https://doi.org/10.1017/S1751731112000742>
- Doublet, A.-C., P. Croiseau, S. Fritz, A. Michenet, C. Hozé et al., 2019 The impact of genomic selection on genetic diversity and genetic gain in three French dairy cattle breeds. *Genetics Selection Evolution* 51: 52. <https://doi.org/10.1186/s12711-019-0495-1>
- García-Ruiz, A., J. B. Cole, P. M. VanRaden, G. R. Wiggans, F. J. Ruiz-López et al., 2016 Changes in genetic selection differentials and generation intervals in US Holstein dairy cattle as a result of genomic selection. 113: E3995-E4004. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519061113>
- Gianola, D., 2013 Priors in Whole-Genome Regression: The Bayesian Alphabet Returns. *Genetics* 194: 573-596. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.151753>
- Gianola, D., G. de los Campos, W. G. Hill, E. Manfredi and R. Fernando, 2009 Additive Genetic Variability and the Bayesian Alphabet. *Genetics* 183: 347-363. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.103952>
- Gómez-Romano, F., B. Villanueva, J. Fernández, J. A. Woolliams and R. Pong-Wong, 2016 The use of genomic coancestry matrices in the optimisation of contributions to maintain genetic diversity at specific regions of the genome. *Genetics Selection Evolution* 48: 2. <https://doi.org/10.1186/s12711-015-0172-y>
- Granleese, T., S. A. Clark and J. H. J. van der Werf, 2019 Genotyping strategies of selection candidates in livestock breeding programmes. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 136: 91-101. <https://doi.org/10.1111/jbg.12381>
- Hayes, B. J., P. M. Visscher and M. E. Goddard, 2009a Increased accuracy of artificial selection by using the realized relationship matrix. *Genetics Research* 91: 47-60. <https://doi.org/10.1017/S0016672308009981>
- Hayes, B., P. Bowman, A. Chamberlain and M. Goddard, 2009b Invited review: genomic selection in dairy cattle: progress and challenges. *J Dairy Sci* 92. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1646>
- Henderson, C.R., 1975. Best Linear Unbiased Estimation and Prediction under a Selection Model. *Biometrics*. <https://doi.org/10.2307/2529430>
- Henderson, C. R., 1984 Applications of linear models in animal breeding. University of Guelph Press.

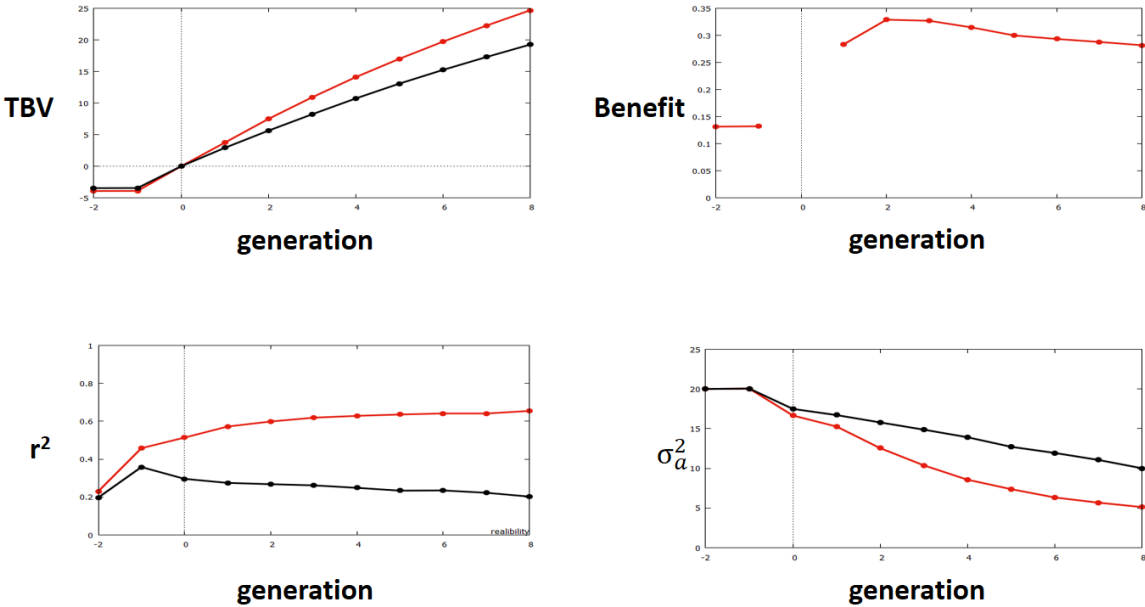
- Howard, J. T., T. A. Rathje, C. E. Bruns, D. F. Wilson-Wells, S. D. Kachman et al., 2018 The impact of selective genotyping on the response to selection using single-step genomic best linear unbiased prediction. *Journal of Animal Science* 96: 4532-4542. <https://doi.org/10.1093/jas/sky330>
- Jenko, J., G. R. Wiggans, T. A. Cooper, S. A. E. Eaglen, W. G. D. Luff et al., 2017 Cow genotyping strategies for genomic selection in a small dairy cattle population. *Journal of Dairy Science* 100: 439-452. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11479>
- Jiménez-Montero, J. A., O. González-Recio and R. Alenda, 2012 Genotyping strategies for genomic selection in small dairy cattle populations. *Animal* 6: 1216-1224. <https://doi.org/10.1017/S1751731112000341>
- Knol, E.F., Nielsen, B., Knap, P.W., 2016. Genomic selection in commercial pig breeding. *Animal Frontiers* 6, 15–22. <https://doi.org/10.2527/af.2016-0003>
- Legarra, A., I. Aguilar and I. Misztal, 2009 A relationship matrix including full pedigree and genomic information. *Journal of Dairy Science* 92: 4656-4663. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2061>
- Legarra, A., O. F. Christensen, I. Aguilar and I. Misztal, 2014 Single Step, a general approach for genomic selection. *Livestock Science* 166: 54-65. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.04.029>
- Legarra, A., C. Robert-Granie, E. Manfredi and J. M. Elsen, 2008 Performance of genomic selection in mice. *Genetics* 180: 611-618. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.088575>
- Meuwissen, T. H. E., B. J. Hayes and M. E. Goddard, 2001 Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157: 1819-1829. <https://doi.org/10.1129/0733>
- Misztal, I., S. E. Aggrey and W. M. Muir, 2013 Experiences with a single-step genome evaluation. Presented as part of the Experimental Design for Poultry Production and Genomics Symposium at the Poultry Science Association's annual meeting in Athens, Georgia, July 12, 2012. *Poultry Science* 92: 2530-2534. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02739>
- Pszczola, M., and M. P. L. Calus, 2016 Updating the reference population to achieve constant genomic prediction reliability across generations. *animal* 10: 1018-1024. <https://doi.org/10.1017/S1751731115002785>
- Riggio, V., Abdel-Aziz, M., Matika, O., Moreno, C.R., Carta, A., Bishop, S.C., 2014. Accuracy of genomic prediction within and across populations for nematode resistance and body weight traits in sheep. *Animal* 8, 520–528. <https://doi.org/10.1017/S1751731114000081>
- Tsai, H.-Y., Hamilton, A., Tinch, A.E., Guy, D.R., Bron, J.E., Taggart, J.B., Gharbi, K., Stear, M., Matika, O., Pong-Wong, R., Bishop, S.C., Houston, R.D., 2016. Genomic prediction of host resistance to sea lice in farmed Atlantic salmon populations. *Genetics Selection Evolution*. 48, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12711-016-0226-9>
- VanRaden, P. M., 2008 Efficient Methods to Compute Genomic Predictions. *Journal of Dairy Science* 91: 4414-4423. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0980>
- VanRaden, P. M., C. P. Van Tassell, G. R. Wiggans, T. S. Sonstegard, R. D. Schnabel et al., 2009 Invited review: Reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. *Journal of Dairy Science* 92: 16-24. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1514>

Wolc, A., A. Kranis, J. Arango, P. Settar, J. E. Fulton et al., 2016 Implementation of genomic selection in the poultry industry. *Animal Frontiers* 6: 23-31. <https://doi.org/10.2527/af.2016-0004>

Woolliams, J. A., P. Berg, B. S. Dagnachew and T. H. E. Meuwissen, 2015 Genetic contributions and their optimization. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 132: 89-99. <https://doi.org/10.1111/jbg.12148>

Figures

Figure 1. Comparison of the response to selection when using GBLUP (red lines) and BLUP (black lines) evaluation across all generations.



TBV: true breeding value. r^2 : reliability. σ_a^2 : genetic variance. Benefit: benefit of GBLUP across all generations.

Figure 2. Response to selection across generations for the ssGBLUP scenarios where only a proportion of the candidates are genotyped. Graphs in top row show the cumulative genetic gain (TBV), graphs in middle row show the reliability (r^2), and graphs in bottom row show the genetic variance (σ_a^2). The scenarios are for genotyping strategies (RANDOM: left column, TOP: middle column and EXTREME: right column) and different proportion of candidates genotyped (— 70%, — 50%, — 40%, — 30%, — 20% and — 10%). Results from GBLUP (—) and BLUP (—) are also shown as they are the respective upper and lower limit of ssGBLUP, equivalent to the situations where 100% and 0% of the candidates are genotyped.

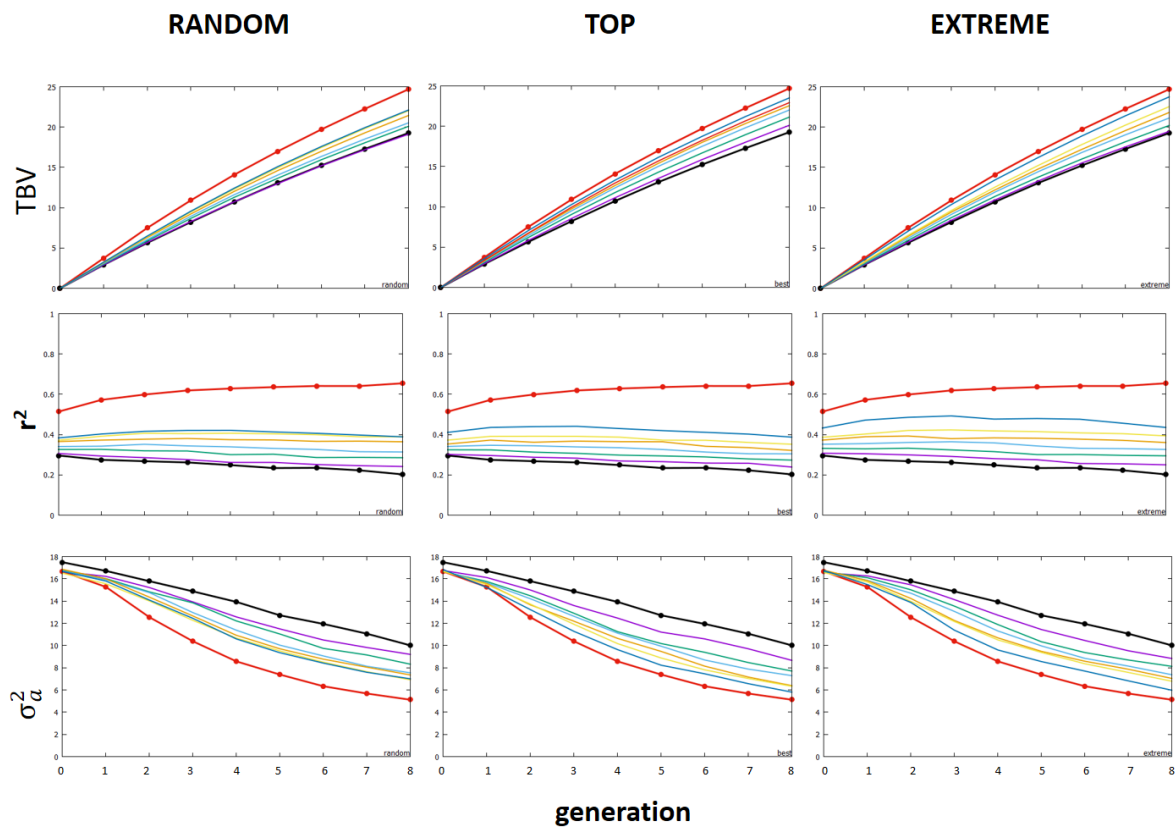


Figure 3. Efficiency of the ssGBLUP in terms of their cumulative genetic response for the different genotyping strategies (—RANDOM, —TOP, —EXTREME) and proportion of genotyped candidates (one per graph). The dotted line in each graph indicates the proportion of candidates which were genotyped in the corresponding scenario.

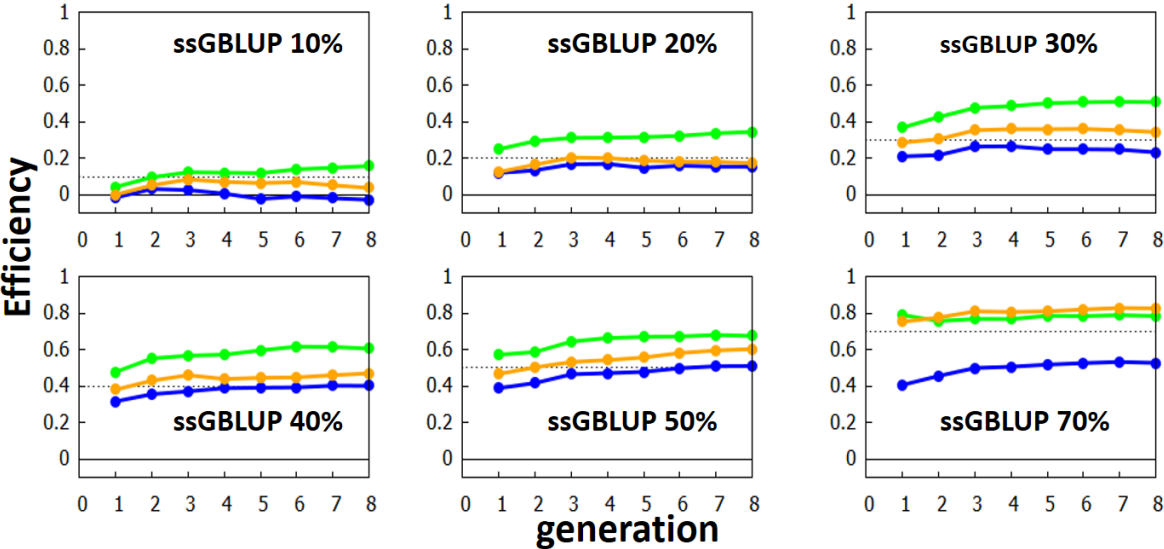


Figure 4. Efficiency of the ssGBLUP in term of their overall reliability (combining both genotyped and ungenotyped animals) for the different genotyping strategies (— RANDOM, — TOP, — EXTREME) and proportion of genotyped candidates (one per graph). The dotted line in each graph indicates the proportion candidates which were genotyped in in the corresponding scenario shown in the graph in question.

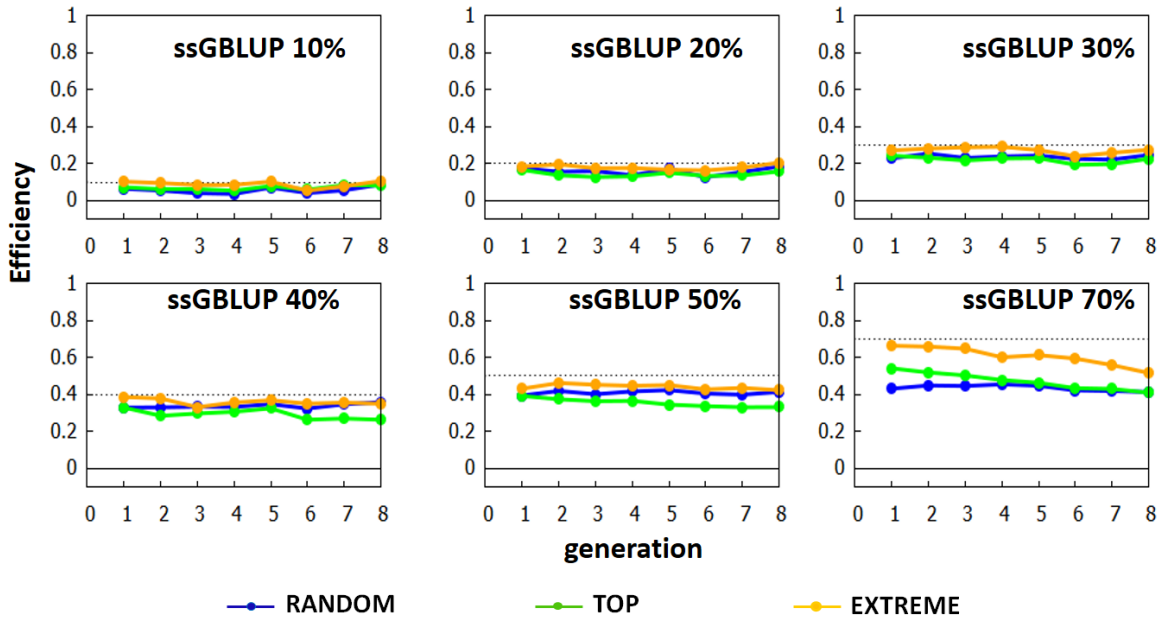


Figure 5. Reliability of ssGBLUP for group of genotyped and ungenotyped candidates for p=10% (left), 40% (middle) and 70% (right) and different genotyping strategies (— RANDOM, — TOP, — EXTREME).

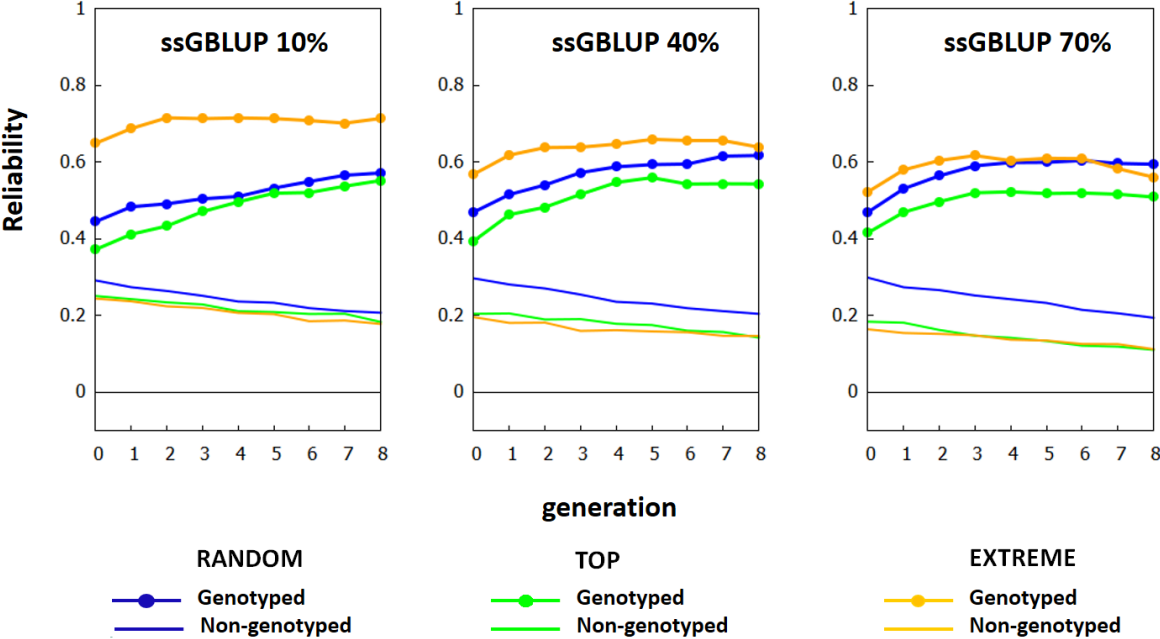
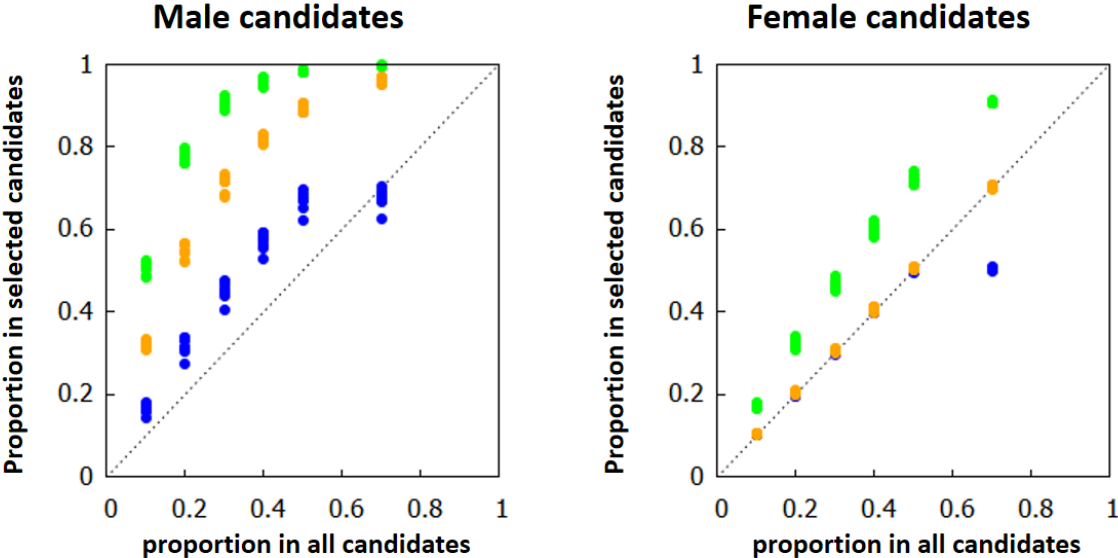


Figure 6. Proportion of the genotyped male (left) and female (right) candidates which were selected as parent of the next generation across the three different genotyping strategies (— RANDOM, — TOP, — EXTREME). Each point is the value for one replicate (100 rep) across the 6 proportion of genotyped candidates (i.e. 10, 20, 30, 40, 50 & 70%). 1 in the y-axis means that all genotyped candidates of a given sex were selected and 0 means none was selected.



Chapter 3. Phenotypic and genetic parameter estimates of cheese-making traits and their relationship with milk production, composition and functional traits in Spanish Assaf sheep.

Phenotypic and Genetic Parameter Estimates of Cheese-Making Traits and their Relationships with Milk Production, Composition and Functional Traits in Spanish Assaf Sheep.

Milagros Sánchez-Mayor¹, Ricardo Pong-Wong², Beatriz Gutiérrez-Gil¹, Ana Garzón³, Luis Fernando de la Fuente¹ and Juan José Arranz^{1†}

¹ *Dpto. Producción Animal, Universidad de León, Campus de Vegazana, 24071, León, Spain.*

² *The Roslin Institute and R(D)SVS, University of Edinburgh, Easter Bush, Midlothian, EH25 9RG, United Kingdom.*

³ *Dpto. Producción Animal, Universidad de Córdoba, Campus Universitario de Rabanales. 14071, Córdoba, Spain.*

†Corresponding author: Juan José Arranz. Email: jjarrs@unileon.es

Declarations of interest: none.

Published in *Livestock Journal*, 2019. Volume 228, Pages 76-83, ISSN 1871-1413, <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.08.004>.

Abstract

Sheep milk is mostly used for the production of cheese. In this study, a commercial population of Spanish Assaf sheep was analysed for six cheese-making traits: four related to milk-coagulation properties (MCPs) [rennet coagulation time (RCT), curd-firming time (K_{20}), and curd firmness at minutes 30 and 60 (A_{30} , A_{60})] and two related to cheese yield [individual laboratory cheese yield (ILCY) individual laboratory dried curd yield (ILDCY)]. Records for milk production traits were also available for this study. Restricted maximum likelihood (REML) analysis was used to estimate the genetic parameters and variance components, whereas bivariate models were used to calculate the phenotypic and genetic correlations among the traits considered in this work. Of the 1,143 milk samples included in the study, 147 (13%) did not coagulate, whereas 425 samples (approximately 37%) showed slow coagulation (samples with a record for A_{60} and a missing record for A_{30}). Also, large mean values were observed for RCT (29.54 min) and $\log K_{20}$ (1.35 min). The heritabilities estimated for the cheese-making traits were moderate, ranging between 0.15 (for ILDCY) and 0.30 (A_{30} and ILCY). In general, within the pairs of related cheese-making traits, we found moderate-high phenotypic and genetic correlations. The RCT and $\log K_{20}$ traits showed high negative correlations with A_{30} and A_{60} at both the genetic and phenotypic levels. From the estimation of genetic parameters among these and several milk traits, the high and positive genetic correlations observed between PP and the two cheese yield traits should be highlighted. Based on the estimated phenotypic correlations, our study supports that subclinical mastitis is related to a delayed gelification of milk and lower curd firmness. Overall, this study provides the first report about the phenotypic and genetic parameters of cheese-making traits in a commercial population of Assaf sheep, offering preliminary information that might help to identify the cheese-making or related milk production traits that could be considered to improve Assaf population towards enhanced cheese performance features.

Keywords: Dairy sheep; milk coagulation properties; cheese-making traits; heritability.

Introduction

Spain is one of the largest producers of sheep's milk, with approximately 20% of the total milk produced in the European Union (EUROSTAT, 2019). Traditionally, Manchega, Churra and Latxa were the most important autochthonous dairy breeds, but recently, the Assaf breed, which is a stabilized cross of the Awassi and East Friesian breeds, has become one of the main dairy sheep breeds (De la Fuente et al., 2006). The Assaf breeders' association (ASSAFE) manages a genetic programme for the improvement of milk production and milk quality in this breed, with a total of 131 flocks involved. The Assaf breeding programme started in 2005 and currently takes into account three traits within the selection index: milk yield (MY), fat yield (FY) and protein yield (PY), all of them standardized to 150 days (ASSAFE, 2018). In the Spanish Assaf breed, genetic parameters for milk yield traits (test-day MY, 180d-lactational standardized MY, and lactation length MY) have been estimated (Gutiérrez et al., 2007), with heritability estimates for MY180 ranging from 0.131 to 0.177. Besides, a study relating udder morphological traits to milk content in this breed has shown that udder depth and length were the most correlated traits to milk production (Pérez-Cabal et al., 2013).

Because most sheep milk is used for the production of high-quality cheese, the study and control of the genetic and environmental factors influencing not only milk production and quality traits but also the technological properties of sheep milk are a major challenge for the dairy sheep industry. Among the indicators of cheese-making ability are traits related to the milk coagulation properties (MCPs) (Bynum and Olson, 1982; Ikonen et al., 1999; McMahon and Brown, 1982) and different measurements of cheese yield (Othmane et al., 2002a, 2002b). The MCPs are sometimes measured by four parameters: the rennet clotting time (RCT, minutes),

the time necessary for the curd to reach an appropriate firmness (K_{20} , minutes) and the curd firmness at a given time (A_{30} and A_{60} , both measured in millimetres). The individual laboratory cheese yield (ILCY) is one of the most standard indicators of cheese yield (Manca et al., 2016; Othmane et al., 2002a, 2002b). Studies on the genetic bases of these indicators in sheep are scarce, and most of them are based on Sarda sheep (Bittante et al., 2017; Pazzola et al., 2014; Puledda et al., 2017; Vacca et al., 2015). In Spanish breeds, genetic parameters have been studied in Churra sheep for ILCY (Othmane et al., 2002a, 2002b), whereas Jaramillo et al. (2008) assessed the phenotypic correlations between MCPs and cheese traits in the Manchega and Guirra sheep breeds.

In cattle, different studies have reported moderate estimates of heritability for the RCT and A_{30} traits (range 0.10-0.60) and high genetic correlations between these traits (reviewed by Bittante et al., 2012). The small number of studies focussed on these traits in sheep have reported similar and moderate values of heritability for RCT (0.16-0.23) and lower estimates for A_{30} ; 0.08-0.14 (Bittante et al., 2017; Puledda et al., 2017). Given that no previous studies have focussed on these traits in the Assaf sheep breed, the objective of this work was to estimate the genetic parameters of cheese-making traits, including MCP and cheese yield traits, in a commercial population of Assaf sheep. In addition, an exploratory study about the phenotypic and genetic correlations of the considered cheese-making traits with milk production traits and other functional traits measured by ASSAFE in the same animals is also presented.

Materials and Methods

Animals, milk sample collection and laboratory analysis

The study included a population of 1,143 Assaf ewes from three different flocks located in the region of Castilla y León, Spain. The animals belonged to the ASSAFE Selection Nucleus, and

all of them had paternity control tested by microsatellite markers. Each ewe was sampled once between November 2016 and February 2017 to obtain individual milk samples from weeks 1 to 39 after parturition. The distribution of the collected samples per flock and day is shown in Table 1. Pedigree information for the sampled ewes that included 11,113 individuals over 6 generations was available, as were explanatory variables related to the sampling day: flock test-day (FTD), with 12 levels; age at parturition (AGE), in 7 levels (level 1: animals aged under 13 months; level 2: animals with range of age 13-18 months; level 3: animals with range of age 19-24; level 4: animals with range of age 25-36; level 5: animals with range of age 37-48; level 6: animals with range of age 49-84; and level 7: animals older than 85 months); number of born lambs (NBL), with 2 levels and the days in milk (DIM).

From each ewe, a sample of 50 ml of milk was collected in the morning milking. The samples were kept refrigerated during transportation from the farm to the laboratory, where they were analysed to determine cheese-making properties at 15 h after collection. In addition to the pH, six cheese-making traits, grouped into two groups, were measured in these analyses:

- Milk coagulation properties were monitored at 32°C with a Formagraph viscometer (Foss Electric) using commercial liquid rennet extract (1:15.000; >70% chymosin, <30% bovine pepsin; 185 IMCU/mL) diluted to 4% in distilled water for 60 min (Caballero-Villalobos et al., 2018), producing a lactodynamographic path as reported by McMahon and Brown (1982). Values for the following traits were obtained: *RCT* (min), rennet clotting time or the time between rennet addition and the start of the milk coagulation; *K₂₀* clotting speed (min), which is the time necessary for the curd to reach a 20 mm firmness; and *A₃₀* and *A₆₀* (mm), which are the curd firmness at 30 and 60 min after rennet addition.
- Cheese yield traits: To determine the individual laboratory cheese yield (ILCY (g/10 ml of milk), and following Othmane et al. (2002a, 2002b), the resulting gels were cut with

a spatula and centrifuged for 30 min at $2,800 \times g$ and 37°C to separate the curd from the whey (the whey is discarded). Finally, the centrifuge residues (drained curds) were individually weighed to estimate ILCY (expressed in g/10 mL). The individual laboratory dried curd yield (ILDCY) was estimated by maintaining the drained curds in an oven (100°C) for 24 h, and after cooling in a dryer, the samples were weighed (also expressed in g/10 mL).

Genetic parameter estimation for cheese-making traits

Restricted maximum likelihood (REML) analyses were carried out to estimate the heritabilities and the phenotypic and genetic correlations among the traits with the ASREML software version 4.1 (VSN International Ltd, Hemel Hempstead, UK) (Gilmour et al., 2014). Ideally, a full multivariate analysis, including all traits, would be the most appropriate analysis to estimate the genetic relationships among these traits. However, this was not feasible because of the size of the dataset and the high correlations shown between some of the traits. Therefore, the missing values of each pair of traits were removed, and the genetic and environmental correlations between these pair of traits were estimated with a bivariate analysis, including the two traits in question. The following bivariate model was used in all analyses and was written as in Mrode (2014):

$$\begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_1 & 0 \\ 0 & X_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} Z_1 & 0 \\ 0 & Z_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a_1 \\ a_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \end{bmatrix}$$

where y_i is the vector of observations of the i^{th} trait; b_i is the vector of fixed effects for the i^{th} trait; a_i is the vector containing the random additive effects of the i^{th} trait; e_i is the vector of the residual effects for the i^{th} trait; and X_i and Z_i are the incidence matrix relating observation y_i to b_i and a_i , respectively, for the i^{th} trait. The fixed effects were DIM as a covariate and FTD, AGE and NBL as factors.

Estimates of genetic and phenotypic correlations between cheese-making traits and milk traits

As part of their genetic improvement programme, ASSAFE routinely records several “milk traits”, including production, composition and functional traits, for all their flocks. These include milk production traits such as milk yield (MY, kilograms), fat yield (FY, kilograms), protein yield (PY, kilograms) and lactose yield (LY, kilograms); milk composition traits such as protein percentage (PP, %), fat percentage (FP, %), lactose percentage (LP, %); and functional traits such as milk urea (mg/mL) and somatic cell count (SCC, number of cells per mL). We will refer to all these traits as milk traits.

Hence, we carried out an additional exploratory analysis to estimate phenotypic and genetic correlations between the cheese-making traits and the production and functional traits collected by ASSAFE. For this analysis, the phenotypic records used for the milk traits were the measurements from the closest official test-day record to the cheese-making trait sampling day, considering instead of SCC, its binary logarithm transformation (LSCC). Our initial intention was to coordinate MCP trait sampling with ASSAFE's official milk control. Due to the logistical impossibility of joining the two sampling teams on the farms on the same day, the MCP samples were taken on a day as close as possible to the official milk test-day. In this way, all the samples were taken in a short period from the official test-day (range 1 to 13 days). According to previous studies of our research group, the milk samplings carried out with these differences of a few days yield an acceptable accuracy in the results of further analyses (Gonzalo et al., 2003), although we recognize that the environmental correlation, and thereby the phenotypic correlation, maybe slightly biased downwards zero. However, the correlation estimates reported here between the cheese-making traits, and the milk traits should be considered as preliminary results, and a further study may be needed to validate them. The genetic parameters linking

milk traits with cheese-making traits were also estimated using bivariate analyses fitting the same model described previously.

Hence, also using ASREML_v4.1, a total of 120 bivariate analyses were performed to estimate the correlations between the 16 traits finally considered. Heritabilities were estimated using the genetic and environmental variance estimated in the corresponding bivariate analyses. Because each trait was included in 15 bivariate analyses, there was the same number of estimates for their genetic and environmental variances. Hence, the weighted average was calculated using the inverse of their squared standard error as the weighting factor.

Also, with the aim of graphically explore the phenotypic variance and relationships among the studied traits, we performed a principal component (PC) analysis carried out using R software (R Core Team, 2019).

Results

Descriptive statistics for cheese-making traits

Of the 1,143 samples included in the study, 147 showed missing data for all of the cheese-making traits analysed (non-coagulating samples within 60 min from the addition of the clotting enzyme). Hence, the non-coagulating samples in this study represented approximately 13% of the total samples and were not included in any further analysis. Furthermore, the samples with $K_{20} = 60$ min ($n = 50$, $\approx 4\%$) and $A_{30} \leq 1$ mm ($n = 425$, $\approx 37\%$) were also declared as missing values for the analysis of these traits. Hence, the missing data for K_{20} and A_{30} reached 17% ($n=197$) and 50% ($n=572$) of the samples, respectively. After data editing and the log-transformation of K_{20} ($\log K_{20}$), the final descriptive statistics for cheese-making traits are shown in Table 2. Note that those samples with records for A_{60} but missing for A_{30} were those showing slow coagulation. In general, for the coagulating milk samples analysed, the cheese-

making traits studied showed a large coefficient of variation (CV). These coefficients of variation ranged from 16.50% to 62.77% (Table 2).

Genetic parameters for cheese-making traits

Heritabilities and genetic and phenotypic correlations estimated for the studied cheese-making traits, as well as the pH measurement, are provided in Table 4. The heritability estimate for pH was 0.46, whereas those for the cheese-making traits were moderate, ranging between 0.15 (for A₆₀ and ILDCY) and 0.30 (A₃₀ and ILCY).

In general, within the pairs of related traits, we found moderate-high phenotypic and genetic correlations. Hence, we estimated high positive genetic and phenotypic correlations between RCT and logK₂₀ (0.87 and 0.65, respectively), whereas A₃₀ and A₆₀ showed high genetic correlation (0.85) and moderate phenotypic correlation (0.38). The two cheese yield traits (ILCY and ILDCY) also exhibited high positive genetic and phenotypic correlations between them (0.88 and 0.81). On the other hand, RCT and logK₂₀ showed high negative correlations with A₃₀ and A₆₀ at both the genetic and phenotypic levels (range from -0.59 to -0.94). Phenotypic correlations between the four MCPs (RCT, logK₂₀, A₃₀, and A₆₀) and the two cheese yield traits (ILCY, ILDCY) were low, ranging from -0.13 to 0.14 (Table 4). The genetic correlations of the cheese yield traits with the MCP traits showed inaccurate estimates with large standard errors. Phenotypically, pH was positively correlated with RCT (0.68) and logK₂₀ (0.61), whereas it was negatively correlated with A₃₀ (-0.56) and A₆₀ (-0.55). The genetic correlations of pH with the four MCP traits were high (range: -0.80 to 0.81), positive with RCT and logK₂₀ traits and negative with the curd firmness traits. The genetic correlations between pH and cheese yield traits showed lower accuracy, although supporting at the genetic level the negative direction of the phenotypic correlation identified with ILDCY.

Genetic parameters for milk traits and their correlations with cheese-making traits

For all the milk traits considered in this study, including production, composition, and functional traits, the descriptive statistics and the genetic parameters are shown in Table 3 and Table 5, respectively. The estimated heritabilities for all these traits were low to moderate, ranging from 0.04 for FP to 0.34 for MY. The phenotypic correlations estimated for this group of traits ranged between -0.46 (between LSCC and LP) to 0.99 (between LY and MY) and showed low standard errors. In relation to the genetic correlations, MY showed very high and positive estimates with the rest of yield traits (range 0.96 to 0.99 with PY, FY, and LY) and high and negative with PP (-0.62), whereas the rest of genetic correlations obtained showed, similarly than for the cheese-making traits, low accuracy due to high standard errors (Table 5).

The phenotypic and genetic correlations of the cheese-making traits with the milk traits are shown in Table 6. Globally the phenotypic correlations between cheese-making traits and the milk traits considered were very low. Only in the case of the cheese-yield traits (ILCY and ILDCY) moderate and positive phenotypic estimates were found with PP and FP (range 0.25-0.39), whereas these traits also showed moderate negative correlations with MY (-0.24, -0.20), related to the similar correlation observed between RCT and LP (-0.17). Also, it is worthy of mentioning that the LSCC trait showed low to moderate correlations with the cheese-making traits, positive with RCT, logK₂₀, ILCY and ILDCY (range from 0.07 to 0.22) and negative with the curd firmness traits (A₃₀ and A₆₀). On the other hand, most of the genetic correlations estimated between cheese-making traits and milk traits showed high standard errors to properly assess the level of genetic relationship between traits. Only in the case of the cheese-yield traits with PP, for which the highest phenotypic correlations had been observed, the estimates showed

a proper accuracy indicative of a high positive genetic correlation (0.73 and 0.89, for ILCY and ILDCY, respectively).

Finally, the results from the PC analysis performed for the 16 studied traits showed that the first component explains 25.8% of the total variance, the second 18.8% and the third 12.8% (Figure 1A and 1B). We can observe that PC1 mainly discriminates the yield traits (MY, FY, PY) and LSCC. On the other hand, PC2 separated the MCP related to dynamic of coagulation (RCT and $\log K_{20}$), and also the pH, from all the rest of cheese-related traits (A_{30} , A_{60} , ILCY, and ILDCY). Lastly, PC3 was the component that distributed the curd firmness traits (A_{30} , A_{60}) in one sense, and cheese-yield traits associated with milk content traits (FP and PP) in the opposite sense.

Discussion

In this study, genetic parameters for cheese-making traits were estimated in a commercial population of the Spanish Assaf breed. To the best of our knowledge, this is the first time that such traits have been studied in this population. Considering that the entire milk production from the Spanish Assaf is used in the cheese-making industry, the results from this study may be helpful to set the objectives for an optimum selection programme in this population.

The mean value observed here for ILCY is comparable to those previously reported in the Churra breed (Othmane et al., 2002a, 2002b), but slightly lower than those found in Manchega, Guirra and Sarda sheep (Jaramillo et al., 2008; Puledda et al., 2017). However, the average value for traits related to milk coagulation properties compares less favourably with other sheep breeds. The mean values for RCT and K_{20} are slightly higher than those reported in other sheep breeds (Manchega, Guirra and Sarda sheep) (Bittante et al., 2017; Jaramillo et al., 2008; Pazzola et al., 2014; Puledda et al., 2017). These mean values are also higher when compared with mean values observed in dairy cattle, disagreeing with some suggestions that coagulation time is shorter in sheep than cattle (Bencini, 2002; Bittante et al., 2012).

It should be noted that short RCT and K_{20} times are desirable for speeding up the cheese-making process. In the present study, the percentage of milk samples that did not coagulate within 30 min after rennet addition (approximately 13%) was slightly higher than in other studies in sheep (Bittante et al., 2014; Pazzola et al., 2014; Puledda et al., 2017). Several milk components may be linked to non-coagulating milk, such as somatic cell count, the percentages of fat, protein and lactose in milk and the concentration of caseins and Ca^{+2} (Caballero-Villalobos et al., 2018, 2015; Lucey, 2008; Malacarne et al., 2014). Furthermore, other external factors, such as milk temperature before enzyme addition, may have a key influence on non-coagulating samples (Bittante et al., 2012; Nájera et al., 2003). Interestingly, in their comparative review of studies on MCP traits, Bittante et al. (2012) found that the temperature to which samples were heated before enzyme addition could affect the coagulation time and curd firming. Hence, these authors suggested that the use of low temperature (32°C versus 35°C) could have delayed coagulation and curd firming. This might be a possible explanation for the high proportion of samples showing slow coagulation (~ 13%) and low curd firming (~37%) reported in the present work, where MCPs were monitored at 32°C. The choice of this temperature in the present work was aimed to mimic, as much as possible, the conditions of the industry producing hard sheep's cheeses. Furthermore, although the coagulation of the samples was generally slower, the individual cheese content values were among those expected in sheep's milk.

The heritability estimates observed in this study for the considered cheese-making traits (ranging from 0.15 to 0.30) are, in general, higher than those reported for these traits in other sheep breeds (Bittante et al., 2017; Puledda et al., 2017). In particular, for ILCY, Othmane et al. (2002a, 2002b) reported much lower heritabilities in Churra sheep (0.08-0.09). Also, the heritability estimate reported here for MY (0.34) was higher than the ranges reported for Assaf sheep by Gutierrez et al. (2007). These discrepancies can be explained by the fact that our study only included three flocks from the breed selection nucleus, which showed a very uniform

management system. Hence, although the estimates reported here would suggest that cheese-making traits may be improved through genetic selection in Assaf sheep, the reported heritability estimates should be taken with caution as they might not be representative of the global Assaf commercial population.

Based on the phenotypic and genetic correlations estimated within the pairs of related traits (RCT and $\log K_{20}$; A_{30} and A_{60} ; ILCY and ILDCY) it can be suggested that, in practice, the consideration of only one trait of each of these pairs within a selection scheme would be sufficient to provide valuable information about the corresponding technological property. The high genetic and phenotypic correlations between RCT and $\log K_{20}$ (0.79 and 0.84, respectively) were also reported by Puledda et al. (2017) in Sarda sheep, whereas for the other pair of traits only A_{30} and ILCY were considered by these authors. Considering also the correlations estimated among the different pair of traits, and focusing only on those estimates showing an appropriate level of accuracy, we can discriminate, globally, two major groups of traits. Firstly, the four MCP traits are linked through high and negative phenotypic/genotypic correlations between the two types of MCP traits, RCT and $\log K_{20}$, on the one hand, and curd firmness traits, A_{30}/A_{60} , on the other. Interestingly, this negative strong association between coagulation time traits and firmness traits, which were also graphically reflected by the divergent direction of these traits within PC2 by our PC analysis (Figure 1A), has a positive point of view for the practice, as selection towards faster coagulation would involve selection for higher curd firmness, and reversely.

On the other hand, we observed a lack of remarkable correlations between the cheese yield traits and the four studied MCP traits, with low phenotypic correlations and inaccurate genetic correlations, the later probably explained by the lack of appropriate genetic connexions among the limited number of studied flocks. These results would suggest that, for this population, although selection would be made for one MCP indicator trait, there would be the need for

specific consideration of cheese yield traits, especially ILCY because of its higher heritability. However, it is important to consider that Puledra et al. (2017) reported moderate-high phenotypic correlations between ILCY and MCP related traits, positive with the RCT/logK₂₀ traits (range 0.32-0.64) and negative with A₃₀ (-0.34, -0.67, respectively for the phenotypic and genotypic correlations).

On the other hand, the high number of missing values observed here for the A₃₀ trait would suggest, for a better technical study of the MCP traits in this population, the extension of the analysis of the lactodynamographic test to 60 minutes instead of using the traditional testing time of 30 minutes. Although the genetic parameters estimated A₃₀ and A₆₀ do not appear to support this because (heritability for A₃₀ is higher than for A₆₀), Vacca et al. (2015) also suggested the extension of the lactodynamographic test up to 60 min after demonstrating that the use of the A₃₀ parameter led to a misleading interpretation of the coagulation process due to a great variation in the syneresis rate of the milk samples. Syneresis corresponds to the stage of whey expulsion that can follow the coagulation, and these authors observed samples showing a high syneresis rate and others, showing a complete lack of syneresis. In our study, only 8 out of the 996 samples that coagulated within 60 min showed signs of syneresis (A₆₀ value lower than A₃₀). Hence, although syneresis did not appear to be a major factor influencing the final curd firmness, our results also suggest the use, in our conditions, of A₆₀ over A₃₀ due to the slow coagulation detected in the analysed milk samples. On this regard, several authors have suggested that longer coagulation time related to an elevated SCC is associated to weak coagulum leading to poor syneresis increased moisture content, lower cheese yield, and lower fat contents (Albenzio and Santillo, 2011). Bencini (2002), considering that also other factors, such as an increased pH, may increase the RCT, also suggested measuring curd consistency at a later stage than the classical 30 min.

With regard to the correlations between the pH measurements with the different cheese-making traits, the observed strong phenotypic and genotypic correlations of pH with MCPs shows that a decrease in pH increases the coagulation time and reduces the curd firmness, supporting pH as a major factor affecting clotting properties of individual sheep milk samples, as shown by other authors (Bencini, 2002; Bittante et al., 2017). Caballero-Villalobos et al. (2018) studied the coagulation efficiency in a population of Manchega sheep, and they found that pH harmed MCP. However, pH showed lower correlations with ILCY, suggesting that the impact of this factor on the final cheese yield is not remarkable.

In relation to the correlations estimated between cheese-making traits and milk traits in the present work, we consider that the most important observations are the positive correlations estimated between cheese-yield traits and milk content traits and which are in agreement with the correlations reported by Puledda et al. (2017) between ILCY and PP (0.37 and 0.75, respectively for the phenotypic and genetic correlations). Although the phenotypic correlations with PP and FP were moderate for both ILCY and ILDCY, we would like to highlight the implications, at the practical level, of the high and positive genetic correlations observed between PP and the two cheese yield traits. Hence, the selection on the favour of higher PP, which is an easy to measure trait, is expected to have an associated positive effect on cheese yield. Because the traits currently considered in the selection index of Assaf sheep (MY, PY and FY) showed negative correlations with the two considered cheese yield traits, the consideration of the PP trait in the selection index of this breed could be advisable to improve cheese performance.

The other potential practical implications of the correlations reported here for cheese-milk traits and milk traits would involve the phenotypic correlations identified between the LSCC traits and the different cheese-making traits studied (again the genotypic correlations did not show sufficient accuracy). Hence, based on these phenotypic estimates, a higher LSCC would be

related to a slightly longer coagulation time with a certain increased of cheese yield and decreased of curd firmness. These phenotypic correlations agree with those reported by Puledda et al. (2017), for which also the corresponding genetic correlations showed large standard errors. Also, Pazzola et al. (2018) and Caballero-Villalobos et al. (2015), in Sarda and Manchega sheep breeds, respectively, have shown that from a phenotypic point of view, higher LSCC levels caused a delayed gelification of milk, longer curd firming time and lower curd firmness after 30 min of rennet addition. On the contrary, Koutsouli et al. (2015) observed that the MCP traits were not affected by somatic cell count in two Greek dairy sheep breeds whereas Leitner et al. (2016), in Israeli sheep, reported no correlation between bulk milk tank somatic cell and MCP traits for counts below 3264×10^3 . Hence, and especially with potential genetic correlations, we consider that further studies showed be specifically designed to better understand the effect of LSCC on sheep cheese-making traits.

The low magnitudes of the phenotypic correlations observed in this study between cheese-making traits and milk traits may be explained by the influence of random environmental noise. Such a trend has been reported in previous studies for these traits. According to the review of Bittante et al. (2012), the phenotypic correlations between RCT and milk traits are low-moderate or null in dairy cows. For instance, the phenotypic correlations between MCPs and milk yield were not significant (low or negligible) in the dairy cows studied by Ikonen et al. (1997, 2004) and Cipolat-Gotet et al. (2012). Besides, in Sarda sheep, the reported phenotypic correlations among the MCPs and milk traits were negligible except for those involving the SCS, pH and NaCl traits (Puledda et al., 2017). In relation to the estimation of the environmental correlations between the cheese-making traits, measured in this work, and the milk traits, made available by the breeders' association, we should consider that sampling biases could be present because the two samples (for coagulation and milk traits, respectively) were collected on two different, although very close, dates, and also because of the limited number of well-managed

flocks analysed from the breed selection nucleus. However, based on the scarce differences found between measurements of milk traits when sampling is so close (Gonzalo et al., 2003), and the agreement with the estimates reported by other authors between these two types of traits it seems these phenotypic estimates are reliable. In any case, we acknowledge that many of the genetic correlations estimated here among cheese-making but also cheese-making traits and milk traits showed large standard errors and did not provide reliable information about the relationships, at the genetic level, between the different traits. This may be due to the limited genetic connexion between the three studied flocks, as an accurate estimation of genetic correlations requires large sample size and genetically informative data and therefore. Hence, future studies, based on a larger number of genetically connected flocks, would be required to provide more accurate estimates of genetic correlations for the traits considered here. As sheep's milk is globally dedicated to cheese production, it might be interesting to consider cheese-related traits as putative new traits for selection in dairy sheep breeding programmes. At present, it seems difficult to use these traits directly as selection criteria, as these traits are not routinely measured in official milk control. Considering all the information provided here from the genetic parameter estimation and also the technical issue observed in this population about the large number of samples with missing data for A₃₀, we would suggest, initially, as potential candidate traits to evaluate for future inclusion in the selection index to improve cheese ability of the Assaf sheep breed, logK₂₀ and ILCY. The first of them would provide information about the group of MCP traits studied here (it has high genetic correlations with RCT, A₃₀ and A₆₀, and higher heritability than A₆₀), whereas the ILCY would provide information about cheese yield performance (lack of correlation with MCP traits and higher heritability than ILDCY). However, in the practice, we should take into account that the PP trait, which is already measured in this population routinely, could be considered as selection criterion towards

improvement of cheese yield performance due to the high genetic correlations reported here between this traits and cheese yield traits (0.73 and 0.89, respectively for ILCY and ILDCY).

Conclusions

This study provides the first report about the phenotypic and genetic parameters of cheese-making traits in a commercial population of Assaf sheep. The results showed a significant proportion (13%) of non-coagulating samples 60 min after rennet addition, and 43% were classified as very slow-coagulating milk with normal curd firming. Based on these observations, we suggest here that the A_{60} parameter appears to be more appropriate than A_{30} to measure MCPs in this commercial population of the Assaf sheep breed. The moderate estimates of heritability reported here for the studied cheese-making traits suggest that improvement of these traits is possible through selection although the possible bias of our estimation due to the limited number of flocks analysed suggests further studies to more accurately assess the potential response to selection of these traits. The general low phenotypic correlations reported here suggest a possible influence of random environmental noise affecting our estimations. On the other hand, the low accuracy observed for several of the genetic correlations estimated here due to the limited number of flocks under study, suggests the need for further studies on this field. In any case, and considering the future evolution of the Assaf population selection index towards the integration of cheese performance information, the present work provides preliminary information that might help to identify the cheese-making or related milk production traits that could be considered to address that objective.

Declaration of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest

Ethics Committee

As the animals have been sampled within the routine practices carried out on commercial farms, and after consultation with the Research Ethics Committee of the University of León, we have been advised that formal ethical approval is not required under these circumstances.

Acknowledgements

This research work was funded by the AGL2015-66035-R project, funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and co-funded by the European Regional Development Fund. We thank The Consortium for the Promotion of Ovine Products (<http://lechedeoveja.com>) for the close collaboration with our research group and the support for sampling collection. M. Sánchez-Mayor is funded by an FPI from MINECO (Ref. BES-2013-063614). B. Gutiérrez-Gil is funded through the Spanish “Ramón y Cajal” Programme (RYC-2012-10230) from MINECO. R. Pong-Wong is funded by the Biotechnology and Biological Sciences Research Council through Institute Strategic Programme Grant funding (BBS/E/D/30002275).

References

- Albenzio, M., Santillo, A., 2011. Biochemical characteristics of ewe and goat milk: Effect on the quality of dairy products. *Small Rumin. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09.023>
- ASSAFE, 2018. Catalogue of rams of Assaf breed. ASSAFe. Available at https://www.oviespana.com/informacion-de-ovino/servicio-diario-de-noticias/en-portada/download/128_7ec3264afd5e0cdf1caf749e5cabaa20 (accessed 4.7.19)
- Bencini, R., 2002. Factors affecting the clotting properties of sheep milk. *J. Sci. Food Agric.* 82, 705–719. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1101>
- Bittante, G., Cipolat-Gotet, C., Pazzola, M., Dettori, M.L., Vacca, G.M., Cecchinato, A., 2017. Genetic analysis of coagulation properties, curd firming modeling, milk yield, composition, and acidity in Sarda dairy sheep. *J. Dairy Sci.* 100, 385–394. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11212>
- Bittante, G., Pellattiero, E., Malchiodi, F., Cipolat-Gotet, C., Pazzola, M., Vacca, G.M., Schiavon, S., Cecchinato, A., 2014. Quality traits and modeling of coagulation, curd firming, and syneresis of sheep milk of Alpine breeds fed diets supplemented with rumen-protected conjugated fatty acid. *J. Dairy Sci.* 97, 4018–4028. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7345>
- Bittante, G., Penasa, M., Cecchinato, A., 2012. Invited review: Genetics and modeling of milk coagulation properties. *J. Dairy Sci.* 95, 6843–6870. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5507>
- Bynum, D.G., Olson, N.F., 1982. Standardization of a Device to Measure Firmness of Curd During Clotting of Milk. *J. Dairy Sci.* 65, 1321–1324. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82347-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82347-3)
- Caballero-Villalobos, J., Garzón-Sigler, A., Oliete, B., Arias- Sánchez, R., Jiménez, L., Nú, N., Martínez-Marín, A.L., 2015. Relationship of somatic cell count and composition and coagulation properties of ewe' s milk. *Mljekarstvo* 65, 138–143. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2015.0208>
- Caballero-Villalobos, J., Perea, J.M., Angón, E., Arias, R., Garzón, A., 2018. Coagulation efficiency and its determinant factors: A case study for Manchega ewe milk in the region of Castilla-La Mancha, Spain. *J. Dairy Sci.* 101, 3878–3886. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13816>
- Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., De Marchi, M., Penasa, M., Bittante, G., 2012. Comparison between mechanical and near-infrared methods for assessing coagulation properties of bovine milk. *J. Dairy Sci.*
- De la Fuente, L.F., Gabiña, D., Carolino, N., Ugarte, E., 2006. The Awassi and Assaf breeds in Spain and Portugal. 57th Annu. Meet. Eur. Assoc. Anim. Prod. Antalya, Turkey, 17-20 Sept. 2006. Pap. S14.2. Wageningen Acad. Publ. Netherlands. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-580-2>
- EUROSTAT, 2019. Eurostat Database. European Commission. <https://ec.europa.eu/eurostat/home?> (accessed 5.13.19).

Gilmour, A.R., Gogel, B.J., Cullis, B.R., Welham, S.J., Thompson, R., 2014. ASReml User Guide Release 4.1 Functional Specification. VSN Int. Ltd, Hemel Hempstead, HP1 1ES, UK www.vsni.co.uk.

Gonzalo, C., Othmane, M.H., Fuertes, J.Á., De La Fuente, L.F., Primitivo, F.S., 2003. Losses of precision associated with simplified designs of milk recording for dairy ewes. *J. Dairy Res.* <https://doi.org/10.1017/S0022029903006447>

Gutiérrez, J.P., Legaz, E., Goyache, F., 2007. Genetic parameters affecting 180-days standardised milk yield, test-day milk yield and lactation length in Spanish Assaf (Assaf.E) dairy sheep. *Small Rumin. Res.* 70, 233–238. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.03.009>

Ikonen, T., Ahlfors, K., Kempe, R., Ojala, M., Ruottinen, O., 1999. Genetic Parameters for the Milk Coagulation Properties and Prevalence of Noncoagulating Milk in Finnish Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 82, 205–214. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75225-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75225-2)

Ikonen, T., Morri, S., Tyrisevä, A.-M., Ruottinen, O., Ojala, M., 2004. Genetic and Phenotypic Correlations Between Milk Coagulation Properties, Milk Production Traits, Somatic Cell Count, Casein Content, and pH of Milk. *J. Dairy Sci.* 87, 458–467. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(04\)73185-9](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(04)73185-9)

Ikonen, T., Ojala, M., Syväoja, E.-L., 1997. Effects of composite casein and β -lactoglobulin genotypes on renneting properties and composition of bovine milk by assuming an animal model. *Agric. Food Sci.* 6, 283–294. <https://doi.org/10.23986/afsci.72791>

Jaramillo, D.P., Zamora, A., Guamis, B., Rodríguez, M., Trujillo, A.J., 2008. Cheesemaking aptitude of two Spanish dairy ewe breeds: Changes during lactation and relationship between physico-chemical and technological properties. *Small Rumin. Res.* 78, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.04.005>

Koutsouli, P., Patounas, G., Massouras, T., Bizelis, I., Politis, I., 2015. Plasmin-plasminogen system and milk coagulation properties of two Greek dairy sheep breeds. *Small Rumin. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.01.015>

Leitner, G., Lavon, Y., Matzrafi, Z., Benun, O., Bezman, D., Merin, U., 2016. Somatic cell counts, chemical composition and coagulation properties of goat and sheep bulk tank milk. *Int. Dairy J.* <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.11.004>

Lucey, J.A., 2008. Milk protein gels, in: *Milk Proteins*. Elsevier, pp. 449–481. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374039-7.00016-7>

Malacarne, M., Franceschi, P., Formaggioni, P., Sandri, S., Mariani, P., Summer, A., 2014. Influence of micellar calcium and phosphorus on rennet coagulation properties of cows milk. *J. Dairy Res.* <https://doi.org/10.1017/S0022029913000630>

Manca, M.G., Serdino, J., Gaspa, G., Urgeghe, P., Ibba, I., Contu, M., Fresi, P., Macciotta, N.P.P., 2016. Derivation of multivariate indices of milk composition, coagulation properties, and individual cheese yield in dairy sheep. *J. Dairy Sci.* 99, 4547–4557. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10589>

McMahon, D.J., Brown, R.J., 1982. Evaluation of Formagraph for Comparing Rennet Solutions. *J. Dairy Sci.* 65, 1639–1642. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82390-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82390-4)

- Mrode, R.A., 2014. Linear models for the prediction of animal breeding values. Third edition. Boston, MA : CABI, [2014] ©2014.
- Nájera, A.I., De Renobales, M., Barron, L.J.R., 2003. Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: A multifactorial study. Food Chem. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00270-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00270-4)
- Othmane, M.H., Carriedo, J., San Primitivo, F., De la Fuente, L., 2002a. Genetic parameters for lactation traits of milking ewes: protein content and composition, fat, somatic cells and individual laboratory cheese yield. Genet. Sel. Evol. 34, 581. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-34-5-581>
- Othmane, M.H., De La Fuente, L.F., Carriedo, J.A., San Primitivo, F., 2002b. Heritability and genetic correlations of test day milk yield and composition, individual laboratory cheese yield, and somatic cell count for dairy ewes. J. Dairy Sci. 85, 2692–2698. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74355-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74355-5)
- Pazzola, M., Cipolat-Gotet, C., Bittante, G., Cecchinato, A., Dettori, M.L., Vacca, G.M., 2018. Phenotypic and genetic relationships between indicators of the mammary gland health status and milk composition, coagulation, and curd firming in dairy sheep. J. Dairy Sci. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13975>
- Pazzola, M., Dettori, M.L., Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., Bittante, G., Vacca, G.M., 2014. Phenotypic factors affecting coagulation properties of milk from Sarda ewes. J. Dairy Sci. 97, 7247–7257. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8138>
- Pérez-Cabal MA, Legaz E, Cervantes I, de la Fuente LF, Martínez R, Goyache F and Gutiérrez JP. Association between body and udder morphological traits and dairy performance in Spanish Assaf sheep. Archiv fur Tierzucht 56, 430-442. <https://doi.org/10.7482/0003-9438-56-042>
- Puledda, A., Gaspa, G., Manca, M.G., Serdino, J., Urgeghe, P.P., Dimauro, C., Negrini, R., Macciotta, N.P.P., 2017. Estimates of heritability and genetic correlations for milk coagulation properties and individual laboratory cheese yield in Sarda ewes. animal 1–9. <https://doi.org/10.1017/S1751731116002147>
- R Core Team, 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>.
- Vacca, G.M., Pazzola, M., Dettori, M.L., Pira, E., Malchiodi, F., Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., Bittante, G., 2015. Modeling of coagulation, curd firming, and syneresis of milk from Sarda ewes. J. Dairy Sci. 98, 2245–59. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8902>

Tables

Table 1. Distribution of the collected milk samples analysed in the present study per flock, year, number of collection days (Days), number of collected samples (n) and the number of non-coagulating samples per day are also indicated (NA).

Flock	Year	Days	n	NA
Flock 1	2016	1	97	6
		2	87	8
		3	97	11
	2017	1	80	14
		2	100	14
		3	84	5
Flock 2	2016	1	100	10
	2017	1	98	7
Flock 3	2016	1	100	5
		2	94	7
	2017	1	100	31
		2	106	29

Table 2. Descriptive statistics for the cheese-making traits analysed in the present study. Nobs = the number of observations; NAs=number of missing values. NAs-% = NA percentage; Min = minimum value; Max = maximum value; SD=standard deviation; CV-%=coefficient of variation (percentage).

	Nobs	NAs	NAs-%	Min	Max	Mean	SD	CV-%
RCT	1143	147	12.77	8.00	58.45	29.54	10.56	35.74
K₂₀	1143	197	17.24	1.30	40.45	4.47	2.81	62.77
logK₂₀	1143	197	17.24	0.26	3.70	1.35	0.53	38.85
A₃₀	1143	572	50.04	1.02	58.36	28.90	14.24	49.28
A₆₀	1143	147	12.77	1.66	64.00	40.31	11.54	28.63
ILCY	1143	147	12.77	1.36	4.35	2.49	0.41	16.50
ILDCY	1143	147	12.77	0.13	1.76	0.96	0.18	18.34
pH	1143	0	0.00	6.18	7.36	6.73	0.13	1.93

RCT= rennet clotting time (min); K₂₀=curd-firming time (min); LogK₂₀= logarithm base 10 of curd-firming time K₂₀; A₃₀ and A₆₀ are the curd firmness at 30 and 60 minutes after rennet addition (mm), respectively; ILCY=individual laboratory cheese yield (g/10 ml); ILDCY=individual laboratory dried curd yield (g/10 ml) and pH.

Table 3. Descriptive statistics of milk traits for the coagulating samples studied in the present work. Min=minimum value; Max=maximum value; Mean=mean of the trait; SD=standard deviation; CV-%=coefficient of variation (percentage).

Traits	Min	Max	Mean	SD	CV-%
PP	3.57	7.68	5.02	0.48	9.47
FP	3.04	10.34	5.54	1.06	19.10
LP	3.47	5.69	5.11	0.27	5.32
MY	0.45	7.10	2.86	1.07	37.80
PY	0.03	0.34	0.14	0.05	35.93
FY	0.03	0.55	0.16	0.07	42.05
LY	0.02	0.38	0.15	0.06	38.79
Urea	157.00	999.00	524.90	137.76	26.92
SCC	11	27,139	721,833	2,428,596	336.45

PP=protein percentage; FP=fat percentage; LP=lactose percentage; MY=milk yield (kg); PY=protein yield (kg); FY=fat yield (kg); LY=lactose yield (kg); Urea=urea in milk and SCC= somatic cell count in milk (number of cells x 1000 x mL⁻¹).

Table 4. Estimated heritabilities and genetic and phenotypic correlations for the cheese-making traits studied in the present work. Heritability (main diagonal elements), phenotypic correlations (off-diagonal lower elements) and genetic correlations (off-diagonal upper elements). Between brackets, the standard error for each parameter is indicated.

Traits	RCT	logK₂₀	A₃₀	A₆₀	ILCY	ILDCY	pH
RCT (min)	0.22 (0.02)	0.87 (0.11)	-0.93 (0.04)	-0.76 (0.21)	0.35 (0.24)	0.02 (0.33)	0.81 (0.09)
logK₂₀ (min)	0.65 (0.02)	0.29 (0.02)	-0.90 (0.12)	-0.95 (0.12)	0.04 (0.23)	-0.38 (0.30)	0.72 (0.10)
A₃₀ (mm)	-0.94 (0.01)	-0.69 (0.02)	0.30 (0.03)	0.85 (0.26)	0.17 (0.29)	0.34 (0.37)	-0.68 (0.16)
A₆₀ (mm)	-0.59 (0.02)	-0.64 (0.02)	0.38 (0.04)	0.15 (0.02)	0.12 (0.29)	0.54 (0.32)	-0.80 (0.13)
ILCY (g/10 ml)	0.12 (0.03)	0.01 (0.03)	0.01 (0.04)	-0.05 (0.03)	0.30 (0.02)	0.88 (0.09)	0.06 (0.19)
ILDCY (g/10 ml)	0.01 (0.03)	-0.13 (0.03)	0.06 (0.04)	0.14 (0.03)	0.81 (0.01)	0.15 (0.02)	-0.40 (0.24)
pH (pH units)	0.68 (0.02)	0.61 (0.02)	-0.56 (0.03)	-0.55 (0.02)	0.11 (0.04)	-0.14 (0.03)	0.46 (0.08)

RCT= rennet clotting time; logK₂₀= logarithm base 10 of curd-firming time (K₂₀); A₃₀ and A₆₀ are the curd firmness at 30 and 60 min after rennet addition, respectively; ILCY=individual laboratory cheese yield; ILDCY=individual laboratory dried curd yield and pH.

Table 5. Estimated genetic parameters for the milk traits studied in the present work. Heritability (diagonal elements), phenotypic correlations (off-diagonal lower elements) and genetic correlations (off-diagonal upper elements). Between brackets, the standard error for each parameter is indicated.

	PP	FP	LP	MY	PY	FY	LY	Urea	LSCC
PP	0.33 (0.02)	0.81 (0.62)	-0.04 (0.25)	-0.62 (0.16)	-0.39 (0.21)	-0.47 (0.22)	-0.60 (0.16)	-0.32 (0.25)	0.12 (0.23)
FP	0.26 (0.03)	0.04 (0.02)	-0.24 (0.57)	-0.61 (0.47)	-0.43 (0.54)	-0.37 (0.69)	-0.59 (0.47)	-0.29 (0.59)	-0.67 (0.98)
LP	-0.12 (0.03)	-0.19 (0.03)	0.18 (0.02)	0.11 (0.25)	0.15 (0.27)	0.05 (0.30)	0.23 (0.24)	-0.06 (0.29)	-0.54 (0.22)
MY	-0.26 (0.03)	-0.08 (0.03)	0.19 (0.03)	0.34 (0.02)	0.97 (0.01)	0.96 (0.04)	0.99 (0.01)	0.24 (0.23)	-0.70 (0.17)
PY	-0.03 (0.03)	-0.02 (0.03)	0.18 (0.03)	0.97 (0.01)	0.25 (0.02)	0.96 (0.04)	0.97 (0.02)	0.15 (0.25)	-0.77 (0.19)
FY	-0.12 (0.03)	0.38 (0.03)	0.10 (0.03)	0.87 (0.01)	0.87 (0.01)	0.20 (0.02)	0.96 (0.04)	0.14 (0.27)	-0.78 (0.22)
LY	-0.26 (0.03)	-0.10 (0.03)	0.30 (0.03)	0.99 (0.01)	0.96 (0.01)	0.85 (0.01)	0.32 (0.02)	0.25 (0.23)	-0.75 (0.17)
Urea	0.18 (0.03)	0.12 (0.03)	-0.04 (0.03)	0.07 (0.03)	0.10 (0.03)	0.11 (0.03)	0.03 (0.03)	0.21 (0.02)	0.12 (0.28)
LSCC	0.19 (0.03)	0.07 (0.03)	-0.46 (0.03)	-0.27 (0.03)	-0.24 (0.03)	-0.22 (0.03)	-0.31 (0.03)	0.02 (0.03)	0.21 (0.02)

PP=protein percentage; FP=fat percentage; LP=lactose percentage; MY=milk yield; PY=protein yield; FY=fat yield; LY=lactose yield; Urea=urea in milk and LSCC= binary logarithm of the somatic cell counts in milk.

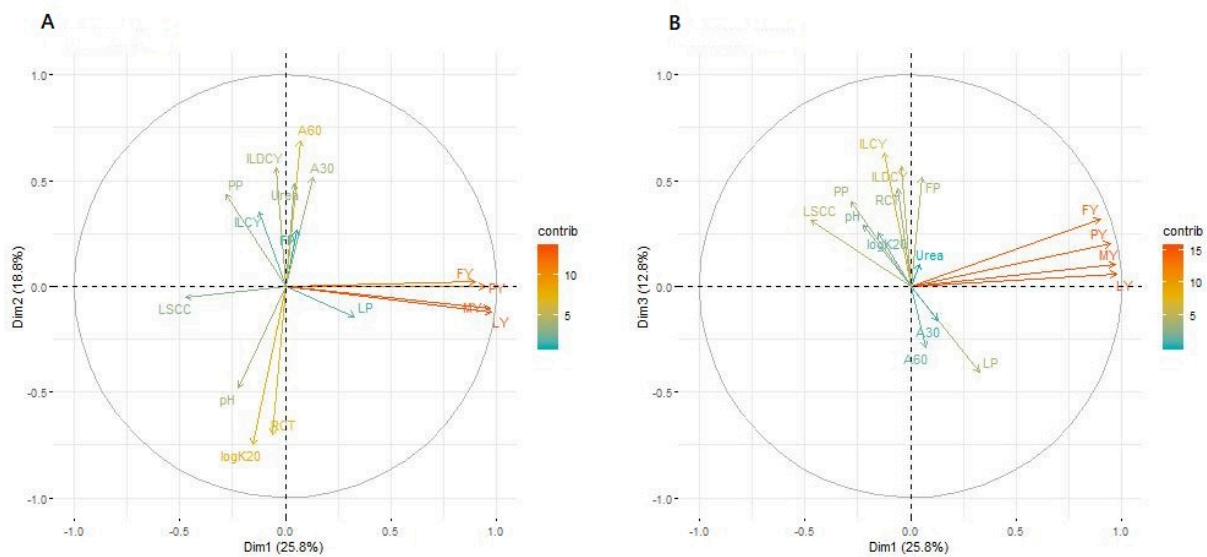
Table 6. Estimated phenotypic and genetic correlations of cheese-making traits with milk traits studied in the present work as an exploratory study. Between brackets, the standard error for each parameter is indicated.

Phenotypic correlation							
Traits	RCT	logK₂₀	A₃₀	A₆₀	ILCY	ILDCY	pH
PP	0.06 (0.03)	-0.11 (0.03)	0.04 (0.04)	0.15 (0.03)	0.37 (0.03)	0.39 (0.03)	-0.08 (0.03)
FP	0.02 (0.03)	-0.02 (0.03)	-0.02 (0.04)	0.05 (0.03)	0.25 (0.03)	0.30 (0.03)	-0.05 (0.03)
LP	-0.17 (0.03)	-0.14 (0.03)	0.06 (0.05)	0.06 (0.03)	0.09 (0.03)	-0.06 (0.03)	-0.22 (0.03)
MY	-0.02 (0.03)	-0.06 (0.03)	0.03 (0.05)	-0.05 (0.03)	-0.24 (0.03)	-0.20 (0.03)	-0.10 (0.03)
PY	-0.01 (0.03)	-0.09 (0.03)	0.05 (0.05)	-0.01 (0.03)	-0.15 (0.03)	-0.11 (0.03)	-0.10 (0.03)
FY	0.01 (0.03)	-0.05 (0.03)	0.02 (0.05)	-0.02 (0.03)	-0.09 (0.03)	-0.04 (0.03)	-0.10 (0.03)
LY	-0.04 (0.03)	-0.08 (0.03)	0.04 (0.05)	-0.03 (0.03)	-0.24 (0.03)	-0.21 (0.03)	-0.12 (0.03)
Urea	-0.10 (0.03)	-0.11 (0.03)	0.10 (0.04)	0.07 (0.03)	-0.04 (0.03)	0.03 (0.03)	-0.09 (0.03)
LSCC	0.22 (0.03)	0.18 (0.03)	-0.10 (0.05)	-0.09 (0.03)	0.12 (0.03)	0.07 (0.03)	0.30 (0.03)
Genetic correlation							
Traits	RCT	logK₂₀	A₃₀	A₆₀	ILCY	ILDCY	pH
PP	0.19 (0.23)	-0.07 (0.22)	0.03 (0.26)	0.35 (0.25)	0.73 (0.15)	0.89 (0.19)	-0.13 (0.17)
FP	0.91 (0.96)	0.51 (0.61)	-0.78 (0.95)	0.20 (0.65)	0.85 (0.54)	0.60 (0.50)	0.57 (0.44)
LP	-0.32 (0.28)	-0.20 (0.27)	-0.10 (0.35)	0.59 (0.36)	-0.28 (0.24)	-0.51 (0.27)	-0.26 (0.20)
MY	-0.24 (0.24)	-0.16 (0.22)	-0.42 (0.28)	0.21 (0.29)	-0.41 (0.19)	-0.43 (0.27)	-0.08 (0.17)
PY	-0.24 (0.27)	-0.22 (0.24)	-0.49 (0.32)	0.39 (0.31)	-0.24 (0.23)	-0.18 (0.31)	-0.16 (0.19)
FY	-0.10 (0.29)	0.02 (0.27)	-0.60 (0.34)	0.32 (0.33)	-0.17 (0.26)	-0.02 (0.34)	-0.01 (0.21)
LY	-0.30 (0.24)	-0.20 (0.22)	-0.41 (0.29)	0.27 (0.30)	-0.44 (0.19)	-0.49 (0.27)	-0.12 (0.17)
Urea	-0.07 (0.27)	-0.27 (0.31)	-0.22 (0.31)	0.33 (0.30)	-0.35 (0.25)	-0.05 (0.32)	-0.03 (0.20)
LSCC	0.11 (0.27)	0.08 (0.33)	-0.04 (0.33)	-0.30 (0.33)	0.22 (0.25)	0.03 (0.35)	0.51 (0.17)

RCT= rennet clotting time; $\log K_{20}$ = logarithm base 10 of curd-firming time (K_{20}); A_{30} and A_{60} are the curd firmness at 30 and 60 min after rennet addition, respectively; ILCY=individual laboratory cheese yield; ILDCY=individual laboratory dried curd yield; PP=protein percentage; FP=fat percentage; LP=lactose percentage; MY=milk yield; PY=protein yield; FY=fat yield; LY=lactose yield; Urea=urea in milk; LSCC= binary logarithm of the somatic cell count in milk; pH=pH in milk.

Figures

Figure 1. Results of the Principal Component (PC) analysis performed in the present study with the cheese-making traits and the milk traits considered. The graphical representations of PC1 vs. PC2 (A) y PC1 vs. PC3 (B) for all the 16 traits analysed here are provided here.



RCT= rennet clotting time; logK₂₀= logarithm base 10 of curd-firming time (K₂₀); A₃₀ and A₆₀ are the curd firmness at 30 and 60 min after rennet addition, respectively; ILCY=individual laboratory cheese yield; ILDCY=individual laboratory dried curd yield; PP=protein percentage; FP=fat percentage; LP=lactose percentage; MY=milk yield; PY=protein yield; FY=fat yield; LY=lactose yield; Urea=urea in milk; LSCC= binary logarithm of the somatic cell count in milk; pH=pH in milk.

Chapter 4. The potential benefit of indirect selection for Cheese-Making Traits in Spanish Assaf Sheep.

The potential benefit of indirect selection for improving cheese-making properties in Spanish Assaf sheep breed.

Milagros Sánchez-Mayor^{1¶}, Valentina Riggio², Beatriz Gutiérrez-Gil¹, Luis-Fernando de la Fuente¹, Juan-José Arranz^{1*}, Ricardo Pong-Wong^{2¶}

¹ Dpto. de Producción Animal, Universidad de León, Campus de Vegazana, León, Spain

² The Roslin Institute and R(D)SVS, University of Edinburgh, Easter Bush, Midlothian, EH25 9RG, United Kingdom

*Corresponding author

Email: jjarrs@unileon.es (JJA)

Author contributions:

Conceived and designed the experiment: MSM, JJA, BGG, LFF, VR, RPW. Performed the analyses: MSM, RPW. Wrote the paper: MSM, JJA, BGG, VR, RPW.

Under review by the co-authors.

Abstract

The cheese-making traits (CMTs) of milk include milk coagulation properties and individual laboratory curd content traits. These traits are of great importance in small ruminants since most of their milk is dedicated to cheese production. This study aimed to assess the potential benefit of indirect selection for improving CMTs when using milk production and functional traits routinely measured in the official milk recording system (OMRS) of the Spanish Assaf sheep breed as proxies. The expected response on the unmeasured CMTs when using the measured proxies as selection criteria were calculated using classical index theory, with genetic parameters estimated in the Spanish Assaf population and considering the differences in the information available when selecting male or female candidates. The impact of the current Spanish-Assaf index was also assessed. The best proxy for CMTs related to coagulating property of the milk was pH, followed by milk protein percentage (PP). However, the responses on CMTs when using PP were less than half of what can be achieved when using pH as the proxy. The value of PP as a proxy is more significant for CMTs related to curd content. The ultimate goal to, simultaneously, improve both CMTs and milk production traits was approached via a multi-objective selection index using several milk production and functional traits recorded in the OMRS. The trend of the correlated response when changing the relative economic weight given to the production and CMTs was explored. The results show that a selection index using traits measured during OMRS can be optimised to improve the CMTs. This new index will yield substantial genetic progress on the CMTs and still achieving the same rate of genetic gain in milk production traits when using the current Assaf index.

Introduction

Spain is the second country in Europe with a greater number of sheep after the United Kingdom, with around 16 million heads. Most of the milk from dairy ewes in Spain is used for the manufacturing of high-quality cheese. Hence, this is the second European country after Italy with greater importance for the pure sheep cheese production industry, with a production of 67 thousand tons in 2016 (EUROSTAT, 2019). Traditionally Manchega, Churra and Latxa were the most important Spanish dairy sheep breeds (184,99, 147,435, and 86,431 heads according to 2018 census, respectively), but in the last years the Assaf breed has become one of the main dairy sheep breeds (144,969 heads) (MAPAMA, 2019).

The Assaf breeding programme was established in 2005 by the Assaf breeders' association ASSAFE. It routinely measures test-day milk records of a series of milk production (i.e. milk yield and percentage and yield for protein, fat and lactose components: MY, PP, FP, LP, PY, FY, LY) and functional traits (i.e. urea content and somatic cell count) in the registered ewes. Currently, the selection goal of this breeding programme is the improvement of total lactation yield. For that, the current implemented selection index (denoted as the ASSAFE index) includes protein yield (PY) and fat yield (FY) as selection criteria, both traits with equal economic weights (ASSAFE, 2019).

Considering the major destination of sheep milk towards cheese production (for the Assaf breed, the entire milk production is destined to cheese production), the study of the milk technological properties and the factors controlling them is becoming one of the major challenges for the dairy sheep industry. Milk coagulation properties (MCP) and cheese yield (CY) are two important

aspects associated with the efficiency of the cheese industry (Bittante et al., 2012; Pretto et al., 2012). The MCPs are measured with, among other devices, the lactodynamograph, which records parameters such as the rennet clotting time (RCT, minutes), the time necessary for the curd to reach an appropriate firmness (K_{20} , minutes) and the curd firmness at 30 and 60 minutes (A_{30} and A_{60} , both in millimetres). Traits related to CY may include two cheese content related traits, the individual laboratory cheese yield (ILCY, gr/10ml of milk) and the individual laboratory dried cheese yield (ILDCY; g/10 ml of milk); on the other hand, the total cheese yield can be measured through the daily cheese yield (dCY, grams) and the daily dried cheese yield (dDCY, grams), which are estimated as $ILCY \times MY$ and $ILDCY \times MY$, respectively. Here, the MCP and CY traits together will also be referred to as cheese-making traits (CMTs).

The CMTs are influenced by different factors, such as milk pH, casein content and somatic cell count (reviewed by (Bittante et al., 2012)), which have been subjected to study in several sheep breeds including Sarda, Poll Dorset and Manchega (Bencini, 2002; Bittante et al., 2017, 2014; Caballero-Villalobos et al., 2018; Pazzola et al., 2018, 2014; Puledda et al., 2017; Vacca et al., 2015). These studies have shown that a proportion of milk can fail to coagulate after a certain amount of time, which has a significant impact on the suitability of the milk for cheese processing (Bittante et al., 2017; Jaramillo et al., 2008; Pazzola et al., 2014; Puledda et al., 2017; Sánchez-Mayor et al., 2019). In the Assaf breed, up to 13% fail to coagulate after 60 minutes and their mean values for RCT and K_{20} are slightly higher (Sánchez-Mayor et al., 2019) compared with other sheep breeds such as Manchega, Guirra, and Sarda (Bittante et al., 2017; Jaramillo et al., 2008; Pazzola et al., 2014; Puledda et al., 2017). Some of the factors influencing CMTs may be manipulated during the cheese-making process (e.g. temperature) to overcome potential problems

arising from the characteristics of the processed milk. However, such corrective changes may affect the integrity and the standards of the cheese product itself so that such actions may be limited or not possible at all. Based on all this, the inclusion of CMTs in the Assaf selection scheme could be a potential efficient tool to improve the suitability of milk from this breed for cheese production.

Studies on the genetic parameters for CMTs have been reported in several Italian sheep breeds such as Sarda and other breeds from the Alpine region (Bittante et al., 2017, 2014; Puledda et al., 2017); as well as Spanish breeds such as Churra, Manchega, Guirra and Assaf (Jaramillo et al., 2008; Othmane et al., 2002a, 2002b; Sánchez-Mayor et al., 2019). Overall, these studies showed that the CMTs have a genetically controlled component, with low to moderate heritabilities supporting the feasibility of improving these traits via genetic selection. However, a selection programme to include CMTs has extra complexities compared with selection focused on more traditional milk traits.

Firstly, CMTs are not routinely recorded in most dairy sheep breeds (including the Spanish Assaf), so selection for these traits may need to be done indirectly by selecting for other recorded indicator traits or “proxies”. Then, the efficiency of selecting for a CMTs will depend on the “quality” of the trait serving as a proxy. Secondly, breeders may already have current selection goals, which, for them, may be more important than improving CMTs. Moreover, depending on the genetic parameters, selecting for these primary goals may have a detrimental correlated response on the CMTs. A solution to solve such a problem may be using a comprehensive selection index where both the primary selection objectives and the CMTs are included and weighed relatively to their economic values. However, estimating the economic weights for all relevant traits is not a simple task and they can change substantially and rapidly depending on the circumstances of the specific

dairy industry. Because of this dynamic behaviour of selection goals, selection with an index to maximise current economic efficiency may not be the right solution, but rather an index leading to “sound” genetic gain for those relevant traits identified based upon a broad view of the industry’s requirements. Hence, an alternative approach would be to study the pattern of the expected correlated responses of all traits of interest when varying their economic weight and choose the “compromise” which yields an “acceptable level of response” for the relevant traits (Bichard, 1977).

The objective of this study was to assess alternative approaches for improving CMTs in the Spanish Assaf breed while maintaining the primary breeders’ objectives of improving PY and FY. The value of using the milk traits routinely measured in the Assaf commercial population as proxies for the CMTs was quantified, and the impact of the current ASSAFE selection index on the CMTs estimated. The pattern of response to selection when varying the economic weights given to CMTs and the production traits in a selection index was also assessed; finally, we propose an optimum scheme to achieve a significant gain on the CMTs without compromising the current response obtained for the primary production traits considered in the ASSAFE index.

Results and Discussion

Traits and expected direct response to selection

In this study, we considered three groups of traits: seven CMTs, seven milk production traits and three functional traits. The CMTs were RCT (min), $\log K_{20}$ (logarithm transformation of K_{20} , log min), A_{60} (mm), ILCY (gr/10ml), ILDCY (gr/10ml), dCY (gr) and dDCY (gr). The milk

production traits used were milk yield (MY, Kg), protein percentage (PP, %), fat percentage (FP, %), lactose percentage (LP, %), protein yield (PY, Kg), fat yield (FY, Kg) and lactose yield (LY, Kg). The functional traits were pH (units), Urea (mg/mL) and the binary logarithm of somatic cell count (LSCC, the binary logarithm of number of cells per mL). Mimicking the recording scheme and selection programme currently implemented in the Spanish Assaf breed, it was assumed that the milk production and functional traits are measured in ewes but not the CMTs, whereas the selection is done based on the ASSAFE index whose goal is to increase PY and FY (with equal economic weight). The trait pH is not currently measured by ASSAFE, but we consider it here as a potential proxy trait because it can be easily included in the routine measurements of the milk control performed by the breeders' association. Although not being actively selected for, the desired direction for genetic changes on CMTs is to reduce RCT, logK₂₀ and to increase A₆₀ and all cheese content and cheese yield traits. Changes in the genetic level of the functional traits were not considered here, but a reduction of LSCC may be of interest to the breeder.

The expected response to selection for these traits was calculated based on the genetic and phenotypic covariance matrices previously estimated for the Assaf breed (Sánchez-Mayor et al., 2019), which were 'banded' to ensure that they were positive definite. Additionally, to facilitate the interpretation of results all traits were rescaled, so their phenotypic variance was one (denoted as the traits on the standardised scale). Results on the standardised scale are proportional to the original ones, and the expected response or economic values of a standardised trait can be transformed to the original scale by multiplying the values by their phenotypic standard deviation (Cameron, 1997). For the ASSAFE index which assigns equal weight to the original PY and FY, their respective weight using the standardised traits would be 0.63 and 0.37, reflecting the

magnitude of their phenotypic standard deviation. For a more detailed description of how the phenotypic and genetic matrices were banded and rescaled, see the method section.

Given that milk traits are sex-limited, the expected selection response in males and females were estimated separately under two different assumptions on the available information. For females, it was assumed that each candidate has one single test-day record for all measured traits; whereas males were progeny-tested and each candidate was assumed to have 10 half-sib daughters with one test-day record (for all measured traits).

The genetic response to direct selection, where the trait itself is the selection criterion (measured on the candidates or their offspring), was calculated for all traits as shown in Table 1. Results are presented on the standardised scale, and their equivalents in the original scale can be obtained by multiplying them by their phenotypic standard deviation. In practice, direct selection would not be possible for CMTs because these traits are assumed not to be recorded. Here, they were estimated to be used as reference for evaluating the performance of the alternative selection approaches based on indirect selection. The progeny test with each candidate having 10 phenotyped offspring yields between 10% and 44% extra gain per generation than selection using the ewe's own record (one record per ewe), with the greatest advantage of progeny test associated to traits with the lowest heritability. For the CMTs, the expected advantage of the progeny test over the use of the ewe's own record ranges between 21% and 33% of extra gain per generation. The relative advantage of using progeny test over the ewe's own record will be higher when increasing the number of offsprings, but it may also increase the generation interval, affecting the genetic gain per calendar year.

Proxies for cheese-making traits

We assessed the potential benefit of using a recorded milk production/functional trait as a proxy for an unrecorded CMTs, by quantifying their relative selection efficiency. The relative selection efficiency (RSE) of a proxy on a target trait was defined as the ratio between the correlated genetic response on the target trait when selecting for the proxy over the direct response when selecting for the (measured) target trait itself. Hence, when the magnitude of the ratio is close to one (or higher) indicates that selecting for the proxy is as good as (or better than) when selecting directly for the target trait itself. Because they are ratios, the RSE is the same when calculated with the trait on the standardised scale or the original one. See methods section for predicted equations used to estimate RSE.

Fig 1 shows the RSE of using the routinely recorded milk production/functional traits as proxies for one of the CMTs. The RSE of the ASSAFE index (assigning equal weight to PY and FY) in the Assaf breed is also shown in Fig 1. The relative efficiency of these traits as proxies for selecting ewes or rams (i.e. evaluation based on their own record or progeny testing, respectively) are very similar, with slightly higher efficiency when they are used to select ewes.

According to our results, the best proxy for MCP traits is pH, followed by PP (Fig 1). The influence of pH on MCP has been highlighted by previous studies (Bencini, 2002; Caballero-Villalobos et al., 2018; Croguennec et al., 2008; Remeuf et al., 1991; Troch et al., 2017), so its usefulness as a proxy is not surprising given its high heritability. Moreover, the direction of the correlated response is positive in tune on the MCP traits, and selecting for lower pH will genetically decrease RCT and $\log K_{20}$ while increasing A_{60} , with all these indirect effects showing a favourable direction

according to the desired response. The next suitable proxy to improve MCP is PP, but its RSE is less than half of what can be achieved with pH, and there are some conflicts in the direction of the response. Selection to increase PP will lead to the favourable direction of decreasing RCT and increasing A_{60} , but it will (unfavourably) increase $\log K_{20}$.

The value of PP as proxy is more significant for traits related to cheese content traits (ILCY and ILDCY). Surprisingly, the other two milk content traits (i.e. FP and LP) are less efficient as proxy than PP, probable due to their lower heritabilities. The different milk yield traits (MY, PY, FY, LY) are not suitable proxies for cheese content traits (ILDY and ILDCY), but they have a significant impact on the daily cheese yield traits (dCY and dDCY). Urea and LSCC have some also impact on dCY and dDCY. A clear trend observed for the CY traits is that the ‘*good proxies*’ for the cheese content traits (ILCY and ILDCY) were not as *good* for the total cheese yield traits (dCY and dDCY) and, at worse, they had an effect on the opposite direction (i.e. selection for some proxies to increase ILCY or ILDCY may decrease dCY or dDCY). This creates a conflict making more challenging to achieve the ideal goal of improving both the partial and the total yield traits.

The impact of the ASSAFE index (which assigns equal weight to both PY and FY) was also estimated. As expected, the current index has a major positive impact on the daily cheese yield traits, but only a relatively marginal effect on the MCP and cheese content traits. Hence, if significant progress is required for the CMTs, the selection index will need to be modified and re-optimised to add some economic weight to the CMTs traits.

The overall performance of the milk production/functional traits as proxies for CMTs indicates that none of them alone is ideal to simultaneously improve coagulating properties, cheese content traits and daily cheese yields. Hence, a more sophisticated selection index to combine information from different proxies may be needed.

Selection to simultaneously improve both milk production and cheese-making traits

The study on the selection efficiency of the milk production/functional traits as proxies for CMTs showed that none of them alone are ideal for improving MCP and CY traits (Fig 1). Hence, a more complex selection index to combine information from different proxies may be needed to improve the different aspects related to the CMTs of the milk as well as the current production objectives defined by ASSAFE.

The solution for the goal to improve both CMTs and milk production was explored via a multi-objective selection index which assigns economic weights to some traits from those groups but uses as selection criteria milk production (PP, FP, PY and FY) and functional (pH, Urea, LSCC) traits, which are already, or could be easily, recorded by ASSAFE and are good proxies for the cheese-making traits.

Rather than constructing a selection index to maximise the economic efficiency given the true current economic weights, we aimed for a ‘compromise’ index which provides a balanced level of genetic progress for both the milk production and the CMTs (Bichard, 1977). The selection index was optimised across the whole spectrum of economic weights starting from the case when the total economic weight is given to milk production traits, and a null weight is considered for CMTs,

ending with the opposite case (i.e. null weight is given to milk production and the total economic weight to CMTs). By studying the trend of the correlated response across the whole range of relative economic weights, it was possible to identify an optimum weight which yields ‘acceptable level of response’ across both sets of traits.

First, the choice of the cheese-making traits to be included in the objective and their relative weight was assessed to ensure that a balanced amount of genetic gain is achieved on MCP and curd yield traits. Fig 2 compares their correlated response when either RCT or A_{60} (together with ILCY) is included in the list of selection objectives of the index used to select ewes (Fig 3 shows the results for the index used to select rams using progeny information). As expected, the RSE for traits related to coagulation properties were greater when the economic weight of RCT (or A_{60}) was higher than that assigned to ILCY. Including only one trait related to coagulation within the selection objective was enough to achieve progress in the right direction for all three traits (i.e. reducing both RCT and $\log K_{20}$ while increasing A_{60}). The selection for ILCY also led to a similar response for ILDCY, but not for the total cheese yield traits, where a positive improvement for ILCY (and ILDCY) was accompanied by a detrimental reduction of dCY (and dDCY). A close inspection of the trend of this correlated response showed that the RSE for dCY is close to (or higher than) one when the selection index assigns equal weight to RCT (or A_{60}), while a significant gain in the right direction was achieved on the traits related to coagulation properties. The genetic response for dCY and dDCY was almost indifferent when the selection was mainly addressed to improve MCP traits, but it deteriorates when selection was mostly done on ILCY. The results presented in Fig 2 and 3 suggest that improvement of MCP traits can be done by adding either RCT or A_{60} as the selection criteria. Assigning equal economic weight to RCT (or A_{60}) and to

ILCY would provide reasonable response on MCP traits and ILCY, but it would have a small detrimental effect on the cheese content traits. Based on the previous results, RCT and ILCY were chosen as the CMTs to be included in the selection index, both with equal relative economic weight.

Finally, the compromise index to balance the genetic progress for cheese-making traits and milk production traits was examined by adding RCT, ILCY, PY and FY into the list of selection objectives. RCT and ILCY were assumed to have the same economic weight, and for PY and FY the relative weight considered was 0.63 and 0.37, respectively (corresponding to the economic weight assigned by the current ASSAFE index, where both traits have the same weight when expressed in the original scale). The correlated response when the aim is to improve cheese-making and milk production traits at the same time is shown in Fig 4. RSE for PY and FY was one or higher when at least half of the combined economic weight is given to FY and PY (i.e. weights given to PY and FY are 0.5×0.63 and 0.5×0.37 , respectively). Compared with the results of the ASSAFE index (which uses PY and FY as criteria and objective traits), the index proposed here (using PP, FP, PY, FY, pH, Urea and LSCC as criteria) can achieve a similar level of genetic gain in PY and FY as with the ASSAFE index, but would lead to much higher improvement on the cheese-making traits.

The results observed here showed that genetic progress on CMTs can be achieved while still maintaining similar progress on the traits which are being actively selected on this breed. Extra progress that could be potentially achieved on the CMTs would come at no extra cost as the indirect selection proposed here is mainly based on traits that are being currently recorded by ASSAFE.

The only new trait to measure would be pH, and this measurement can be added to the routine milk composition analysis practically without extra cost.

Conclusions

The results reported here show that CMTs can be selected indirectly using milk production/functional traits as proxies without the need to measure the CMTs. For this purpose, based on the results obtained here, we propose a selection index based on production and functional traits, most of which are currently measured in the Assaf breed: PP, FP, PY, FY, pH, Urea, and LSCC. The pH would be the only new trait to be included in the routine measures performed by the breeder's association, although this could be done without extra cost. The application of this index would lead to similar or greater genetic gain on PY and FY than that achieved by the current ASSAFE selection index, while allowing for a significant gain in the CMTs, especially for MCP.

Material and Methods

Traits and their phenotypic and covariance matrices

A total of seven milk production traits, three functional and seven cheese-making traits (CMTs), were considered here. The seven milk production traits are: protein percentage (PP), fat percentage (FP), lactose percentage (LP), milk yield (MY), protein yield (PY), fat yield (FY) and lactose yield (LY). The functional traits were pH (units), Urea (mg/mL) and the binary logarithm of the somatic cell count (LSCC, the binary log of the number of cells per mL) in milk. Of these functional traits, pH is not routinely measured by ASSAFE. For the CMTs, three traits are related to milk

coagulation properties (MCPs), and four are related to cheese yield (CY). The MCPs were: the time between rennet addition and the start of the milk coagulation (RCT, minutes); the log-transformation time necessary for the curd to reach a 20 mm firmness (logK₂₀, log minutes) and curd firmness at 60 min after rennet addition (A₆₀, millimetres). The CY traits included two cheese content related traits, the individual laboratory cheese content (ILCY, gr/10ml of milk) and the individual laboratory dried curd yield (ILDCY; gr/10 ml of milk) and two traits related the total cheese yield, the daily cheese yield (dCY) and the daily dried cheese yield (dDCY), which were estimated as ILCY x MY and ILDCY x MY, respectively; grams). Curd firmness at 30 min after rennet addition (A₃₀, millimetres) is another trait commonly used to evaluate the MCPs, but it was not considered in this study. The genetic parameter estimates for the traits studied here were obtained from a study analysing a commercial the Assaf breed population where a large proportion of the milk samples had a low coagulating time, so their A₃₀ values were missing (Sánchez-Mayor et al., 2019). This may have resulted in biased estimates of the genetic parameters for A₃₀, and any prediction on genetic gain based on these estimates may be poorly reliable. For our analyses, it was assumed that all milk production and functional traits are routinely measured in the studied population but not the CMTs ones. This assumption has taken into account that although the pH is not currently routinely measured, its inclusion in the milk composition analyses performed by ASSAFE is feasible, without any practical or economic disadvantages.

Since milk traits are sex-limited, the expected genetic response arising from selection on rams and ewes were estimated separately based on two different assumptions for the available information at the time of selection. For ewes it was assumed that each candidate has one single test-day record

for all measured traits; whereas rams were assumed to be progeny tested based on 10 half-sib daughters, each of them with one test-day record available (for all measured traits).

The current selection scheme of the Spanish Assaf breed has the primary selection goal to increase PY and FY using an index assigning equal economic weight to both traits (denoted as the ASSAFE index). Hitherto, the CMTs are not included in the selection objectives, but the desired direction for the genetic changes on CMTs is to reduce RCT and $\log K_{20}$ while increasing A_{60} and the cheese yield traits, especially the total yields (dCY and dDCY). Changes in the genetic level of the functional traits were not considered here, but decreasing LSCC may be of interest to the breeder and an economic weight given to it.

Heritabilities and genetic and phenotypic correlations used to calculate the genetic responses are shown in Table 2. All parameters were estimated in the Assaf breed and previously reported (with the exception of parameters involving dCY and dDCY) by Sánchez-Mayor et al. (2019). Because the correlations were calculated in a series of bivariate REML analyses, both the genetic and phenotypic covariance matrices were ‘bended’ to ensure they were positive definite, by adjusting the negative eigenvalues as described by Schaeffer (2019). Additionally, to facilitate the interpretation of results, all traits were rescaled so their phenotypic variance was one (i.e. denoted as the trait on the standardised scale, and obtained by dividing each trait by their phenotypic standard deviation). This rescaling, however, does not influence the conclusions, as the results on the standardised scale are proportional to those obtained when using the original scale. Moreover, the expected response and economic values of a standardised trait can easily be transformed to the original scale by multiplying the values by their phenotypic standard deviation (Cameron, 1997). We tested different approaches to ensure that the final bended heritabilities and genetic and

phenotypic correlation matrices were as close to the original ones as possible. Based on this criterion, the best protocol was to rescale the (phenotypic or genetic) covariance matrix, banded it and rescale it again to re-standardise their phenotypic variance being one (See S1 Fig).

The direct genetic response to selection on ewes and rams

The expected genetic response from direct selection (when the trait of interest is measured on the candidate and/or relatives and used as the selection criterion) was calculated for all traits and used as reference to assess the performance of the further selection strategies.

Recalling the available information to be used as selection criteria (i.e. one test-day record for female candidates and the mean value of 10 half-sib daughters for male candidates), the expected direct response (DR) from selection on ewes and rams are (Cameron,1997):

$$DR_{ewe} = i * h^2 \sigma \quad [1]$$

and

$$DR_{ram} = i * h^2 \sigma \sqrt{\frac{n}{4+(n-1)h^2}} \quad [2]$$

where i is the standardised selection intensity, h^2 the heritability of the trait, σ the phenotypic standard deviation and n the number of half-sibs offsprings (here assumed to be 10 half-sib offsprings).

Now their ratio is:

$$\frac{DR_{ram}}{DR_{ewe}} = \sqrt{\frac{n}{4+(n-1)h^2}} \quad [3]$$

which highlights that the benefit of using progeny test is higher with traits with low heritability and with greater number of offsprings.

The correlated response to selection via a proxy and its relative selection efficiency

Here it is assumed that the target trait of interest (i.e. a CMTs) is not measured, so the genetic response is achieved through the selection on a correlated trait or proxy (i.e. a milk production/functional trait). Hence, the correlated response (CR) on the target trait by selection on the proxy for ewes and rams are (Cameron, 1997; Syrstad, 1970):

$$CR_{ewe} = i * r_{g_{tp}} h_t h_p \sigma_t \quad [4]$$

and

$$CR_{ram} = i * r_{g_{tp}} h_t h_p \sigma_t \sqrt{\frac{n}{4+(n-1)h_p^2}} \quad [5]$$

where $r_{g_{tp}}$, is the genetic correlation between the target and the proxy traits, h_t , h_p the square root of their respective heritabilities and σ_t the phenotypic standard deviation of the target trait.

Defining the relative selection efficiency (RSE) as the ratio of the correlated response from selecting via the proxy over the direct response, the respective value for ewes and rams are (Syrstad, 1970):

$$RSE_{ewe} = \frac{h_p}{h_t} r_{g_{tp}} \quad [6]$$

and

$$RSE_{ram} = \frac{h_p}{h_t} \sqrt{\frac{4+(n-1)h_t^2}{4+(n-1)h_p^2}} r_{g_{tp}} \quad [7]$$

Hence, the advantage of selecting by the proxy will increase with higher heritability of the proxy and lower heritability of the target trait. It can also be seen that the RSE is independent of the phenotypic variance of the traits, showing that its magnitude is the same regardless the traits are on either the original or standardised scale.

For the calculation of the correlated response (and thereby, its RSE) when using the ASSAFE index, see the following section related to selection indices.

Selection index and their correlated response and relative selection efficiency

Selection responses on the CMTs were also quantified for scenarios using selection indices, which combine information of several proxies (measured on the candidate itself or their relatives), to genetically improve one or several selection objectives/traits with varying economic weights. The selection indices considered here were optimised based on the traditional selection index theory (Cameron, 1997; Hazel, 1943).

Let a set of m recorded traits to be used as proxies (denoted as the selection criteria) with the aim to genetically improve k traits (denoted as the selection objectives). Traits in the selection objective may or may not be used as selection criteria. The index score (I) for a candidate is:

$$I = \mathbf{b}'\mathbf{x} \quad [8]$$

where \mathbf{x} is the vector of phenotypic measurements for the m selection criteria on the candidate (or the mean phenotypes on a set of their relatives) and \mathbf{b} is their relative weight given in the index.

To maximise the overall response (i.e. the sum of the correlated response for all traits in selection objective multiplied by their economic weight), the optimum value for **b** is calculated as:

$$\mathbf{b} = \mathbf{P}^{-1}\mathbf{G}\mathbf{a} \quad [9]$$

where **P** is the phenotypic covariance matrix between the traits included as selection criteria, **G** is genetic covariance matrix between the traits considered as selection criteria and the traits considered as selection objectives; and **a** is the vector of the relative economic weight of the traits considered as selection objectives. If the desired direction of the selection is to reduce the mean value of a given trait in the selection objective, then its economic weight would be negative (e.g. this would be the case for RCT and logK₂₀, where milk with a low value for these traits has a favourable impact on the cheese-making process).

Recalling that selection of ewes and rams are based on a different type of available information, the selecting indices for ewe and ram candidates are calculated with different **P** and **G** matrices. For illustration how these matrices are calculated, let's assume two traits (x=1,2). Hence, for the case of ewes where selection is based on one of their own test-day records (for each trait in the selection criteria), the **P** and the **G** matrices are:

$$\mathbf{P}_{ewe} = \begin{bmatrix} \sigma_1^2 & r_{12}\sigma_1\sigma_2 \\ r_{12}\sigma_1\sigma_2 & \sigma_2^2 \end{bmatrix} \quad [10]$$

and

$$\mathbf{G}_{ewe} = \begin{bmatrix} h_1^2\sigma_1^2 & r_{g12}h_1h_2\sigma_1\sigma_2 \\ r_{g12}h_1h_2\sigma_1\sigma_2 & h_2^2\sigma_2^2 \end{bmatrix} \quad [11]$$

where h_x^2 and σ_x^2 are the heritability and phenotypic variance of trait x (with h_x and σ_x being their respective square root); r_{xy} and $r_{g_{xy}}$ the phenotypic and genetic correlation between trait x and y , respectively.

On the other hand, for the case of rams which are progeny tested, \mathbf{P} is the phenotypic covariance for the average value of n half-sib daughters and \mathbf{G} the genetic covariance between the ram and the average daughter value. Then, the respective matrices are:

$$\mathbf{P}_{ram} = \begin{bmatrix} \left(\frac{4+(n-1)h_1^2}{4n}\right)\sigma_1^2 & \frac{r_{12}\sigma_1\sigma_2+(n-1)(0.25r_{g_{12}}h_1h_2\sigma_1\sigma_2)}{n} \\ \frac{r_{12}\sigma_1\sigma_2+(n-1)(0.25r_{g_{12}}h_1h_2\sigma_1\sigma_2)}{n} & \left(\frac{4+(n-1)h_2^2}{4n}\right)\sigma_2^2 \end{bmatrix} \quad [12]$$

and

$$\mathbf{G}_{ram} = 0.5 \begin{bmatrix} h_1^2\sigma_1^2 & r_{g_{12}}h_1h_2\sigma_1\sigma_2 \\ r_{g_{12}}h_1h_2\sigma_1\sigma_2 & h_2^2\sigma_2^2 \end{bmatrix} \quad [13]$$

Finally, the matrices are expanded to include all traits, and the index is optimised using the relevant rows and columns associated with the selection criteria and selection objectives. Both \mathbf{P} and \mathbf{G} were calculated using genetic parameters shown in Table 2, and the phenotypic variances were one as the analyses were carried out with the standardised scale.

Once the relative weights for the selection criteria (\mathbf{b}) are calculated, the selection response for a trait j (which may or may not have an economic weight in the index) is equal to:

$$CR_j = i * \frac{\mathbf{b}'\mathbf{G}_j}{\sqrt{\mathbf{b}'\mathbf{P}\mathbf{b}}} \quad [14]$$

where \mathbf{G}_j is the column in \mathbf{G} corresponding to trait j , and the relevant \mathbf{P} and \mathbf{G} matrices are used in the ewe and ram candidates.

Finally, the RSE on trait j when selecting for the index is calculated by dividing the correlated response by the direct response obtained with equation [1] or [2].

For the case of the ASSAFE index, the assumption is that the PY and FY are the selection objectives and, at the same time, the selection criteria. This index also assigns equal economic weight to both traits, which on the standardised scale, they are proportional to the inverse of their phenotypic standard deviation (i.e. $a_{PY} = \frac{\sigma_{PY}^{-1}}{(\sigma_{PY}^{-1} + \sigma_{FY}^{-1})}$, $a_{FY} = \frac{\sigma_{FY}^{-1}}{(\sigma_{PY}^{-1} + \sigma_{FY}^{-1})}$). Using the values of the phenotypic standard deviations given in Table 1 their equivalent weight in the standardised scale are 0.63 and 0.37, respectively). Based on these standardised economic weights, the vector \mathbf{b} (and, thereby, the respective correlated responses and RSEs) can be easily calculated for the case when selection is done using the ASSAFE index.

Balancing the response to selection for milk production and cheese-making traits

Rather than constructing a selection index to maximise the economic efficiency of the breeding scheme given the current economic weight of the different objective traits, we aimed for a ‘compromise’ index which provides a balanced level of genetic progress for both milk production and the cheese-making traits (Bichard, 1977).

Let the selection index have several objective traits which can be separated in two groups (e.g. milk production and cheese-making traits), and the combined relative weight given to the traits in the first and second groups are z and $1-z$, respectively. The selection index is optimised, and

correlated responses (expressed as RSE) are calculated. By assigning values to z between 0 and 1, the trend of RSE can be calculated for the entire range of values from an extreme where weight is given only to milk production traits to the other extreme where the entire weight is given to the cheese-making traits. The ‘compromise’ index would be the one which yields ‘acceptable’ level of response for all relevant traits (Bichard, 1977). Although the process of choosing the ‘compromise’ index is somewhat subjective as the ‘acceptable level of response’ is defined by the breeders themselves, it does avoid the need to re-estimate the index due to the continuous changes in the economic weights of the objective traits.

The traits included as selection criteria in the index were four milk production (i.e. PP, FP, PY, FY) and the three functional traits (i.e. pH, Urea, LSCC), which were chosen because they are or could be routinely recorded by ASSAFE and because they were good proxies for some cheese-making traits. The selection objectives included four traits: two CMTs and two milk production traits. The CMTs objectives were one related to MCP (RCT or A₆₀) and one related to cheese yield (ILCY), while the milk production objectives were PY and FY as they are the main objectives in the current ASSAFE index.

Acknowledgements

We thank The Consortium for the Promotion of Ovine Products (<http://www.lechedeoveja.com>) for the close collaboration with our research group. Milagros Sánchez-Mayor was financially supported by an FPI from MINECO (Ref. BES-2013-063614). Ricardo Pong-Wong and Valentina Riggio are funded by the Biotechnology and Biological Sciences Research Council through Institute Strategic Programme Grant funding (BBS/E/D/30002275).

Funding

This research work was funded by the AGL2015-66035-R project, funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and co-funded by the European Regional Development Fund.

Competing Interest

The authors have declared that no competing interests exist.

References

EUROSTAT. Eurostat Database. European Commission. 2019 [cited 2019 May 20]. p. Available from: <https://ec.europa.eu/eurostat/home?> (accessed 12.7.19)

MAPAMA. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. 2019 [cited 2019 May 28]. Available from: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/default.aspx>.

ASSAFE. ASOCIACIÓN NACIONAL DE CRIADORES DE GANADO OVINO DE LA RAZA ASSAF. 2019 [cited 2019 Mar 14]. p. Index page 5. Available from: [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/Programa mejora ASSAF. Definitivo_tcm30-114480.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/Programa_mejora_ASSAF_Definitivo_tcm30-114480.pdf)

Pretto D, López-Villalobos N, Penasa M, Cassandro M. Genetic response for milk production traits, somatic cell score, acidity and coagulation properties in Italian Holstein–Friesian population under current and alternative selection indices and breeding objectives. *Livest Sci.* 2012 Dec; 150 (1–3) : 59–66. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871141312003125>

Bittante G, Penasa M, Cecchinato A. Invited review: Genetics and modeling of milk coagulation properties. *J Dairy Sci* [Internet]. 2012 Dec;95(12):6843–70. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030212007072>

Pazzola M, Cipolat-Gotet C, Bittante G, Cecchinato A, Dettori ML, Vacca GM. Phenotypic and genetic relationships between indicators of the mammary gland health status and milk composition, coagulation, and curd firming in dairy sheep. *J Dairy Sci* [Internet]. 2018 Apr; 101 (4) : 3164–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030218300973>

Bittante G, Pellattiero E, Malchiodi F, Cipolat-Gotet C, Pazzola M, Vacca GM, et al. Quality traits and modeling of coagulation, curd firming, and syneresis of sheep milk of Alpine breeds fed diets supplemented with rumen-protected conjugated fatty acid. *J Dairy Sci.* 2014 Jul;97(7):4018–28. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030214003348>

Bittante G, Cipolat-Gotet C, Pazzola M, Dettori ML, Vacca GM, Cecchinato A. Genetic analysis of coagulation properties, curd firming modeling, milk yield, composition, and acidity in Sarda dairy sheep. *J Dairy Sci.* 2017 Jan;100(1):385–94. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030216307275>

Bencini R. Factors affecting the clotting properties of sheep milk. *J Sci Food Agric* [Internet]. 2002 May 15;82(7):705–19. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.1101>

Caballero-Villalobos J, Perea JM, Angón E, Arias R, Garzón A. Coagulation efficiency and its determinant factors: A case study for Manchega ewe milk in the region of Castilla-La Mancha, Spain. *J Dairy Sci* [Internet]. 2018 May;101(5):3878–86. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030218301796>

Puledda A, Gaspa G, Manca MG, Serdino J, Urgeghe PP, Dimauro C, et al. Estimates of heritability and genetic correlations for milk coagulation properties and individual laboratory cheese yield in Sarda ewes. *animal* [Internet]. 2017 Jun 2;11(6):920–8. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1751731116002147/type/journal_article

Vacca GM, Pazzola M, Dettori ML, Pira E, Malchiodi F, Cipolat-Gotet C, et al. Modeling of coagulation, curd firming, and syneresis of milk from Sarda ewes. *J Dairy Sci* [Internet]. 2015 Apr;98(4):2245–59. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030215000764>

Pazzola M, Dettori ML, Cipolat-Gotet C, Cecchinato A, Bittante G, Vacca GM. Phenotypic factors affecting coagulation properties of milk from Sarda ewes. *J Dairy Sci* [Internet]. 2014 Nov; 97 (11) : 7247–57. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030214005712>

Jaramillo DP, Zamora A, Guamis B, Rodríguez M, Trujillo AJ. Cheesemaking aptitude of two Spanish dairy ewe breeds: Changes during lactation and relationship between physico-chemical and technological properties. *Small Rumin Res* [Internet]. 2008 Aug;78(1–3):48–55. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448808000795>

Sánchez-Mayor M, Pong-Wong R, Gutiérrez-Gil B, Garzón A, de la Fuente LF, Arranz JJ. Phenotypic and genetic parameter estimates of cheese-making traits and their relationships with milk production, composition and functional traits in Spanish Assaf sheep. *Livest Sci* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2019 Aug 15];228:76–83. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1871141319306663#!>

Othmane MH, De La Fuente LF, Carriedo JA, San Primitivo F. Heritability and Genetic Correlations of Test Day Milk Yield and Composition, Individual Laboratory Cheese Yield, and Somatic Cell Count for Dairy Ewes. *J Dairy Sci* [Internet]. 2002 Oct;85(10):2692–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030202743555>

Othmane MH, Carriedo JA, San Primitivo F, De la Fuente LF. Genetic parameters for lactation traits of milking ewes: protein content and composition, fat, somatic cells and individual laboratory cheese yield. *Genet Sel Evol* [Internet]. 2002;34(5):581. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12427387>

Bichard M. Economic efficiency of pig breeding schemes: A breeding company view. *Livest Prod Sci* [Internet]. 1977 Sep;4(3):245–54. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0301622677900422>

Cameron ND. Selection indices and prediction of genetic merit in animal breeding. In: *Selection indices and prediction of genetic merit in animal breeding*. Wallingford; New York, CAB international.; 1997.

Remeuf F, Cossin V, Dervin C, Lenoir J, Tomassone R. Relations entre les caractères physico-chimiques des laits et leur aptitude fromagère. *Lait*. 1991; Available from: <http://www.edpsciences.org/10.1051/lait:1991431>

Croguennec, T, Jeantet R, Brulé G. Fondements physicochimiques de la technologie laitière. [Internet]. Paris: Lavoisier TEC & DOC; 2008. 176 p. Available from: <https://hal-agrocampus-ouest.archives-ouvertes.fr/hal-00729142>.

Troch T, Lefébure É, Sindic M, Baeten V, Colinet F, Gengler N. Cow milk coagulation: Process description, variation factors and evaluation methodologies. a review. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 2017;21(4):276–87. Available from: <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=13692>

Schaeffer L. *Animal Models* [Internet]. Self-Published, editor. Self-Published; 2019. 381 p. Available from: <http://www.volumesdirect.com/detail.aspx?ID=5614>

Syrstad O. Estimating Direct and Correlated Response to Selection. A Note for Clarification. *Acta Agric Scand* [Internet]. 1970 Jan 7;20(3):205–6. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00015127009433408>

Hazel LN. The Genetic Basis for Constructing Selection Indexes. *Genetics.* 1943;28(6):476-490.

Tables

Table 1. The expected response from direct selection on the trait itself for ewe (with ewe's own record) and ram (progeny-tested with 10 half-sib daughters) candidates.

Trait	Phenotypic σ	Direct response*		
		Ewe	Ram	Ram/Ewe ratio
RCT	9.268	0.232	0.297	1.282
logK ₂₀	0.473	0.293	0.360	1.227
A ₆₀	11.001	0.180	0.240	1.334
ILCY	0.386	0.315	0.381	1.210
ILDCY	0.158	0.182	0.242	1.332
dCY	0.224	0.298	0.365	1.223
dDCY	0.089	0.252	0.319	1.263
PP	0.391	0.335	0.400	1.194
FP	0.946	0.086	0.124	1.448
LP	0.224	0.194	0.255	1.320
MY	0.895	0.343	0.407	1.188
PY	0.045	0.252	0.318	1.263
FY	0.055	0.214	0.278	1.299
LY	0.045	0.328	0.393	1.199
pH	0.114	0.471	0.519	1.102
Urea	101.978	0.211	0.275	1.302
LSCC	1.991	0.249	0.315	1.266

* direct response per unit of standard intensity of selection for the rescaled traits. To calculate the expected response to the original scale, the values should be multiplied by the phenotypic standard deviation of each trait. Some disparities in the values for the ram/ewe ratio are due to rounding of the direct response values obtained for ewes and rams. RCT= rennet clotting time; logK₂₀= logarithm base 10 of curd-firming time (K₂₀); A₆₀ is the curd firmness at 60 min after rennet addition; ILCY=individual laboratory cheese yield; ILDCY=individual laboratory dried curd yield; ; dCY=Total individual laboratory cheese yield; dDCY=Total individual laboratory dried curd yield; PP=protein percentage; FP=fat percentage; LP=lactose percentage; MY=milk yield; PY=protein yield; FY=fat yield; LY=lactose yield; pH=pH in milk; Urea=urea in milk; LSCC= binary logarithm of the somatic cell count in milk.

Table 2. Heritabilities (main diagonal elements), phenotypic (off-diagonal lower elements) and genetic (off-diagonal upper elements) correlations between the cheese making, milk production and functional traits used to calculate the genetic responses. Estimates are after rescaling, bending and rescaling again the original phenotypic and genotypic covariance matrices.

	RCT	logK ₂₀	A ₆₀	ILCY	ILDCY	dCY	dDCY	PP	FP	LP	MY	PY	FY	LY	pH	Urea	LSCC
RCT	0.232	0.845	-0.651	0.338	0.021	0.160	-0.011	0.181	0.612	-0.310	-0.229	-0.237	-0.071	-0.272	0.777	-0.083	0.110
logK ₂₀	0.654	0.293	-0.827	0.040	-0.308	0.041	-0.105	-0.080	0.347	-0.194	-0.145	-0.217	-0.008	-0.181	0.706	-0.268	0.070
A ₆₀	-0.590	-0.640	0.180	0.124	0.426	0.128	0.286	0.292	-0.056	0.432	0.186	0.340	0.224	0.253	-0.682	0.279	-0.346
ILCY	0.117	0.000	-0.052	0.315	0.785	0.194	0.014	0.706	0.512	-0.280	-0.386	-0.223	-0.165	-0.414	0.081	-0.322	0.140
ILDCY	0.001	-0.125	0.137	0.811	0.182	0.047	0.048	0.755	0.377	-0.376	-0.341	-0.143	-0.102	-0.374	-0.336	-0.057	0.040
dCY	0.060	-0.046	-0.078	0.275	0.211	0.298	0.899	-0.270	-0.078	-0.025	0.794	0.833	0.829	0.765	0.126	0.083	-0.563
dDCY	0.000	-0.102	0.024	0.195	0.324	0.945	0.252	-0.316	-0.052	-0.073	0.872	0.904	0.909	0.851	-0.040	0.280	-0.665
PP	0.060	-0.112	0.150	0.365	0.392	-0.075	-0.052	0.335	0.596	-0.038	-0.619	-0.390	-0.419	-0.604	-0.139	-0.307	0.124
FP	0.023	-0.015	0.047	0.247	0.297	0.034	0.066	0.258	0.086	-0.057	-0.417	-0.300	-0.186	-0.396	0.285	-0.213	-0.160
LP	-0.172	-0.141	0.089	-0.061	-0.121	0.107	0.073	-0.124	-0.185	0.194	0.113	0.151	0.044	0.232	-0.270	-0.065	-0.403
MY	-0.017	-0.059	-0.044	-0.239	-0.202	0.854	0.845	-0.261	-0.083	0.185	0.343	0.962	0.897	0.989	-0.073	0.240	-0.626
PY	-0.004	-0.093	-0.005	-0.152	-0.105	0.864	0.863	-0.031	-0.023	0.183	0.966	0.252	0.920	0.959	-0.156	0.155	-0.703
FY	0.005	-0.047	-0.015	-0.092	-0.035	0.792	0.800	-0.119	0.377	0.090	0.868	0.872	0.214	0.884	-0.029	0.151	-0.667
LY	-0.038	-0.075	-0.033	-0.238	-0.208	0.844	0.832	-0.260	-0.102	0.297	0.991	0.958	0.847	0.328	-0.110	0.238	-0.667
pH	0.674	0.613	-0.551	0.109	-0.139	0.071	-0.051	-0.075	-0.050	-0.219	-0.095	-0.120	-0.097	-0.114	0.471	-0.021	0.394
Urea	-0.101	-0.105	0.070	-0.036	0.031	0.051	0.085	0.175	0.123	-0.035	0.068	0.107	0.111	0.063	-0.085	0.211	0.084
LSCC	0.224	0.184	-0.088	0.123	0.072	-0.183	-0.203	0.187	0.068	-0.460	-0.274	-0.244	-0.217	-0.313	0.304	0.015	0.249

RCT= rennet clotting time; $\log K_{20}$ = logarithm base 10 of curd-firming time (K_{20}); A_{60} is the curd firmness at 60 min after rennet addition; ILCY=individual laboratory cheese yield; ILDCY=individual laboratory dried curd yield; ; dCY=Total individual laboratory cheese yield; dDCY=Total individual laboratory dried curd yield; PP=protein percentage; FP=fat percentage; LP=lactose percentage; MY=milk yield; PY=protein yield; FY=fat yield; LY=lactose yield; pH=pH in milk; Urea=urea in milk; LSCC= binary logarithm of the somatic cell count in milk.

Figures

Fig 1. Relative selection efficiency (RSE) of milk production traits (PP, FP, LP, MY, PY, FY, LY); functional traits (pH, Urea LSCC) or the ASSAFE index when used as proxies for MCP (RCT, logK₂₀, A₆₀; see A1 and B1 plots), and CY traits (ILCY, ILDCY, dCY, dDCY; see A2 and B2 plots). The estimates based on ram's progeny test are presented in A1 and A2 graphs. The estimates based on ewe own record are presented in B1 and B2 graphs.

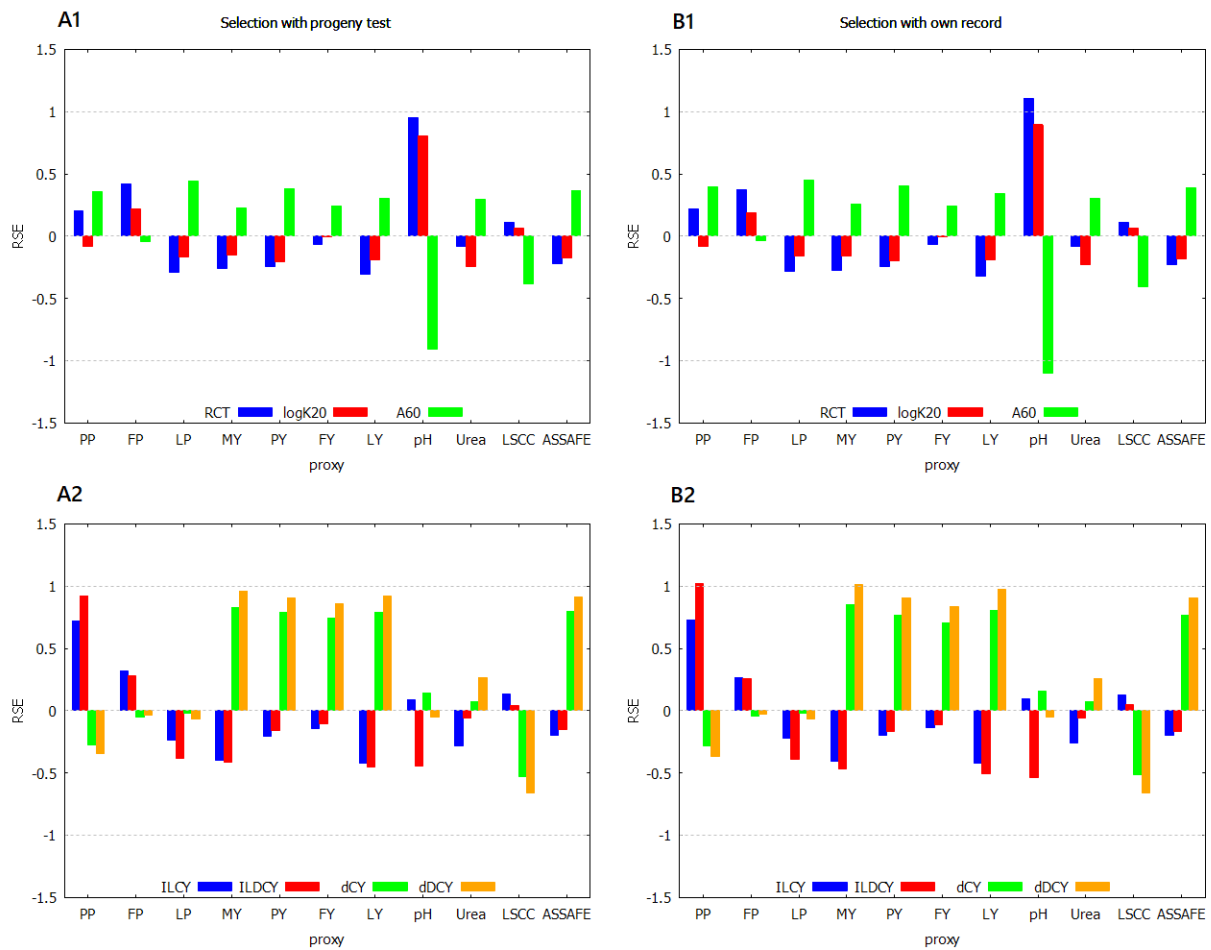


Fig 2. Relative selection efficiency (RSE) expected on the MCP (RCT, logK20, A60; see A1 and B1 plots) and CY traits (ILCY, ILDCY, dCY, dDCY; see A2 and B2 plots) when varying the relative weight given to the selection objectives: considering RCT versus ILCY (plots A1 and A2) or A60 versus ILCY (plots B1 and B2). The selection criteria are based on progeny test information and the index included PP, FP, PY, FY, pH, Urea, and LSCC.

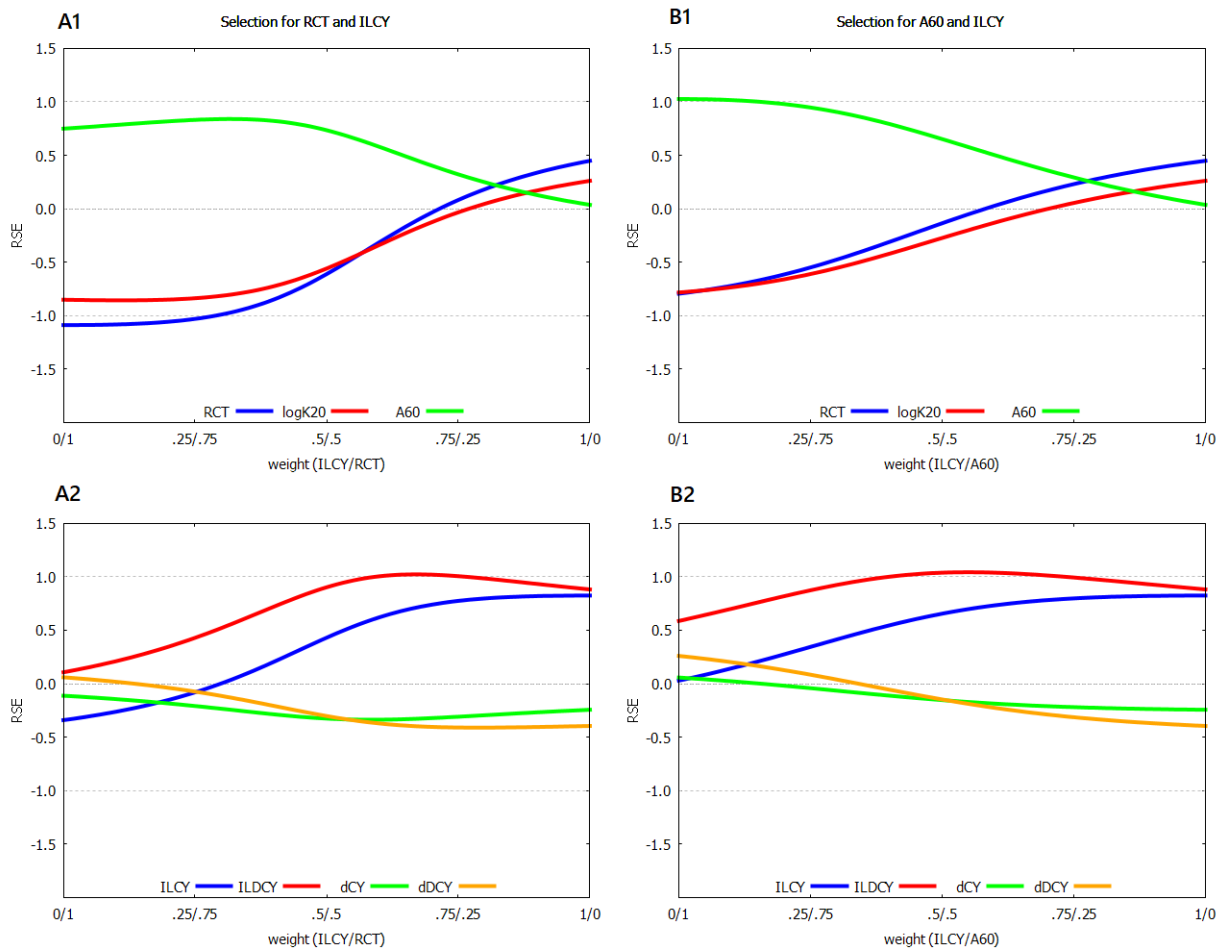


Fig 3. Relative selection efficiency (RSE) expected on the MCP (RCT, logK₂₀, A₆₀; see A1 and B1 plots) and CY traits (ILCY, ILDCY, dCY, dDCY; see A2 and B2 plots) when varying the relative weight given to the selection objectives: considering RCT versus ILCY (plots A1 and A2) or A₆₀ versus ILCY (plots B1 and B2). The selection criteria are based on the ewe own record and the index included PP, FP, PY, FY, pH, Urea, and LSCC.

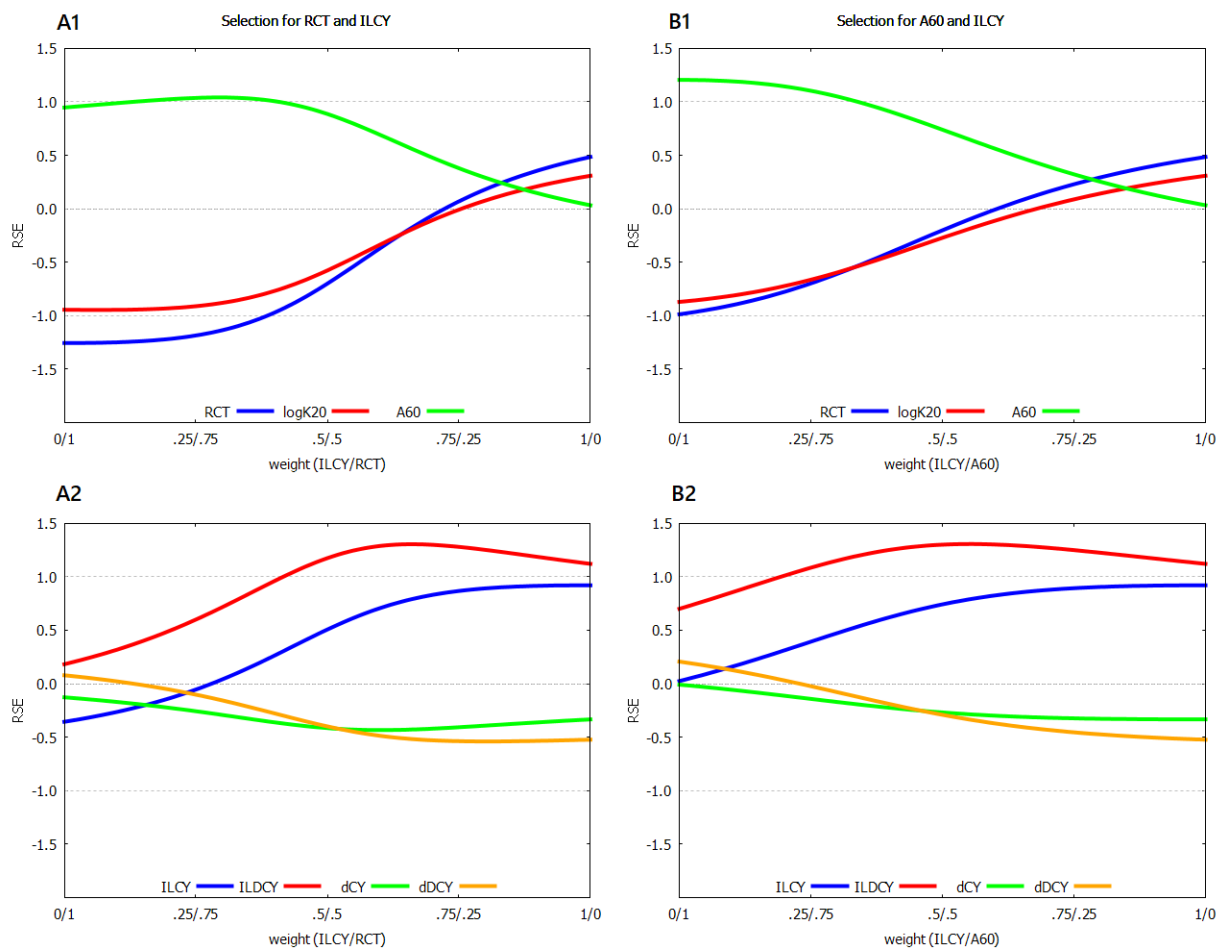
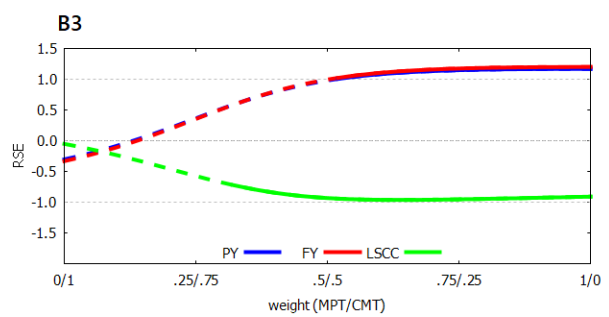
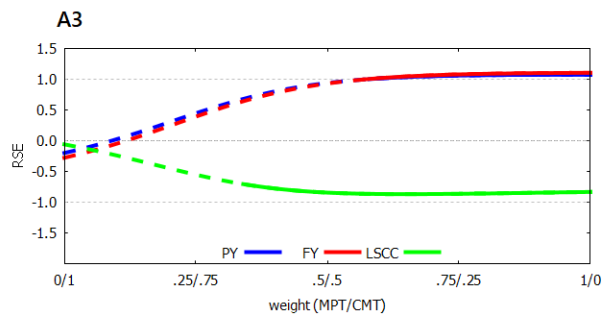
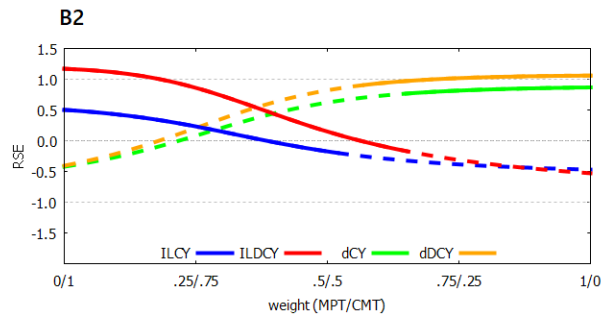
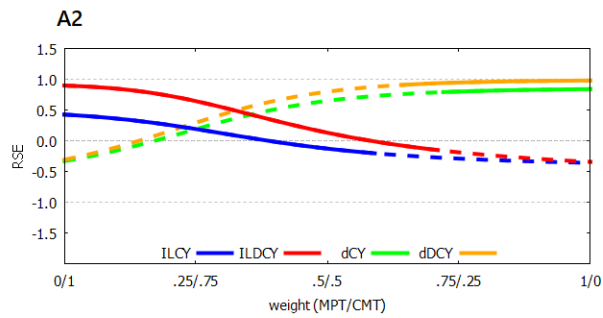
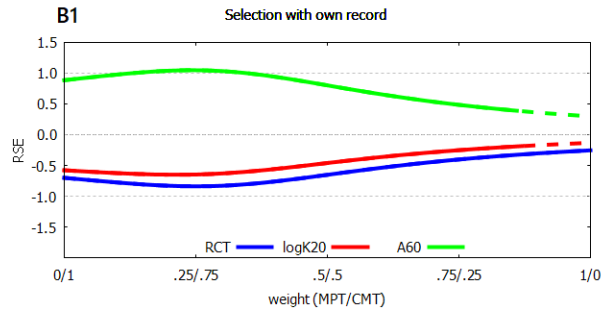
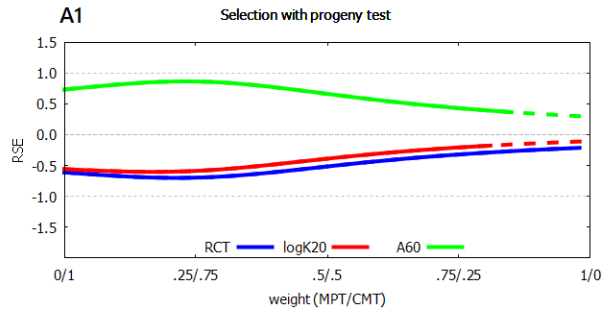
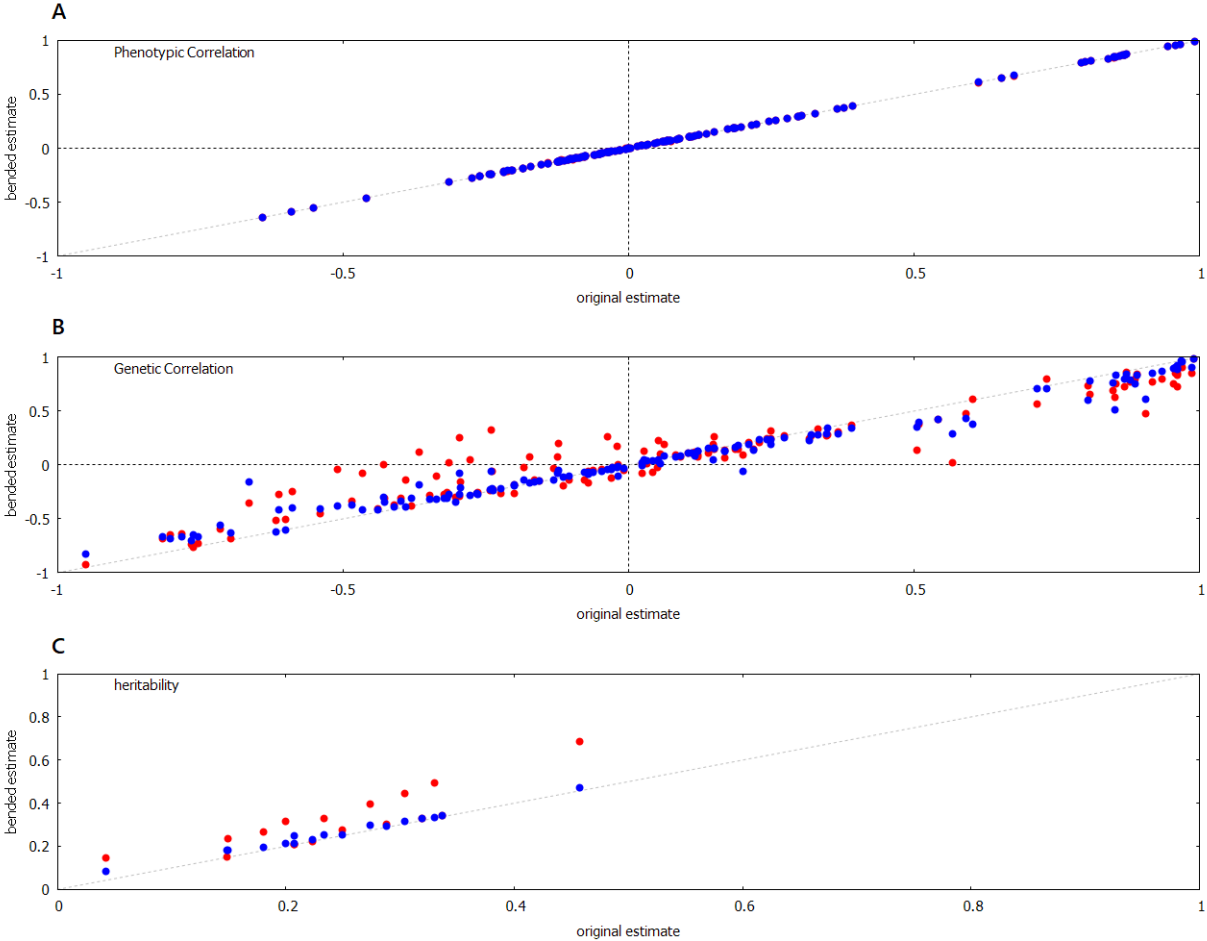


Fig 4. Relative selection efficiency (RSE) expected on the MCP (RCT, logK₂₀, A₆₀; see A1 and B1 plots), CY traits (ILCY, ILDCY, dCY, dDCY; see A2 and B2 plots) and PY, FY and LSCC (see A2 and B2 plots) when varying the relative weight given to CMT (RCT and ILCY with the same weight) and production traits (PY and FY with the same weight as in the ASSAFE index). The selection criteria are based on progeny test information (plots A1, A2 and A3) or on the animals' own record (plots A1, A2 and A3) and the index included PP, FP, PY, FY, pH, Urea, and LSCC. For illustration, for the position 0.25/0.75, the actual economic weights given to RCT, ILCY, PY and FY are 0.25*0.5, 0.25*0.5, 0.75*0.63 and 0.75*0.37, respectively. The section of the curves shown in dashed lines indicate the cases when the RSE with the proposed selection index is lower than the expected RSE using the ASSAFE index.



Supplementary Information

Supplementary Fig S1. Scatter plot with original and bended estimates of the phenotypic (A1), and genetic (B1) correlations and heritabilities (C1) when bending was done on the original (blue circles) or the rescaled-standardized (red circles) variance-covariance matrices.



Discusión General

General Discussion

Discusión General

Esta tesis ha tratado principalmente la evaluación genética y genómica en dos razas españolas de ganado ovino de aptitud lechera, la raza Churra y la raza Assaf. Una primera tarea ha sido realizar la valoración genómica en la raza Churra y como segunda tarea la realización de estudios preliminares del cálculo de parámetros genéticos y selección indirecta en la raza Assaf en nuevos caracteres a la selección, como son los caracteres de coagulación, con el objetivo de aplicar en el futuro técnicas de selección genómica en estos nuevos caracteres.

Esta tesis fue estructurada como sigue: en la introducción, se realizó una breve descripción de la situación actual en cuanto a la selección genética y genómica del ganado ovino de leche en España. Además, se realizó una revisión bibliográfica sobre los factores más descritos que afectan a las predicciones genómicas. En la sección de materiales y métodos, se describieron los métodos aplicados tanto a datos reales como simulados. Se expusieron por capítulos los manuscritos confeccionados para el cumplimiento de los diferentes objetivos planteados en esta tesis en la sección de resultados. Finalmente, se hizo una discusión general de la tesis completa y se describieron sus conclusiones generales.

Objetivo 1. Evaluar el beneficio potencial de los métodos de predicción genómica en el esquema de selección implementado por ANCHE en la población de ovejas Churra.

Este objetivo fue tratado en el manuscrito 1 de los resultados. El estudio evaluó si los métodos de predicción genómica, usando un grupo de animales históricos genotipados y usados como

población de referencia, mejoraría la evaluación genética en la raza Churra. La asociación ANCHE, encargada del programa de mejora genética de esta raza, realiza la valoración genética de los controles diarios usando el BLUP como método para el cálculo de los valores genéticos, donde ajusta un modelo que tiene en cuenta la curva de lactación a nivel fenotípico. ANCHE usa un modelo base para la evaluación genética, por lo que en este capítulo se propuso replicar este modelo en la población completa de Churra para calcular los fenotipos corregidos y probar los diferentes enfoques de selección genómica usando diferentes grupos de candidatos de interés con el fin de probar si la información genómica disponible era válida bajo este modelo, y así facilitarle a ANCHE una primera estimación genómica. Los resultados observados en la población de Churra fueron más tarde validados con simulación para replicar la estructura de los datos (pedigrí, genotipos y fenotipos) similar a los datos reales usados en este estudio. Dos estudios de simulación fueron realizados para validar los resultados de los datos reales: el primer estudio fue evaluar los valores de los genotipos y un segundo estudio fue evaluar el impacto de la estructura de los datos reales.

Usamos tres diferentes métodos de evaluación genómica, GBLUP, DGBLUP y ssGBLUP, donde todos ellos fueron comparados con el método BLUP basado en la información del pedigrí. Para esto, se usó información molecular tanto de machos (235 individuos) como hembras (1,667 hembras pertenecientes a 16 familias paternas de medias hermanas), de un chip de 50K de SNPs, con un total de 1,902 animales. Cuatro diferentes grupos de candidatos fueron considerados: (i) 1,667 hembras genotipadas asumiendo que los candidatos tienen medias hermanas en la población de referencia, (ii) hijas no genotipadas de los machos genotipados, (iii) hembras más jóvenes no genotipadas en la población actual y (iv) machos genotipados. Los criterios para comparar los

diferentes métodos fueron: (i) la correlación entre los fenotipos corregidos no observados y el mérito genético estimado obtenido en cada método de evaluación con validación cruzada de 5 iteraciones en las hembras candidatas; y (ii) la correlación entre el mérito genético de los machos testados (o sea, el método de evaluación BLUP usando las observaciones de las hijas) y no testados (o sea, el método de evaluación (ssG)BLUP excluyendo las observaciones de las hijas) usando validación cruzada de 5 iteraciones en los machos candidatos. Dependiendo del grupo de candidatos, todos los métodos de selección genómica o algunos de ellos fueron usados.

Como ya hemos comentado, se estimaron los fenotipos corregidos usando el modelo de ANCHE, con la única diferencia que ellos usaban semanas en lactación y nosotros usamos días en lactación. Se realizaron ambos cálculos de los fenotipos corregidos, o sea, usando semanas en lactación como días en lactación y las diferencias fueron en los segundos y terceros decimales, por lo que preferimos usar días en lactación ya que era una variable continua y así facilitaba la convergencia del análisis REML, mientras que semanas en lactación era asumida a ser una variable discreta con 11 niveles y consumía más grados de libertad. Los fenotipos corregidos tenían los efectos fijos y efecto de la curva de lactación eliminados de ellos, dejando sólo los efectos genéticos aditivos (independientes de la curva de lactación) y los efectos residuales.

En el conjunto de datos de Churra, los métodos de evaluación genómica no mejoraron las predicciones de las hembras pertenecientes a los tres grupos de candidatas hembras (relativo a las estimas obtenidas con la evaluación estándar BLUP). La predicción para las hembras genotipadas, el cual eran medias hermanas de los individuos en la población de referencia, tuvieron una ligera mejora cuando usaban las observaciones de los controles diarios de los individuos genotipados (o sea, sin usar las observaciones de los controles diarios de los animales no genotipados), pero esta

pequeña ganancia desapareció cuando las observaciones fenotípicas de la población completa de Churra fue usada con ssGBLUP (es decir, incluyendo información fenotípica de los animales no genotipados). Los resultados de los machos candidatos, sin embargo, mostraron que el ssGBLUP puede mejorar la predicción de los machos genotipados (alrededor de un 50% extra de precisión comparado con el método estándar BLUP).

Una posible justificación de la pérdida de beneficios en los grupos de candidatas hembras pudiera ser el nivel de LD, un factor conocido por afectar las precisiones de las predicciones genómicas. En esta población de referencia, el LD calculado en el grupo de hembras candidatas genotipadas fue más bajo que el observado en los machos, con un r^2 promedio por pares de SNPs con una distancia menor de 10 kb fue de 0.3 (Chitneedi et al., 2017) y 0.4, respectivamente. Para testar si las diferencias en el nivel de LD entre machos y hembras está influenciando los resultados observados, realizamos un primer estudio de simulación. Los datos fenotípicos fueron simulados usando los genotipos reales de las hembras genotipadas para replicar el escenario de cuando las candidatas hembras y sus medias hermanas son evaluadas. Contrario a los datos reales, el análisis de los datos simulados mostró que el método de evaluación genómica usado mejoró significativamente la predicción de las medias hermanas de las hembras genotipadas. La ventaja del GBLUP varió entre 49.4% y 64.6% de mejor predicción usando fenotipos no observados que el BLUP estándar (o sea, ventaja del 1.0% a 7.4% observado en el conjunto de datos reales de Churra). Por lo tanto, el bajo nivel de LD observado con el chip de 50K de SNPs en la población de entrenamiento femenino, no explica completamente el pobre desarrollo de las predicciones genómicas en las candidatas femeninas vistas en los datos reales. Además, los resultados también

indicaron que el procedimiento de control de calidad aplicado a los genotipos SNPs no tuvo un impacto negativo en las predicciones genómicas.

Otra posible explicación para los resultados obtenidos en las candidatas hembras, es la estructura de los datos reales. La población bajo este estudio es caracterizada por un profundo pedigrí, una larga cantidad de observaciones fenotípicas, principalmente para los animales no genotipados, y una estructura subóptima de los animales pertenecientes a población de entrenamiento, además de su posición dentro de la población completa. Tales características pudieran ser ideal para la evaluación genética usando el método estándar BLUP, pero no muy óptima para las evaluaciones genómicas, implicando muy bajo beneficio de usar la GS (Swan, 2012). Para testar tal hipótesis, la segunda simulación replicó la misma estructura de los datos de la población de Churra, o sea, pedigrí, fenotipos y genotipos. Los resultados de esta simulación mostraron un beneficio sustancial de las evaluaciones genómicas cuando se predecía los fenotipos no observados de las candidatas femeninas genotipadas (comparado con este mismo grupo, pero para los datos reales, donde se observó pequeño o ningún beneficio). Por otro lado, los resultados para las candidatas femeninas no genotipadas fueron las mismas como en datos reales (o sea, ningún beneficio de la predicción genómica), por lo que la propagación de los datos genotípicos a través del pedigrí no ocurre o es demasiado pequeña para tener un impacto significativo y práctico en la evaluación genética de los candidatos no genotipados. Las conclusiones de este estudio de simulación indican que la estructura del esquema no explica completamente la pérdida de beneficio en las candidatas hembras genotipadas encontrada con los datos reales de Churra.

Otra posible causa es la manera errónea de obtener los fenotipos corregidos. O sea, una posible justificación es que el modelo aplicado por ANCHE tiene en cuenta el efecto de la curva de

lactancia a nivel fenotípico, por lo tanto, los fenotipos corregidos no captarían diferencias en los efectos genéticos a lo largo de la curva de lactación. Sería de gran interés en el futuro desarrollar un modelo que mejore las predicciones. Los fenotipos corregidos fueron calculados usando el mismo modelo y asumiendo que no hay diferencias en los efectos genéticos durante la lactación, por lo que sus correlaciones con los GEBVs no deberían estar afectadas negativamente para eliminar cualquier superioridad potencial de los métodos de predicción genómica. Sin embargo, aún se requieren más estudios para determinar si la predicción genómica mejoraría la predicción de los controles diarios no observados al ajustar un modelo que tenga en cuenta la curva de lactación a nivel genético.

Los resultados de las simulaciones y los datos reales de Churra muestran que la predicción genómica usando información molecular y fenotípica actualmente disponible en la población de Churra deberían proveer un impacto beneficioso en la evaluación de los candidatos machos, pero no en las hembras. Cualquier efecto beneficioso de las evaluaciones genómicas en las candidatas femeninas pueden retrasarse hasta que no se genotipen más animales y se forme una población de referencia de tamaño adecuado y estructura más óptima.

Objetivo 2. Cuantificar el impacto de la proporción de candidatos a ser genotipados y la estrategia de selección en el beneficio sostenido del ssGBLUP.

El capítulo 2 de la sección de resultados se basó en este objetivo. Nos planteamos tres estrategias de selección para seis diferentes proporciones de animales candidatos a ser genotipados usando el ssGBLUP como método de evaluación genómica. Dado que la implementación de la selección genómica en razas menos importantes económicamente, como la oveja española Churra, el costo

inicial del genotipado para crear una población de referencia puede ser bastante alto en relación con el valor económico de los animales, por lo que estrategias de selección para crear un conjunto óptimo de animales candidatos para pertenecer a una población de referencia son de gran interés para una primera implementación de esta técnica en este tipo de razas. Un estudio de simulación se realizó para evaluar el impacto de diferentes proporciones y estrategias de genotipado para seleccionar los candidatos a ser genotipados. Las tres estrategias de genotipado consistieron en escoger los animales, primero con los valores fenotípicos más altos (TOP), segundo, aquellos animales con valores fenotípicos extremos (EXTREME) y, por último, animales escogidos aleatoriamente (RANDOM). Tres criterios de comparación entre escenarios fueron usados, (i) la ganancia genética acumulada, (ii) la fiabilidad de los GEBVs y (iii) la varianza genética retenida. Además, se definió un parámetro de Eficiencia para comparar los diferentes escenarios usando ssGBLUP, donde este parámetro indica el beneficio adicional que se observa en los diferentes escenarios del ssGBLUP sobre el escenario que utiliza el método BLUP expresado como una proporción del beneficio que el GBLUP tiene sobre el BLUP (ya que el GBLUP puede ser visto como un escenario ssGBLUP con todos los candidatos genotipados, representando así como el límite superior que el ssGBLUP puede mejorar la respuesta/predicción genética).

Como era de esperar, el resultado del ssGBLUP mejoró con el incremento de la proporción de candidatos genotipados. En general, el beneficio del ssGBLUP fue casi lineal con la proporción de candidatos a ser genotipados, o sea, genotipando una cantidad X de animales candidatos, alcanzaría una X cantidad de beneficio observado en el GBLUP sobre el BLUP, siendo TOP la mejor estrategia y RANDOM la peor. Estos resultados son diferentes a los mostrados en otros estudios (Granleese et al., 2019; Howard et al., 2018) que reportaban ganancias muy altas con

pequeñas proporciones de candidatos. Sin embargo, cuando se analizó la fiabilidad de los GEBV, la mejor estrategia la tuvo EXTREME, seguida por RANDOM y por último TOP. Por lo que llegamos a una contradicción entre los resultados obtenidos de la ganancia genética y la fiabilidad de los GEBVs, donde de manera general se reflejó que, cuando analizábamos la ganancia genética la mejor estrategia era TOP y en el caso de la fiabilidad la mejor fue EXTREME, la cual no tiene mucho sentido porque en generaciones discretas la ganancia genética extra se debe a una mejor predicción, por lo tanto, se espera que la estrategia de genotipado con mayor fiabilidad tenga una mayor ganancia genética. Para indagar en este asunto, se realizaron estudios independientes entre candidatos genotipados y no genotipados para comprobar el comportamiento de las diferentes estrategias de genotipado, el cual reflejaron que la fiabilidad de los GEBV para el grupo de candidatos genotipados tuvo el mismo comportamiento que cuando se calculó la fiabilidad global, no así cuando se analizó el grupo de candidatos no genotipados, donde la mejor estrategia fue RANDOM, seguida por TOP y EXTREME. Este último análisis nos hizo pensar más sobre qué estaba pasando, ya que es conocido que la ganancia genética es una función de la fiabilidad. Se decidió profundizar a nivel de proporción de candidatos seleccionados a ser genotipados para candidatos machos y hembras y se observó que TOP era el protocolo con mayor proporción de candidatos seleccionados a ser genotipados en ambos casos.

Las conclusiones más relevantes de este estudio fueron: (1) el beneficio del ssGBLUP fue similar a lo largo de las generaciones, (2) el beneficio del ssGBLUP fue casi lineal con la proporción de animales candidatos genotipados, (3) la estrategia de genotipado afecta los resultados del ssGBLUP; o sea, cuando se analizó la ganancia genética el ranking de los protocolos fue: $TOP \geq EXTREME \geq RANDOM$, donde EXTREME dependía de la proporción de candidatos

genotipados, siendo EXTREME = TOP para alta proporción de candidatos o EXTREME = RANDOM cuando la proporción era baja. El ranking alcanzado cuando se analizó la fiabilidad fue: $EXTREME \geq RANDOM > TOP$ y, por último, cuando se analizó la proporción de candidatos seleccionados siendo genotipados, el ranking fue: $TOP > EXTREME > RANDOM$.

Por lo tanto, como nota especial de este estudio debemos decir que especial atención cuando se usa la fiabilidad como un indicador del ssGBLUP, ya que no puede ser considerado como un criterio suficiente y absoluto para determinar cuál esquema maximizaría la ganancia genética a lo largo de múltiples generaciones.

Objetivo 3. Estudio de nuevos caracteres a la selección que pueden beneficiarse de las evaluaciones genómicas.

El capítulo 3 y 4 de la sección de los resultados describieron completamente este objetivo. Estos estudios estuvieron basados en la estimación de los parámetros genéticos y selección indirecta en caracteres de coagulación en una muestra de la población actual de la raza ovina de leche Assaf y con el fin de iniciar el estudio de estos caracteres como candidatos a la selección y aplicar en el futuro posibles estudios de selección genómica. Estos caracteres de la calidad de la leche se están convirtiendo cada vez más en un tema de interés mundial debido a la creciente producción y consumo de queso, por lo que los convierte como nuevos objetivos para el ganado de ovino de leche y por lo tanto en nuevos caracteres de interés para la mejora genética y futuros caracteres candidatos para la aplicación de la selección genómica. Cabe decir, que estos trabajos (capítulos 3 y 4 de los resultados) fueron los primeros que reportaron el estudio de la estimación de parámetros genéticos para caracteres de coagulación de la raza Assaf y aplicación de la selección indirecta

para la mejora de dichos caracteres usando caracteres de producción, composición y funcionales como proxis.

Los seis caracteres de coagulación analizados en esta tesis fueron: dos caracteres relacionados con el tiempo de coagulación, RCT que representa el tiempo de coagulación desde el momento que se vierte la enzima y K_{20} que es referido al tiempo requerido en minutos para que el cuajo alcance una consistencia con una amplitud de 20 milímetros; dos caracteres concernientes a la formación del cuajo y la amplitud de este en milímetros, A_{30} y A_{60} , ambos medidos en dos tiempos, a los 30 y 60 minutos, respectivamente, y por último dos caracteres referentes a la producción de queso, ILCY (gramos/ml) que representa la producción de queso individual de laboratorio e ILDCY (gramos/ml) que son los sólidos totales obtenidos en ILCY. Además, dos caracteres más fueron calculados, la producción total diaria de ILCY (dCY, gramos) y la producción total diaria de los sólidos totales obtenidas con ILDCY (dDCY, gramos) (Bittante et al., 2013, 2012). Estos dos últimos caracteres fueron usados para el capítulo 4 de los resultados.

El rango de las estimaciones de los parámetros genéticos calculados en estos estudios para los caracteres de coagulación estuvo en correspondencia con los rangos descritos en la literatura tanto para el ganado bovino como ovino. Uno de los resultados más relevantes del capítulo 3 fue el número de valores perdidos, o sea, el número de muestras de leche que no coagularon a los 60 minutos. En muchos estudios realizados en otras razas de ovino, como la raza italiana Sarda (Bittante et al., 2012; Pazzola et al., 2018; Puledda et al., 2017), reflejan que el tiempo del proceso de coagulación de la leche de ovino es más rápido que el de vaca (Bencini, 2002; Bittante et al., 2012), o sea, el carácter RCT en ovino debería ser más corto que en bovino, sin embargo, en nuestro estudio no reflejó dicho suceso. Además, a los 30 minutos alrededor de la mitad de las

muestras no habían coagulado, y al final del proceso (a los 60 minutos), un 13% de muestras fueron declaradas como valores perdidos, siendo estos resultados también contradictorios con lo descrito en la literatura y mostrando que este estudio estuvo más afectado por las muestras de lenta coagulación, sugiriendo así que el carácter A_{60} es más apropiado que el carácter de la firmeza de la cuajada a los 30 minutos para esta raza. Sólo 8 muestras estuvieron relacionadas con el proceso de la sinéresis, indicando que este proceso no fue el de mayor problema en nuestro estudio.

Muchas pudieran ser las razones por las que las muestras no coagularan: genéticas y/o ambientales (Bittante et al., 2012; Ikonen et al., 1999). Una primera posible causa y comparada respecto a otros estudios, es la temperatura aplicada en el proceso de elaboración del queso. Bittante et al. (2012) hacen una comparación de diferentes estudios basados en el parámetro temperatura. Ellos encontraron que aquellos estudios donde el proceso de elaboración de queso utilizaba temperaturas más bajas, tenían mayor cantidad de muestras sin coagular, aunque no declararon una temperatura óptima para este proceso. Sin embargo, Troch et al. (2017) informaron que la temperatura por debajo de 20°C la formación del cuajo es leve, por encima de 65°C se vuelve inactiva y la temperatura óptima sería entre 40°C y 42°C. Troch et al. (2017) también realizaron una revisión de otros factores que afectan el proceso de coagulación en vacas (coagulación enzimática, firmeza de la cuajada, sinéresis), donde describieron con mayor énfasis cinco de estos: la temperatura, la concentración de pH, calcio, caseínas y células somáticas en la leche. Hacen referencia a dos factores muy relacionados y que tienen una gran influencia en la coagulación de la leche y su rendimiento, los porcentajes de grasa y caseínas. La sinéresis y el contenido de agua en el producto, se ven afectados grandemente por la proporción de grasa en relación a la proporción de caseínas, ya que ambos caracteres se encuentran en los sólidos totales del queso y tienen un efecto

directamente proporcional con la producción de la cuajada (Troch et al., 2017; Walstra et al., 2006). El pH de la leche afecta el tiempo de coagulación y la firmeza del cuajo, así como la tasa de sinéresis y la calidad de la leche para el procesamiento del queso. A menor pH, menor tiempo de coagulación y mayor firmeza de la cuajada. El rango de los valores de pH en nuestras muestras osciló entre 6.18 y 7.36, lo cuales eran valores altos comparados con otros estudios donde refieren a que un pH entre 6.0 y 6.7 hace que la coagulación sea más rápida y la firmeza de la cuajada sea alta (Remeuf et al., 1991; Troch et al., 2017), sin embargo, otros autores han referido que un pH ideal sería entre 5.1 y 5.5 (Croguennec et al., 2008; Troch et al., 2017). La baja concentración de sales minerales como el calcio, magnesio y fósforo inorgánico pueden provocar una lenta coagulación o no coagulación de la leche, o sea, afectan el tiempo de coagulación y la firmeza del cuajo. Donde una relación muy descrita en varias literaturas es que, a mayor proporción de calcio, mayor es la velocidad de la coagulación. Además, a bajas temperaturas, el fosfato de calcio coloidal se disuelve, causando la interrupción de las micelas de la caseína y por lo tanto afecta a la formación del cuajo (Jensen et al., 2012; Remeuf et al., 1991; Troch et al., 2017). La leche con un elevado conteo de células somáticas puede inhibir la incorporación de proteínas a la cuajada, por lo que para un exitoso proceso de coagulación es más deseado bajos niveles de células somáticas (Pazzola et al., 2018; Politis and Ng-Kwai-Hang, 1988; Vallas et al., 2010). El conteo de células somáticas en nuestro estudio, estuvo en el rango de entre 11,000 y 27,139,000, y aunque no existe un valor de corte donde se pueda estratificar éste carácter y declarar que a partir de un punto la leche no coagulará, autores han observado que muestras de leche con niveles altos de células somáticas tenían niveles reducidos de caseínas y además largos tiempos de RCT,

conllevando a una alta proporción de muestras de lenta o no coagulación y poca firmeza del cuajo (Panthi et al., 2017).

Aunque las muestras para medir los caracteres de leche y los caracteres de coagulación no se obtuvieron el mismo día, o sea, los caracteres de leche fueron obtenidos de muestras distintas a la de coagulación; sí que realizamos un estudio del comportamiento de los parámetros genéticos entre todos los caracteres del estudio. En general, los valores de las correlaciones tanto fenotípicas como genéticas estaban dentro de los rangos descritos en la literatura, sin embargo, el carácter de porcentaje de proteína fue el que mostró una mayor relación con los caracteres de coagulación, en especial, los caracteres de producción de queso (ILCY e ILDCY). Los valores estimados de heredabilidad sugirieron que los caracteres de coagulación pueden ser mejorados a través de la selección, aunque debemos mencionar que un posible sesgo existió en la estimación de ellos debido al número limitado de rebaños utilizados en este estudio.

El capítulo 4 de los resultados, como ya habíamos dicho, estuvo basado en la evaluación de esquemas alternativos para la mejora de los caracteres de coagulación en la misma muestra de Assaf usada en el capítulo 3. Para estos resultados, no pudimos hacer ninguna comparativa debido a la escasez de estudios referente a esta temática. El índice de selección que usaba la asociación ASSAFE para la mejora genética, es la combinación lineal de dos caracteres de producción como objetivos primarios; estos son la producción de grasa y producción de proteínas, cada uno con el mismo peso asignado de 0.5, por lo que se estimó el impacto del índice de selección de ASSAFE en los caracteres de coagulación. Estos esquemas alternativos que se plantearon mantuvieron dichos objetivos primarios y otros índices de selección se plantearon usando como proxis los caracteres de leche rutinariamente medidos y finalmente un índice óptimo fue propuesto para

alcanzar una ganancia significativa en los caracteres de coagulación y rendimiento quesero sin comprometer la actual respuesta de los objetivos primarios considerados en el actual índice de selección de ASSAFE.

Como los caracteres de coagulación están limitados por el sexo y las estructuras de las poblaciones por lo general están representadas por media/grandes familias paternas y pequeñas familias maternas, la respuesta a la selección esperada en ovino fue calculada bajo dos diferentes suposiciones sobre los datos disponibles para la selección. Para hembras se asumió que las candidatas tenían solo un control para todos los caracteres medidos, mientras que los machos fueron testados asumiendo que cada candidato tenía 10 hijas, donde cada una de ellas tenía un solo registro de control. Como resultados principales de nuestro estudio obtuvimos que, como era esperado, los mejores proxis fueron el pH y el porcentaje de proteínas, donde dichos resultados no fueron muy diferentes a los descritos en otras literaturas, y como ya habíamos descrito anteriormente. Sin embargo, dentro de los caracteres relacionados a la coagulación y producción de queso, PP resultó ser más significativo como proxy para los caracteres de producción de queso, ILCY e ILDCY.

Además, se analizó la cuantificación del impacto del uso del actual índice de ASSAFE sobre los caracteres de coagulación. Se observó que el mayor impacto se proporcionó sobre los caracteres de producción de queso total, dCY y dDCY, sin embargo, en los demás caracteres de coagulación tuvo un efecto marginal. Además, se planteó un nuevo índice teniendo en cuenta los objetivos primarios, pero variando los diferentes caracteres y pesos. Encontramos que un índice de selección que contiene los caracteres PP, FP, PY, FY, pH, urea y SCC puede ser más óptimo, ya que produce un progreso genético sustancial en los caracteres de coagulación sin perder la misma tasa de

ganancia genética que cuando se usa el índice actual de ASSAFE. Desafortunadamente, solo unos pocos estudios han intentado cuantificar el beneficio potencial de la selección indirecta para caracteres de coagulación y esto se debe básicamente a la dificultad de evaluar tales caracteres a nivel individual y tener una gama de caracteres de leche que puedan ser estudiados como proxys. Aunque de manera general podemos decir que el aumento de SCC y el incremento de porcentaje de proteínas y grasa son indicadores de caracteres de que afectan la coagulación, seleccionar por estos caracteres se deberían tener en cuenta en cualquier índice de selección en ganado ovino de leche.

Discusión Global

Es indudable que la predicción genómica es una herramienta valiosa para mejorar el progreso genético en los programas de selección, ya que ésta puede ayudar a incrementar los valores genéticos estimados, incrementar la intensidad de selección, acortar el intervalo generacional y mantener la variación genética (Meuwissen et al., 2001; Doublet et al., 2019; García-Ruiz et al., 2016; Gómez-Romano et al., 2016; Woolliams et al., 2015). Estas características deseables han impulsado su implementación en muchas poblaciones de cría comerciales de varias especies de ganado (Christensen et al., 2012; Daetwyler et al., 2010b; Hayes et al., 2009a; Knol et al., 2016; Riggio et al., 2014; Tsai et al., 2016; VanRaden et al., 2009; Wolc et al., 2016). Sin embargo, la forma en que esta herramienta ha sido implementada varía entre los diferentes programas de cría, donde la puesta en marcha más rápida se observó en razas/poblaciones grandes y económicamente importantes, pero una puesta en marcha mucho más lenta fue observada en razas/especies pequeñas y menos importantes económicamente como la raza de oveja Churra Española. La principal razón para estas diferencias es el costo del genotipado necesario en el comienzo del

programa para crear una población de referencia inicial óptima y a lo largo de todo el programa de mejora genética para genotipar los candidatos actuales. Esta carga económica es más difícil de soportar para los criadores de razas más pequeñas y de menor importancia económica. En este proyecto, evaluamos las consecuencias cuando se tienen en cuenta diferentes enfoques para reducir el costo del genotipado en la población de la raza Churra.

Una opción para evitar el costo de crear una población de referencia inicial pudiera ser usando animales históricos ya genotipados, el cual para el caso de la ovejas Churra, los animales genotipados disponibles fueron 1,667 ovejas pertenecientes a 16 familias paternas de medias hermanas y que fueron objeto de estudios previos sobre mapeo de QTLs (García-Gómez et al., 2013; García-Gómez et al., 2012a) y además 235 corderos históricos con altos valores de mérito genético. La complicación de usar animales históricos es que ellos fueron genotipados para otros propósitos de investigación, por lo que la estructura de ese conjunto de animales genotipados puede no ser ideal. El tamaño de la población de referencia es importante, pero también lo es su relación con la población objetivo completa, para asegurar que la asociación entre marcadores y fenotipos es la misma en ambas, donde es conocido que asociación tiende a debilitarse con el paso de las generaciones (Oldenbroek and van der Waaij, 2015). Por lo tanto, el hecho de que las ovejas genotipadas son de 16 familias paternas de medias hermanas sería menos representativa en la población completa de ovejas Churra, y, por lo tanto, subóptima para ser utilizada como primera población de referencia para esta raza.

Nuestro estudio evaluó el impacto de usar esta población de referencia y mostró un incremento sustancial en las precisiones de los GEBVs de los machos analizados, pero dichas ganancias no se observaron en las candidatas hembras. En la literatura han reportado que las mejoras de las

predicciones genómicas pueden depender del sexo de los candidatos (Bolormaa et al., 2017; Calus et al., 2013; Lourenco et al., 2015), sin embargo, la falta de mejora en la predicción cuando el fenotipo no era observado en las ovejas genotipadas fue inesperada, ya que el esquema diseñado estaba compuesto por una población de medias-hermanas. Otros estudios han reportado que comúnmente cuando se realizan predicciones genómicas en candidatos cercanos a la población de referencia, éstas son más precisas que las obtenidas usando el método de evaluación basado en el pedigrí (Clark et al., 2012). Además, nuestro estudio de simulación reveló que este diseño de población de referencia en candidatas hembras debería haber sido adecuado para las predicciones genómicas, sugiriendo que el nivel de LD o la estructura actual de los datos en la población de ovejas Churra, pueden no ser las principales razones para los resultados vistos en el conjunto de datos reales. Una explicación potencial pudiera estar relacionada a el modelo de evaluación usado (basado en el modelo que usa ANCHE), donde múltiples controles diarios son usados para los análisis. El efecto de la curva de lactación es tenido en cuenta a nivel fenotípico (en vez de a nivel genético), por lo que pudiera ser que el criterio de comparación usado aquí, o sea, la correlación entre los GEBVs y los fenotipos no observados, no es adecuado si los efectos genéticos cambian sustancialmente a lo largo de la lactación para los caracteres considerados. Si bien no esperábamos este resultado porque la correlación entre el fenotipo y la predicción se realizó con fenotipos corregidos calculados con el mismo modelo de análisis, debemos decir que aún se requieren más estudios para definir el criterio correcto de comparación cuando las predicciones genómicas son evaluadas usando validación cruzada. Además, realizar estudios y comprobar si la curva de lactación se debe tener en cuenta a nivel genético cuando se utilizan observaciones de controles diarios. Hasta ahora, este estudio mostró que la evaluación genómica puede iniciarse en la

población Churra utilizando los animales históricos genotipados disponibles como población de referencia inicial para mejorar la predicción sobre candidatos machos.

Otro enfoque para reducir el costo de genotipado, sería genotipar sólo una proporción de candidatos usando el método ssGBLUP para incluir información de todos los animales y obtener los (G)EBVs tanto para animales genotipados y no genotipados. Nuestro estudio de simulación evaluó el impacto de tal método y mostró las consecuencias (en término del beneficio de las predicciones genómicas) de reducir la proporción de candidatos a ser genotipados, y también destacó la estrategia óptima para seleccionar los candidatos que necesitan ser genotipados para asegurar el máximo beneficio del ssGBLUP. Nuestro estudio mostró que candidatos priorizados a ser genotipados son aquellos el cual son más probables a ser seleccionados en vez de ser seleccionados aleatoriamente. La identificación de estos candidatos a ser genotipados puede ser detectada usando su propia información fenotípica (del mismo carácter o caracteres correlacionados), pero en el ganado ovino de leche, esta información puede no estar disponible ya que los caracteres de leche están limitados por el sexo y se expresan tarde en la vida del animal. El uso del promedio de los padres (*'parent's average'*) puede ser usado para identificar candidatos que deberían ser priorizados para genotipar, sin embargo, este enfoque identificará las mejores familias a ser genotipadas, pero no discriminaría entre candidatos de la misma familia, reduciendo la optimalidad de los candidatos a ser genotipados. Otro hecho importante observado en nuestra simulación fue que la ganancia genética más alta no fue alcanzada por la estrategia con más alta fiabilidad de los GEBVs, implicando que la precisión/fiabilidad de los GEBVs no pueden ser considerados como un criterio absoluto y suficiente para determinar qué esquemas maximizarían la ganancia genética a través de múltiples generaciones.

Nuestros estudios (capítulos 1 y 2 de la sección de resultados) proveen sugerencias relevantes en cómo reducir la carga económica al implementar la predicción genómica en la población de Churra. Ellos destacan que el costo de genotipado inicial para crear la población de referencia inicial puede evitarse utilizando un conjunto disponible de animales genotipados históricamente, y aún produce una mejora sustancial en la precisión de los GEBVs de los candidatos masculinos. Genotipando solamente una proporción de los candidatos actuales, puede resultar un buen compromiso para reducir el costo de funcionamiento del esquema y aún proporcionar una mejora en la precisión de los GEBVs. Dado los resultados del análisis con los datos de la población de Churra, genotipar los machos debería ser priorizado inicialmente, ya que la población de referencia es adecuada sólo para mejorar las precisiones de los GEBVs de los machos, pero no de las hembras. Este es un hecho afortunado ya que la mayor parte del progreso genético en los caracteres de las ovejas lecheras surge de la selección de machos, por lo que el impacto beneficioso de la predicción genómica en la población de Churra comenzaría desde el principio del esquema. Además, los caracteres de leche están limitados por el sexo, lo que significa que los candidatos machos tendrían predicciones exactas antes de realizar la prueba de progenie estándar, reduciendo así el intervalo generacional en el esquema de reproducción. La mejora en la precisión de los GEBVs de las candidatas hembras se retrasaría hasta que se forme una población de referencia más adecuada con las candidatas recién genotipadas.

Por otro lado, la mejora de los caracteres de producción de leche es solo uno de los principales desafíos de la industria lechera de ovejas. Dado que la mayor parte de la leche de oveja se utiliza para la producción de queso de alta calidad, la comprensión de los factores genéticos y ambientales que influyen en las propiedades tecnológicas de la leche de oveja es de suma importancia, así como

la redefinición de los objetivos de selección para incluir los caracteres de coagulación y producción de queso más valorados económicamente. En la presente tesis, se han definido varios caracteres de coagulación y producción de queso, y su caracterización genética ha demostrado que la selección para mejorarlos puede ser factible. Sin embargo, estos caracteres son difíciles y costosos de medir, por lo que tienden a no registrarse de forma rutinaria en la mayoría de los programas de mejora de producción de leche. Los resultados del capítulo 4 (sección de resultados) muestran que la mejora en los caracteres de coagulación y producción de queso se puede hacer indirectamente utilizando caracteres de tipo producción, composición y funcionales de la leche como proxys, y es compatible con el objetivo de selección más tradicional de mejorar estos últimos caracteres.

Finalmente, la rentabilidad de la selección genómica requiere que la ganancia económica asociada con el progreso genético exceda el costo agregado del esquema. Por lo tanto, la inclusión de caracteres más valorados económicamente como los caracteres de coagulación y producción de queso y la reducción del costo de genotipado haría que la predicción genómica sea más viable en la raza Churra y otras poblaciones económicamente menos importantes.

General Discussion

This thesis mainly deals with the genetic and genomic evaluation of two Spanish dairy sheep, the Churra and the Assaf breeds. The first task was to perform the genomic evaluation in the Churra breed and the second task was to carry out a study to estimate the genetic parameters of novel traits related to cheese-making traits with the objective of applying genomic selection techniques to these traits in the future.

This thesis was structured as follow: initially a brief introduction on the current situation regarding the genetic and genomic selection of dairy sheep in Spain was done. Then, a literature review was conducted on the most important factors affecting genomic prediction. In the materials and methods section, the methods applied to both real and simulated data were described. In the results section, the manuscripts prepared for the fulfillment of the different objectives set in this thesis were presented in chapters. Finally, a general discussion is given as well as the general conclusions drawn in the whole thesis.

Objective 1. To evaluate the potential benefit of genomic prediction methods in the selection scheme implemented by ANCHE in the Churra sheep population.

This objective was dealt in chapter 1 of the results section. The study assessed whether genomic prediction methods, using a group of historically genotyped males and females (which were genotyped for other research purposes) as the reference population, would improve the genetic evaluation in the Spanish Churra sheep breed. The ANCHE association, in charge of the Churra genetic improvement program, performs the genetic evaluation on test-day records using the

standard BLUP method, which fits a model where the lactation curve is taken into account at the phenotypic level. The same model of evaluation (with a minor variation explained below) was used on the entire population to correct the phenotypes, which were later used to assess the benefit of different genomic prediction approaches on different groups of candidates. The results observed in the Churra population were later validated with simulation mimicking a data structure (pedigree, genotype and phenotype information) similar to the real dataset used in this study. Two simulation studies were carried out to validate the results from real data: the first study was to assess the value of the genotypes and a second one to evaluate the impact of the data structure of the real data.

We evaluated three different genomic evaluation methods (GBLUP, DGBLUP and ssGBLUP) comparing them with the standard BLUP method using pedigree information. The historical males (235 rams) and females (1,667 ewes belonging to 16 paternal half-sib families) used as the reference population were genotyped with the Illumina 50K SNP chip. Four different candidate groups were considered: (i) the 1,667 genotyped ewes assuming that the candidates have half-sib sisters in the training population, (ii) ungenotyped daughters of the genotyped males with no genotyped daughters, (iii) the youngest non-genotyped ewes in the current population and (iv) genotyped males. The criteria for comparing the different methods were: (i) the correlation between the unobserved corrected phenotypes and the estimated genetic merit obtained for each evaluation method in a 5-fold cross-validation study in the ewes candidates; and (ii) the correlation between the genetic merit of rams when tested (i.e. the BLUP evaluation using their daughters' performance records) and when untested (i.e. the (ssG)BLUP evaluation excluding their daughters' performance from the evaluation) in a 5-fold cross-validation study in the rams

candidates. Depending on the group of candidates, all genomic selection methods or only some of them were used.

The corrected phenotypes were calculated using the ANCHE model, with a minor difference that we fitted days-in-milk as covariate instead of weeks-in-milk as factor effect. This modification was tested by calculating the corrected phenotypes with the model fitting either weeks-in-milk (as factor effect) or days-in-milk (as covariate), and the differences between the breeding values from both calculations were in the second or third decimals. Hence, we opted to use days-in-milk as it improved the convergence of the REML analysis, and it uses less degrees of freedom than the model fitting weeks-in-milk. The corrected phenotypes had the fixed effects and lactation curve effect removed from them, leaving only the additive genetic effects (independent of lactation curve) and the residual effects.

In the Churra dataset, the genomic evaluation methods did not improve the predictions of ewes belonging to either of the three female candidate groups (relative to estimates obtained with standard BLUP evaluation). The prediction for genotyped ewes, which are half-sibs of individuals in the training genotyped population, had a slight improvement when using genomic prediction only on the test-day records of genotyped individuals (i.e. without using test-day records from ungenotyped animals), but this minor advantage disappeared when phenotypic records from the whole Churra population was used with ssGBLUP (i.e. including phenotypic information from ungenotyped animals). The results for the ram candidates, however, showed that ssGBLUP can improve the prediction of genotyped males (*circa* 50% extra accuracy compared with the standard BLUP evaluation).

A possible explanation for the lack of benefit in the female candidate groups could be the level of LD, a factor known to affect the accuracy of genomic predictions. In this reference population, the LD level in the genotyped female group was lower than that observed in the male one; with the average r^2 for SNPs pair with a distance of less than 10 kb was 0.3 and 0.4, respectively (Chitneedi et al., 2017). To test whether the difference in the LD level between male and female training animals is influencing the observed results, we performed the first simulation study. Phenotypic data was simulated using the real genotypes from the genotyped ewes to mimic the situation when the prediction of female candidates with half-sibs of the training set is evaluated. Contrary to the real dataset, the analysis of the simulated data showed that the genomic evaluation methods significantly improve the prediction of half-sisters of the training ewes. The advantage of GBLUP ranged between 49.4% and 64.6% better prediction of the unobserved phenotype than standard BLUP (cf. 1.0% to 7.4% advantage observed in the real Churra dataset). Hence, the low level of LD observed with the 50k SNP chip in the female training population does not fully explain the poor performance of genomic prediction on female candidates seeing in the real dataset. Additionally, the results also indicate that the QC procedures applied to the SNP genotypes did not have a negative impact affecting the performance of the genomic prediction methods.

Another possible explanation for the results obtained in the female candidates is the structure of the real data. The population under study is characterised by a larger quantity of phenotypic data mainly from ungenotyped individuals, a suboptimal structure of the genotyped training set and its position within the entire population. Such characteristics could be ideal for the genetic evaluation using the standard BLUP method but not optimal for genomic evaluation including molecular information and, therefore, the lower the benefit of using GS (Swan, 2012). To test such

hypothesis, the second simulation study was designed to mimic the same pedigree, phenotypic and genotypic data structure observed in the Churra population. The results from this simulation study showed a substantial benefit from the genomic evaluation when predicting the unobserved phenotypes of genotyped female candidates (cf. little or none benefit was observed in the real data for this candidate group). On the other hand, the results for the ungenotyped female candidates were the same as with the real data (i.e. no benefit of genomic prediction), so the propagation of the genotypic data throughout the pedigree does not occur or is too small to have a significant and practical impact on the genetic evaluation of ungenotyped candidates. The conclusions from this simulation study indicates that the structure of the scheme does not fully explain the lack of benefit in genotyped female candidates found with the real Churra dataset.

Another possible cause which may explain the results seeing in the real dataset could be that the phenotypes were not properly corrected. The model used by ANCHE accounts for the effect of the lactation curve at the phenotypic level, so therefore, the corrected phenotypes would not capture differences in genetic effects across the lactation curve. The corrected phenotypes were calculated using the same model assuming no differences in genetic effects across the lactation, so their correlations with the GEBVs should not be negatively affected to remove any potential superiority of the genomic prediction methods. However, further studies are still required to determine if genomic prediction would improve the prediction of unobserved test-day records when fitting a model accounting for lactation curve at the genetic level.

The results from the simulations and the real dataset shows that genomic prediction using the molecular and phenotypic information currently available in the Churra population should provide a beneficial impact on the evaluation of male candidates, but not for female ones. Any beneficial

effect from genomic evaluation on female candidates may be delayed until more animals are genotyped and a training population of adequate size and more optimal structure is formed and used in the evaluation.

Objective 2. To quantify the impact of the proportion and the selection strategy on the sustained benefit of single step genomic BLUP.

The study presented in chapter 2 of the results section dealt with this objective. We compared three genotyping strategies and six proportions of candidates to be genotyped when using ssGBLUP as for the genetic evaluation. The implementation of genomic selection in less economically important sheep breeds, such as the Spanish Churra sheep, the genotyping cost can be very high in relation to the economic value of the animals. Hence, optimal strategy to determine the set of candidates to be genotyped are of great importance for the implementation of GS in these breeds. A simulation study was carried out to evaluate the impact of the proportion and the genotyping strategies to select the candidates to be genotyped. Three different genotyping strategies were considered in this study: (i) candidates with the highest phenotypic values (TOP); (ii) candidates with extreme (low and high) phenotypic values (EXTREME); and (iii) candidates chosen at random (RANDOM). The criteria of comparison were, (i) the accumulated genetic gain, (ii) the reliability of the GEBVs and (iii) the retained genetic variance. A parameter denoted as Efficiency was defined to compare the different scenarios using ssGBLUP, where this parameter indicates the extra benefit seeing in a given ssGBLUP scenario over the scenario using BLUP expressed as a proportion of the benefit that GBLUP has over BLUP (as GBLUP can be seeing as a ssGBLUP

scenario with all the candidates being genotyped, so representing the upper limit that ssGBLUP can improve the genetic prediction/response).

As expected, the performance of ssGBLUP improved as the proportion of genotyped candidates increased. In general, the benefit of ssGBLUP was almost linear with the proportion of genotyped candidates. Genotyping an X proportion of candidates, yielded an approximated X proportion of benefit observed in GBLUP over BLUP, being TOP the best strategy and RANDOM the worst. These results are different from those shown in other studies (Granleese et al., 2019; Howard et al., 2018) that reported very high gains with small proportions of candidates. However, when analysing the reliability of GEBVs, the best strategy was EXTREME, followed by RANDOM and finally TOP. The fact that the TOP yielded the greatest gain but EXTREME being the strategy with the highest reliability of the GEBVs seems a bit contradictory, as our simulations assumed discrete generations so the genotyping strategy with the highest reliability should also has the highest genetic gain. To further investigate this issue, we estimated separately the GEBV reliability for the genotyped and non-genotyped candidates. The trend in the group of genotyped candidates was the same as when combining all candidates (i.e. EXTREME > RANDOM > TOP) but for the group of non-genotyped candidates the best strategy was RANDOM, followed by TOP and EXTREME. Then, we evaluated the group of selected candidates in each strategy and observed that, the proportion of genotyped candidates which were selected was highest with the TOP strategy (in both selected males and females).

The most relevant conclusions of this study were: (i) the benefit of ssGBLUP was similar across generations; (ii) the benefit of ssGBLUP was almost linear with the proportion of genotyped candidate; (iii) the ranking of the genotyping strategy in term of genetic gain was TOP \geq

EXTREME > RANDOM (the performance of EXTREME was close to TOP with high proportion of genotyped candidates and to RANDOM with low proportion), but in term of reliability EXTREME \geq RANDOM > TOP; and (iv) the proportion of selected candidates being genotyped TOP > EXTREME > RANDOM. Hence, special attention needs to be taken when using reliability as an indicator of the performance of ssGBLUP, since it cannot be considered as a sufficient and absolute criterion to determine which scheme would maximize the genetic gain over multiple generations.

Objective 3. Study of novel traits for selection which can benefit from genomic evaluation.

Chapter 3 and 4 from the results section describe the studies done to fulfil this objective. They cover the estimation of genetic parameters of cheese-making traits and benefit of indirect selection for these traits using production traits as proxies in the current Assaf sheep breed population. The purpose is to initiate the study towards future potential selection genomic schemes with these traits. Cheese-making traits are becoming increasingly a topic of global interest due to the growing cheese production and consumption, which makes them new targets for sheep milk and therefore, new traits of interest for genetic improvement and candidates for the application of genomic selection. These studies (chapters 3 and 4 from the results section) were the first to report genetic parameter estimates for cheese-making traits of the Assaf breed and the application of indirect selection for the improvement of them using production, composition and functional traits as proxies.

The six cheese-making traits analysed in this thesis were: two traits related to the coagulation time, RCT obtained by measuring the time in minutes from the addition of rennet in the milk to the moment at which the baseline starts to expand and K_{20} is referred to the time in minutes to curd firmness of 20 millimetres, which is the time interval between the start of gel formation and the time at which the width of oscillations becomes 20 millimetres; two traits concerning to the curd firmness after addition of enzyme, A_{30} y A_{60} , both measured in two times, at 30 and 60 minutes, respectively, which correspond to the width of the oscillations at 30 and 60 minutes after the addition of rennet; and finally two traits referring to the production of cheese, ILCY (grams/ml) defined as the individual laboratory cheese yield and ILDCY (grams/ml) which is the total solids obtained in ILCY. In addition, two more traits were calculated, the total daily yield of ILCY (dCY, grams) and the total daily yield of ILDCY (dDCY, grams) (Bittante et al., 2013, 2012). These last two were used for chapter 4 of the results.

The range of the genetic parameters estimated in this study was in correspondence with the ranges described in the literature for both cattle and sheep. One of the most interesting results in Chapter 3 was the proportion of the milk samples that does not clot within 60 minutes. In many studies conducted in other sheep breeds, such as the Italian Sarda breed (Bittante et al., 2012; Pazzola et al., 2018; Puledda et al., 2017), have shown that the coagulation process of sheep milk is faster than cow's (Bencini, 2002; Bittante et al., 2012), but, our study did not confirm this hypothesis. At 30 minutes, approximately half of the samples had not coagulated, and at the end of the process (at 60 minutes) 13% of samples failed to coagulate (hence no data in these traits would be available). Compared with studies described in the literature, this study was more affected by slow and non-coagulating samples, suggesting that the A_{60} trait may be more suitable than the curd

firmness traits at 30 minutes, if selection is to be done on cheese-making traits for this breed. Only 8 samples were related to the syneresis process, indicating that our milk samples are not affected by the syneresis process.

There are several possible reasons why the milk samples did not coagulate: genetic and/or environmental (Bittante et al., 2012; Ikonen et al., 1999). The temperature applied during the cheese-making process has been observed to have an effect in previous studies reported in the literature. Bittante et al. (2012) reviewed different studies and concluded that the cheese-making process using lower temperatures had a larger proportion of non-coagulating samples, although no optimal temperature for this process was found, however, Troch et al. (2017) informed that for temperatures below 20°C, the rennet activity is slight and above 65°C it is totally inactive and the optimum temperature is 40–42°C. Troch et al. (2017) also reviewed other factors affecting the coagulation in cow's milk (enzymatic coagulation, curd firmness, syneresis) and identified the temperature, the pH, calcium, caseins and somatic cells in milk. They also reported percentages of fat and caseins as having a large influence on coagulating properties of the milk. The syneresis and water content in the product are greatly affected by the proportion of fat in relation to the proportion of caseins, since both traits are found in the total solids of the cheese and have an effect directly proportional to the curd yield (Troch et al., 2017; Walstra et al., 2006). The pH of the milk affects the coagulation time and curd firmness, as well as the syneresis rate and the quality of the milk. Overall, lower pH tends to be associated with shorter coagulation time and greater curd firmness. The pH values in our samples ranged between 6.18 and 7.36, which were high compared to other studies. They referenced two optimum pH ranges for faster coagulation and high curd firmness according to two different studies. First, a range is between 6.0 and 6.7 according to

Remeuf et al. (1991) and second an optimal pH would be between 5.1 and 5.5 reported by Croguennec et al. (2008). The low concentration of mineral salts such as calcium, magnesium and inorganic phosphorus can cause a slow or non-coagulating of milk, affecting coagulation time and curd firmness. Different studies have described that, the higher the proportion of calcium, the faster the coagulation. In addition, the colloidal calcium phosphate dissolves at low temperatures, causing the interruption of casein micelles and , therefore, affects the curd firmness (Jensen et al., 2012; Remeuf et al., 1991; Troch et al., 2017). Milk with a high somatic cell count can inhibit the incorporation of proteins into the curd, so low levels of somatic cells are more desirable for a successful coagulation process (Pazzola et al., 2018; Politis and Ng-Kwai-Hang, 1988; Vallas et al., 2010). The somatic cell count in our study was in the range between 11,000 and 27,139,000, although there is no cut-off point where this trait can be stratified and fix that from a point the milk will not coagulate, authors have observed that milk samples with high levels of somatic cells had reduced levels of caseins and also large RCT, leading to a high proportion of samples of slow or non-coagulating and low curd firmness (Panthi et al., 2017).

Although the samples from the milk traits and the cheese-making traits were not collected on the same day, a study estimating the genetic parameters between all traits was carried out. In general, the phenotypic and genetic correlations among these traits were within the ranges described in the literature with protein percentage being the trait with greater relationship with the cheese-making traits, especially the cheese yield (ILCY and ILDCY). The estimated heritability values suggested that the cheese-making traits can be improved through selection, although it should be mentioned that the estimates may be biased due to the limited number of flocks used in this study.

Chapter 4 from the results section evaluate alternative schemes for the improvement of cheese-making traits considered in Chapter 3. For this chapter we could not make any comparison due to the scarce studies on this subject. The selection index used by the ASSAFE association for genetic improvement is the linear combination of two production traits (fat and protein yield) as primary objectives, each with the same assigned weight of 0.5. Here, the impact of the ASSAFE selection index on cheese-making traits was estimated as well as that from other alternative indices using routinely measured milk traits as proxies. These alternative ones aimed to kept the same level of genetic gain for the primary objectives defined by the ASSAFE association while indirectly improving cheese-making traits. An optimal index was proposed to achieve a significant gain in cheese-making traits without compromising the current response of the primary objectives considered in the current ASSAFE selection index.

As the cheese-making traits are limited by sex and population structures are usually represented by medium/large paternal families and small maternal families, the response to the expected selection in sheep was calculated under two different assumptions about the data available for selection. For female candidates it was assumed that they had only one test-day record for all the measured traits, whereas the male candidates were tested assuming that each male had 10 daughters, each with only one test-day record. The best proxies were pH and protein percentage, which agree with the results described in other studies reported in the literature. Protein percentage showed to be more efficient as a proxy for the cheese yield traits, ILCY and ILDCY.

The ASSAFE selection index had the greatest impact on the total curd yield traits, ILCYT and ILDCYT, however, it only had a marginal effect in the milk coagulation properties traits. A new index was searched and proposed (considering the primary objectives in the ASSAFE index but

improving the cheese making traits) by considering different milk production traits included in the index and their weights. We found that a selection index containing the traits PP, FP, PY, FY, pH, Urea and SCC was optimal, since it produces substantial genetic progress in coagulation traits while still achieving the same rate of genetic gain in protein and fat yield as the current ASSAFE index. In general, we can say decreasing the somatic cell count trait and increasing the protein and fat percentage traits would be indicators affecting the milk coagulation, where selecting by these traits should be considered in any index of selection to improve cheese-making traits.

Global discussion

It is undoubtable that genomic prediction is a valuable tool to improve the genetic progress in selection programmes, as it can aid to increase the accuracy of the estimated breeding value, raise the intensity of selection, shorten the generation interval as well as help in the management of the genetic variation (Meuwissen et al., 2001; Doublet et al., 2019; García-Ruiz et al., 2016; Gómez-Romano et al., 2016; Woolliams et al., 2015). These desirable characteristics have driven its implementation in many commercial breeding populations from several livestock species (Christensen et al., 2012; Daetwyler et al., 2010; Hayes et al., 2009a; Hayes et al., 2009c; Knol et al., 2016; Riggio et al., 2014; Tsai et al., 2016; VanRaden et al., 2009; Wolc et al., 2016). However, the pace in which this tool has been implemented varies across the different breeding schemes, with the fastest uptake observed in large and economically important breeds/populations, but a much slower rate seen in small and less economically important breeds/species like the Spanish Churra sheep breed. The main reason for these differences is the genotyping cost needed at the start of the programme to create an optimal initial reference population and throughout the entire breeding scheme to genotype the current candidates. Such economic burden is harder to be

afforded by breeders from smaller and less economically important breeds. In this project, we evaluated the consequences when taking different approaches to reduce the genotyping cost in the population of the Churra sheep breed.

An option to avoid the initial cost of creating the initial reference population could be to use historical individuals already genotyped, which for the case of the Churra sheep breed, the available genotyped animals were 1,667 ewes from a previous QTL mapping study belonging to 16 paternal families (Garcia-Gómez et al., 2013; García-Gómez et al., 2012a) and 235 historical rams with large contribution to the gene pool of the Churra population. The complication of using historical animals is that they, most likely, were genotyped for other (research) purposes so the structure of this set of genotyped animals may not ideal. The size of the reference population is important, but also its relationship with the entire population to assure that the association between markers and phenotypes is the same in both the training and the target population, and also, this such association is known to erode over the generations (Oldenbroek and van der Waaij, 2015). Hence, the fact that the genotyped Churra ewes are from 16 paternal half-sib families would make less representative of the entire population, and thereby, sub-optimal to be used as the initial reference population for this breed.

Our study evaluated the impact of using this reference population and showed a substantial increase in the accuracy of the male GEBVs, but no improvement when predicting the performance of female candidates when compared with that observed with standard BLUP. Whilst cases where genomic prediction improves the GEBVs accuracy differently depending on the sex of the candidate have been reported in the literature (e.g. Bolormaa et al., 2017; Calus et al., 2013; Lourenco et al., 2015), the lack of improvement in predicting the unobserved performance of

genotyped ewes were unexpected, as the scheme was designed for them to have half-sibs relatives in the reference population. Studies reported in the literature have commonly shown that genomic prediction of candidates closely related to the reference population, are significantly more accurate than those observed with pedigree-based genetic evaluation (Clark et al., 2012). Moreover, our simulation study showed that this experimental design should have been adequate enough for genomic prediction yielding better estimates in these female candidates, suggesting that the level of the LD or the current data structure in the Churra population may not be the main reason for the results seen in the real dataset. A potential explanation could be related to the model of evaluation used here (the same one used by ANCHE in their breed evaluation), where multiple test-day records are analysed. The effect of the lactation curve is accounted at the phenotypic level (rather than at the genetic level) and, it could be that, the criterion of comparison used here (i.e. correlation between GEBVs and unobserved phenotypes) is not suitable if the genetic effects substantially change across the lactation for the traits considered traits. Whilst we would not expect so because the correlation between phenotypic performance and prediction was done with corrected phenotypes calculated with the same model of analysis, further studies are still required to define the right criterion of comparison when testing the value of genomic predictions in cross-validation studies and to test whether lactation curve needs to be accounted at the genetic level when using test-day records. So far, this study showed that genomic evaluation can be started in the Churra population using the available genotyped historical animals as the initial reference population to improve prediction on male candidates.

Another approach to reduce cost would be to genotype only a proportion of the candidates using ssGBLUP to include information from all animals in a single joint analysis and obtain the (G)EBVs

for the genotyped and the ungenotyped candidates. Our simulation study assessed the impact of such approach and showed the consequences (in term of benefit from genomic prediction) of reducing the proportion of current candidates to be genotyped, but it also highlighted the optimum strategy for selecting the candidates which need to be genotyped in order to ensure the maximum benefit from ssGBLUP. Our study showed that candidates which should be prioritised to be genotyped are those which are more likely to be selected rather than selected them at random. The identification of those candidates to be genotyped can be done using their own phenotypic information (from the trait itself and/or from correlated ones), but in dairy sheep, this information may not be available as milk traits are sex limited and expressed late in life. The use of parent's average may be used to identify candidates which should be prioritised to be genotyped. However, this approach will identify the best families to be genotyped, but it would not discriminate between candidates of the same family, reducing the optimality of the candidates to be genotyped. Another important fact observed in our simulation study was that the greatest genetic gain is not achieved by the strategy with the highest GEBV reliability. Hence, the consequences from such observation is that the accuracy/reliability of the GEBVs cannot be considered as an absolute and sufficient criterion for determining which scheme would maximise the genetic gain across multiple generations.

Our studies (described in chapters 1 and 2 of the results section) provide relevant suggestions on how to reduce the economic burden of implementing genomic prediction in the Churra population. They highlight that the initial genotyping cost to create the initial reference population can be avoided by using the available set of historically genotyped animals, and still yields substantial improvement in the GEBV accuracy of male candidates. Genotyping only a proportion of the

current candidates may prove a good compromise to lower the running cost of the scheme and still provide improvement on the accuracy of the GEBVs. Given the results from the analysis of Churra dataset, the genotyping of males should be initially prioritised, as the reference population is suitable only to improve the GEBV accuracy of male but not of female candidates. This is a fortunate fact as most the genetic progress in dairy sheep traits arises from the selection of males, so the beneficial impact of genomic prediction in the Churra population would start from the beginning of the scheme. Moreover, the sex-limited characteristic of milk traits means that male candidates would have accurate predictions earlier than when performing standard progeny test, so reducing the generation interval in the breeding scheme. The improvement on the GEBV accuracy of female candidates would be delayed until a more suitable reference population is formed with the newly genotyped candidates.

On the other hand, the improvement of milk production traits is only one of the major challenges of the sheep dairy industry. Since most sheep milk is used for the production of high-quality cheese, the understanding of the genetic and environmental factors influencing the technological properties of sheep milk is of paramount importance as well as the redefinition of selection objectives to include the more economically valued cheese-making traits. Several CMTs have been defined and their genetic characterisation have shown that selection to improve them would be feasible. However, CMTs are difficult and expensive to measure so they tend not to be routinely recorded in most dairy sheep breeding schemes. Our results from chapter 4 (results section) show that improvement in CMTs can be done indirectly using milk production/composition/functional traits as proxies, and it is compatible with the more traditional selection objective of improving the latter traits.

Finally, the profitability of genomic selection requires that the economic gain associated with the genetic progress should exceed the added cost of the scheme. Hence, the inclusion of more economically valued traits such as CMTs and the reduction of genotyping cost would make genomic prediction more viable in Churra breed and other economically less important populations.

Resumen

Abstract

Resumen

La revolución molecular provocada por el surgimiento de la genómica en los últimos años del siglo XX ha dado lugar a considerables avances en el campo de la mejora genética animal. Una gran cantidad de información sobre la variabilidad del genoma de especies animales ha sido un recurso invaluable que ha permitido el establecimiento de nuevas estrategias de selección, incluyendo lo que se conoce como selección/predicción genómica. La eficiencia de la selección genómica está determinada principalmente, entre otros factores, por la estructura y características de la población objetivo donde se aplica el programa de mejora genética, así como las características y tamaño de la denominada población de referencia. El objetivo principal de esta tesis es estudiar las posibilidades de utilizar marcadores moleculares para la implementación de la predicción genómica en el programa de mejora genética de la raza ovina Churra, cuando los recursos son limitados. Para ello, hemos propuesto tres estudios diferentes.

El primer estudio tuvo como objetivo evaluar los beneficios potenciales de diferentes métodos de predicción genómica (GBLUP, DGBLUP y ssGBLUP) al utilizar una población de referencia subóptima, en el programa de selección de la raza Churra gestionado por ANCHE. El beneficio de los métodos de predicción genómica se evaluó en diferentes grupos de candidatos específicos: (i) ovejas candidatas genotipadas con medias hermanas en la población de referencia, (ii) ovejas candidatas no genotipadas que son hijas de carneros genotipados, (iii) ovejas jóvenes candidatas no genotipadas no estrechamente relacionadas con individuos genotipados y (iv) carneros genotipados. La precisión de la predicción se evaluó como la correlación entre los fenotipos corregidos y los diferentes valores genéticos (GEBV) en seis caracteres de producción de leche

para los diferentes grupos de candidatos analizados en este estudio. El uso de la información genómica en la evaluación no produjo un beneficio significativo en la precisión de la GEBV de las ovejas candidatas, en comparación cuando se usó sólo la información de pedigrí. Sin embargo, para el escenario que involucra a los carneros candidatos, la exactitud de los métodos de predicción genómica arrojó una mayor precisión en la estimación de su GEBV. Para comprender mejor estos resultados, se realizaron dos estudios de simulación. La primera simulación tuvo como objetivo evaluar si el chip de SNPs utilizado en la población de Churra tiene suficiente información para mejorar la predicción genética. Debido a que este enfoque simula datos para los individuos genotipados, solo se evaluaron las ovejas candidatas genotipadas. El segundo estudio de simulación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la estructura de los datos sobre el beneficio de la selección genómica en la oveja Churra. En esta simulación, se evaluaron todos los grupos de candidatos considerados en datos reales. Los resultados de los dos estudios de simulación sugirieron que el uso de la información molecular puede beneficiar las predicciones en la población de la oveja Churra española, produciendo mejores predicciones para candidatos masculinos y femeninos genotipados que las obtenidas utilizando el BLUP.

El segundo estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos de las estrategias de genotipado y la proporción de candidatos a ser genotipados en la ganancia genética cuando se usa el ssGBLUP. El método ssGBLUP permite incluir información de animales genotipados y no genotipados en un único análisis, lo que generalmente conduce a mejores predicciones en animales genotipados. Este método permite la opción de no genotipar todo el grupo de los animales candidatos y, por lo tanto, reducir el costo del programa de selección. Sin embargo, esto plantea la necesidad de determinar el conjunto óptimo de candidatos a genotipar para asegurar que se continúe obteniendo un

beneficio significativo con el ssGBLUP. Los escenarios comparados fueron: (i) tres estrategias de genotipado de los candidatos a genotipar (RANDOM: los candidatos a genotipar se eligieron al azar; TOP: se genotiparon los mejores candidatos en función de su fenotipo, supuestamente conocidos en el momento de la decisión de genotipar y, EXTREME: los candidatos genotipados fueron aquellos con el mejor y el peor fenotipo) y (ii) seis proporciones de candidatos genotipados. El criterio de comparación fue la ganancia acumulada y la fiabilidad del GEBV. Los resultados se basaron en un estudio de simulación. Los resultados mostraron que la ganancia genética más alta en varias generaciones de selección se logra con TOP, seguido de EXTREME y RANDOM. La ventaja de TOP sobre RANDOM varía entre el 38 y el 108% de la respuesta adicional a la lograda por el BLUP estándar en todas las proporciones probadas de candidatos a ser genotipados. El rendimiento de la estrategia EXTREME fue cercano al observado con la estrategia RANDOM cuando la proporción de candidatos genotipados fue baja, pero mejoró a medida que aumentó la proporción. Sin embargo, al comparar las estrategias respecto a la fiabilidad de sus GEBVs, EXTREME tuvo los valores más altos seguido de RANDOM, siendo TOP la estrategia que produjo la menor fiabilidad. El ranking de las estrategias de genotipado mostró la misma tendencia al considerar solo el grupo de candidatos genotipados.

El tercer estudio tuvo como objetivo evaluar caracteres novedosos que pueden beneficiarse del proceso de la selección genómica. Para este propósito, se analizaron los caracteres de coagulación y producción de queso (CMT) en una población comercial de ovejas Assaf. El estudio estimó los parámetros genéticos de estos caracteres y su correlación con los caracteres de producción, composición y funcional de la leche. Además, se llevó a cabo un estudio sobre la respuesta indirecta a la selección en los CMT al utilizar como proxys los caracteres de producción,

composición y funcionales de la leche medidos de forma rutinaria en el programa de selección de la raza Assaf. De las muestras de leche incluidas en el estudio, el 13% no coaguló, mientras que aproximadamente el 37% mostró coagulación lenta. Las heredabilidades estimadas para los CMT fueron moderadas. Basado en las correlaciones fenotípicas estimadas, podemos decir que un mayor número de células somáticas está relacionado con un retraso en la gelificación de la leche y una menor firmeza de la cuajada. Muchas de las correlaciones genéticas estimadas mostraron grandes errores estándar. En general, este estudio proporcionó el primer informe sobre la estimación de los parámetros genéticos de los caracteres relacionados a la elaboración de queso en la población de ovejas Assaf. Finalmente, los resultados de la segunda parte del tercer estudio se basaron en la respuesta esperada de los CMT (no medidos rutinariamente) cuando los caracteres de la leche (medidos rutinariamente) se utilizaron como proxys y se tuvieron en cuenta en los criterios de selección. Se consideraron las diferencias en la información disponible a la hora de seleccionar candidatos masculinos o femeninos y, además, se evaluó el impacto del índice de selección actual de la oveja Assaf y se sugirió un nuevo índice. En general, los resultados mostraron que un índice de selección que utiliza los caracteres de leche podría optimizarse para mejorar los CMT. El nuevo índice propuesto producirá un progreso genético sustancial en las propiedades de coagulación de la leche y los caracteres individuales del rendimiento quesero, y, además, continuará logrando la misma tasa de ganancia genética en los caracteres de leche cuando se utilice el índice Assaf actual.

En conclusión, la rentabilidad de la selección genómica requiere que el beneficio económico asociado al progreso genético exceda el coste añadido del esquema de selección. Por lo tanto, la inclusión de caracteres más valorados económicamente, como las CMT, y la reducción del costo

del genotipado harían más viable la predicción genómica en la raza Churra y otras poblaciones económicamente menos importantes.

Abstract

The molecular revolution brought by the emergence of genomics in the last years of the 20th century has led to considerable developments in the field of animal breeding. A large amount of information on the variability of the genome of animal species has been an invaluable resource that has allowed the establishment of new selection strategies, including what is known as genomic selection/prediction. The efficiency of the genomic selection is mostly determined, among other factors, by the structure, characteristics and size of the population where the breeding program is applied, the genotyped animals, as well as the features of the so-called reference population. The main objective of this thesis is to study the possibilities of using molecular markers for the implementation of genomic prediction in the genetic improvement program of the Churra sheep breed managed by ANCHE, when the resources are limited. For this purpose, we have proposed three different studies.

The first study aimed to evaluate the potential benefits of different genomic prediction methods (GBLUP, DGBLUP and ssGBLUP) when using a suboptimal reference population, in the selection program of the Churra breed managed by ANCHE. The benefit of genomic prediction methods were assessed in different targeted candidate groups: (i) genotyped ewe candidates with half-sib sisters in the training population, (ii) non-genotyped ewe candidates that are daughters of genotyped rams, (iii) the youngest non-genotyped ewe candidates at the bottom of the pedigree not closely related to genotyped individuals and (iv) genotyped rams. The accuracy of the prediction was assessed as the correlation between the corrected phenotypes and the different genetic values (GEBV) on six milk production traits for the different candidate groups analysed in

this study. The use of genomic information in the evaluation did not yield significant benefit in the precision of the GEBV of female candidates, compared to using only pedigree information. However, for the scenario involving male candidates the accuracies of the genomic prediction methods yielded a higher precision in the estimation of their GEBV. To better understand these results, two simulation studies were performed. The first simulation aimed at assessing whether the SNP chip used in the Churra population has enough information to improve genetic prediction. Because this approach simulates data for genotyped individuals, only genotyped ewe candidates were assessed. The second simulation study aimed at evaluating the effect of data structure on the benefit of genomic selection on the Churra sheep. In this simulation, all candidate groups considered in real data were evaluated. The results in the two simulation studies suggested that the use of molecular information can benefit the predictions in the Spanish Churra population, yielding better predictions for genotyped male and female candidates than those obtained using the standard BLUP using pedigree information.

The second study aimed to evaluate the effects of genotyping strategies and the proportion of genotyped candidates on genetic gain when using the ssGBLUP. The ssGBLUP method allows information from genotyped and non-genotyped animals to be included in a single analysis, which generally leads to better predictions in genotyped animals. This method allows the option of not genotyping the whole group of candidate animals and, thereby, reducing the cost of the selection program. However, this raises the need to determine the optimal set of candidates to be genotyped to ensure that significant benefit continues to be gained from ssGBLUP. The scenarios compared were: (i) three genotyping strategies on the candidates to be genotyped (RANDOM: candidates to be genotyped were chosen at random; TOP: the best candidates based on their phenotype were

genotyped, assumed to be known at the time of the genotyping decision; and, EXTREME: genotyped candidates were those with the best and the worst phenotype) and (ii) six proportions of genotyped candidates. The comparison criterion was the cumulative gain and reliability of the GEBV. The results were based on a simulation study. The results showed that the highest genetic gain across several generations of selection is achieved with TOP, followed by EXTREME and RANDOM. The advantage of TOP over RANDOM ranges from 38-108% of the extra response to that achieved by the standard BLUP, across the whole range of tested proportions of the candidates to be genotyped. The performance of EXTREME was close to that observed with RANDOM when the proportion of genotyped candidates was low, but improved as the proportion increased. However, when comparing the strategies on the reliability of their GEBV, EXTREME had the highest values followed by RANDOM, with TOP being the strategy that produced the lowest reliability. The ranking of genotyping strategies showed the same trend when considering only the group of genotyped candidates.

The third study aimed at evaluating novel traits that can benefit from the genomic selection process. For this purpose, cheese making traits (CMTs) were analysed in a commercial population of Assaf dairy sheep. The study estimated genetic parameters of these traits and their correlation with milk production and milk quality traits. In addition, a study was carried out on the indirect response to selection in coagulation and cheese yield traits when using as proxies milk production, milk composition and functional traits routinely measured in the Spanish Assaf selection programme. Of the milk samples included in the study, 13% did not coagulate, whereas approximately 37% showed slow coagulation. The estimated heritabilities for the milk coagulation and cheese yield traits were moderate. Based on the estimated phenotypic correlations, our study

supports that a higher number of somatic cells is related to a delay in milk gelification and a lower curd firmness. Many of the estimated genetic correlations showed large standard errors Overall, this study provided the first report on phenotypic and genetic parameters of cheese traits in the Spanish Assaf sheep population. Finally, the results of the second part of the third study are based on the expected response of the cheese traits (not routinely measured) when the milk traits (routinely measured) were used as proxies and taken into account in the selection criteria. Differences in the information available when selecting male or female candidates were considered, and, also, the impact of the current selection index of Assaf Spanish sheep was evaluated, and a new index was suggested. Overall, the results showed that a selection index using milk traits could be optimized to improve cheese traits. The proposed new index will produce substantial genetic progress in milk coagulation properties and individual cheese yield traits and will continue to achieve the same rate of genetic gain in milk yield traits when the current Assaf index is used.

In conclusion, the profitability of genomic selection requires that the economic gain associated with the genetic progress should exceed the added cost of the scheme. Hence, the inclusion of more economically valued traits such as CMTs and the reduction of genotyping cost would make genomic prediction more viable in the Churra breed and other economically less important populations.

Conclusiones

Conclusions

Conclusiones

Primera,

En el estudio de evaluación de los beneficios potenciales del uso de la selección genómica en el programa de selección de leche en de la raza Churra, podemos concluir que, dada la composición y el tamaño de la población de referencia utilizada, solo hemos identificado un claro beneficio en la selección de machos que fueron genotipados. En este caso se produce una mejora en la predicción del valor genómico que oscila entre un 15% y un 150%, en función del carácter analizado. Las causas principales de estos resultados han sido atribuidas a la composición de la población de referencia utilizada y al modelo de predicción de los fenotipos.

Segunda,

Cuando sólo se va a genotipar una proporción de animales candidatos actuales, la mejor estrategia es dar prioridad al genotipado de los candidatos con más probabilidades de ser seleccionados para asegurar que la ganancia genética se maximice con el ssGBLUP. Nuestros resultados muestran que la eficiencia del ssGBLUP no mejora tan rápidamente como se ha informado en otros estudios cuando la proporción de candidatos a ser genotipados aumenta. También hemos observado que la mayor ganancia genética no se logra con la estrategia de mayor fiabilidad del GEBV. En consecuencia, la fiabilidad de las estimaciones no puede considerarse un criterio absoluto y suficiente para determinar qué esquema maximizaría la ganancia genética a lo largo de varias generaciones.

Tercera,

En el estudio de las propiedades de coagulación de la leche y el rendimiento quesero en la raza española Assaf, se calcularon las estimaciones de las componentes de varianza y se demostró que sus heredabilidades eran moderadas, pero suficientes para considerar estrategias de selección eficientes para estos caracteres. Se observó que esta raza es de coagulación lenta comparada con otras razas y que la prueba de coagulación debe durar 60 minutos para obtener una información fiable sobre estos caracteres. Además, se usaron los caracteres de leche (medidos habitualmente) como proxys, y un índice de selección se optimizó para mejorar los caracteres de coagulación y producción de queso (no medidos habitualmente) y lograr al mismo tiempo una tasa de respuesta similar a la obtenida con los caracteres de leche incluidos como objetivos en el actual índice de selección del programa de mejora de la raza Assaf.

Conclusions

First,

In the study to evaluate the potential benefits of the use of genomic prediction in the selection program in the Churra dairy sheep breed, given the composition and size of the reference population used, only genotyped male candidates benefited from the use of marker information in the genetic evaluation. The improvement in the GEBV accuracy ranged from 15% to 150%, across the studied traits. The main causes of these results are related to the composition of the reference population used and the phenotype prediction model.

Second,

When only a proportion of the current candidate animals are to be genotyped, the best strategy is to prioritise the genotyping of those candidates that are most likely to be selected to ensure that the genetic gain is maximized with ssGBLUP. Our results show that the efficiency of ssGBLUP does not improve as quickly as reported in other studies when the proportion of genotyped candidates increases. We have also observed that the higher genetic gain is not achieved with the strategy with the highest GEBV reliability. As a consequence, the reliability of the estimates cannot be considered as an absolute and sufficient criterion to determine which scheme would maximize genetic gain over multiple generations.

Third,

In the study of the milk coagulation properties and cheese yield in the Spanish Assaf breed, variance component estimates were calculated and showed that their heritabilities were moderate,

but sufficient to consider efficient selection strategies for these traits. It was observed that the milk of this breed is slow to coagulate compared to the milk of other breeds, and that the coagulation test must be 60 minutes to obtain reliable information on these traits. Furthermore, milk traits (routinely measured) were used as proxies, and a selection index was optimised to improve (the not routinely measured) CMTs while still achieving similar rate of response on the milk traits included as objectives in the current selection index of the Spanish Assaf breeding programme.

Referencias

Referencias

- Aguilar, I., Misztal, I., Johnson, D.L., Legarra, A., Tsuruta, S., Lawlor, T.J., 2010. Hot topic: a unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score. *J. Dairy Sci.* 93, 743–52. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2730>
- ANCHE, 2019a. Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino de Raza Churra. <http://www.anche.org>.
- ANCHE, 2019b. Catálogo de leche. <http://www.anche.org/pdf/catalogodeleche2019.pdf>.
- Arranz, J.J., 2017. Las oportunidades que ofrece la genómica y los retos que plantea en la mejora productiva del ovino lechero: mitos y realidades., in: *Seminario Internacional de Genómica En Ovino*.
- ASSAFE, 2019. Asociación nacional de criadores de ganado ovino de la raza assaf. <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/> (accessed 3.14.19).
- ASSAFE, 2011. Assaf Genetic Improvement Program. MAPAMA. [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/Programa mejora ASSAF. Definitivo_tcm30-114480.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/Programa%20mejora%20ASSAF.%20Definitivo_tcm30-114480.pdf) (accessed 6.13.19).
- Atlija, M., Arranz, J.-J., Martínez-Valladares, M., Gutiérrez-Gil, B., 2016a. Detection and replication of QTL underlying resistance to gastrointestinal nematodes in adult sheep using the ovine 50K SNP array. *Genet. Sel. Evol.* 48, 4. <https://doi.org/10.1186/s12711-016-0182-4>
- Atlija, M., Gutiérrez-Gil, B., Arranz, J.-J., Semmer, J., Stear, M.J., Buitkamp, J., 2015. Major Histocompatibility Complex class IIB polymorphism in an ancient Spanish breed. *Immunogenetics* 67, 531–537. <https://doi.org/10.1007/s00251-015-0856-z>
- Atlija, M., Prada, J.M., Gutiérrez-Gil, B., Rojo-Vázquez, F.A., Stear, M.J., Arranz, J.J., Martínez-Valladares, M., 2016b. Implementation of an extended ZINB model in the study of low levels of natural gastrointestinal nematode infections in adult sheep. *BMC Vet. Res.* 12, 97. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0723-7>
- Auvray, B., McEwan, J.C., Newman, S.A.N., Lee, M., Dodds, K.G., 2014. Genomic prediction of breeding values in the New Zealand sheep industry using a 50K SNP chip. *J. Anim. Sci.* 92, 4375–4389. <https://doi.org/10.2527/jas2014-7801>
- Baloche, G., Legarra, A., Sallé, G., Larroque, H., Astruc, J.-M., Robert-Granié, C., Barillet, F., 2014. Assessment of accuracy of genomic prediction for French Lacaune dairy sheep. *J. Dairy Sci.* 97, 1107–1116. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7135>

- Banos, G., Wiggans, G.R., Powell, R.L., 2001. Impact of Paternity Errors in Cow Identification on Genetic Evaluations and International Comparisons. *J. Dairy Sci.* 84, 2523–2529. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74703-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74703-0)
- Barton, N.H., Etheridge, A.M., Véber, A., 2017. The infinitesimal model: Definition, derivation, and implications. *Theor. Popul. Biol.* 118, 50–73. <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2017.06.001>
- Ben-Ari, G., Lavi, U., 2012. Marker-assisted selection in plant breeding, in: *Plant Biotechnology and Agriculture*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381466-1.00011-0>
- Ben-Israel, A., Greville, T.N.E., 2003. *Generalized Inverses: Theory and Applications*, CMS Books in Mathematics. Springer, New York, NY. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/b97366>
- Bencini, R., 2002. Factors affecting the clotting properties of sheep milk. *J. Sci. Food Agric.* 82, 705–719. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1101>
- Bichard, M., 1977. Economic efficiency of pig breeding schemes: A breeding company view. *Livest. Prod. Sci.* 4, 245–254. [https://doi.org/10.1016/0301-6226\(77\)90042-2](https://doi.org/10.1016/0301-6226(77)90042-2)
- Bittante, G., Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., 2013. Genetic parameters of different measures of cheese yield and milk nutrient recovery from an individual model cheese-manufacturing process. *J. Dairy Sci.* <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6517>
- Bittante, G., Cipolat-Gotet, C., Pazzola, M., Dettori, M.L., Vacca, G.M., Cecchinato, A., 2017. Genetic analysis of coagulation properties, curd firming modeling, milk yield, composition, and acidity in Sarda dairy sheep. *J. Dairy Sci.* 100, 385–394. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11212>
- Bittante, G., Penasa, M., Cecchinato, A., 2012. Invited review: Genetics and modeling of milk coagulation properties. *J. Dairy Sci.* 95, 6843–6870. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5507>
- Blasco, A., Toro, M.A., 2014. A short critical history of the application of genomics to animal breeding. *Livest. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.03.015>
- Boichard, D., Guillaume, F., Baur, A., Croiseau, P., Rossignol, M.-N., Boscher, M.Y., DRUET, T., GENESTOUT, L., Eggen, A., JOURNAUX, L., Ducrocq, V., Fritz, S., 2010. Genomic selection in French dairy cattle. 9th World Congr. Genet. Appl. to Livest. Prod. Leipzig, INC.
- Bolormaa, S., Brown, D.J., Swan, A.A., van der Werf, J.H.J., Hayes, B.J., Daetwyler, H.D., 2017. Genomic prediction of reproduction traits for Merino sheep. *Anim. Genet.* 48, 338–348. <https://doi.org/10.1111/age.12541>
- Bresolin, T., Rosa, G.J. de M., Valente, B.D., Espigolan, R., Gordo, D.G.M., Braz, C.U., Fernandes Júnior, G.A., Magalhães, A.F.B., Garcia, D.A., Frezarim, G.B., Leão, G.F.C., Carvalheiro, R., Baldi, F., Nunes de Oliveira, H., Galvão de Albuquerque, L., 2019. Effect of

quality control, density and allele frequency of markers on the accuracy of genomic prediction for complex traits in Nellore cattle. *Anim. Prod. Sci.* 59, 48–54.

Bynum, D.G., Olson, N.F., 1982. Standardization of a Device to Measure Firmness of Curd During Clotting of Milk. *J. Dairy Sci.* 65, 1321–1324. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82347-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82347-3)

Calus, M.P.L., de Haas, Y., Veerkamp, R.F., 2013. Combining cow and bull reference populations to increase accuracy of genomic prediction and genome-wide association studies. *J. Dairy Sci.* 96, 6703–6715. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6013>

Calus, M.P.L., Veerkamp, R.F., 2011. Accuracy of multi-trait genomic selection using different methods. *Genet. Sel. Evol.* <https://doi.org/10.1186/1297-9686-43-26>

Cameron, N.D., 1997. Selection indices and prediction of genetic merit in animal breeding, in: *Selection Indices and Prediction of Genetic Merit in Animal Breeding*. Wallingford; New York, CAB international.

Carillier, C., Larroque, H., Robert-Granié, C., 2014. Comparison of joint versus purebred genomic evaluation in the French multi-breed dairy goat population. *Genet. Sel. Evol.* <https://doi.org/10.1186/s12711-014-0067-3>

Chitneedi, P.K., Arranz, J.J., Suarez-Vega, A., García-Gámez, E., Gutiérrez-Gil, B., 2017. Estimations of linkage disequilibrium, effective population size and ROH-based inbreeding coefficients in Spanish Churra sheep using imputed high-density SNP genotypes. *Anim. Genet.* 48, 436–446. <https://doi.org/10.1111/age.12564>

Chitneedi, P.K., Suárez-Vega, A., Martínez-Valladares, M., Arranz, J.J., Gutiérrez-Gil, B., 2018. Exploring the mechanisms of resistance to *Teladorsagia circumcincta* infection in sheep through transcriptome analysis of abomasal mucosa and abomasal lymph nodes. *Vet. Res.* <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0534-x>

Christensen, O.F., Lund, M.S., 2010. Genomic prediction when some animals are not genotyped. *Genet. Sel. Evol.* 42, 2. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-42-2>

Christensen, O.F., Madsen, P., Nielsen, B., Ostersen, T., Su, G., 2012. Single-step methods for genomic evaluation in pigs. *Animal* 6, 1565–1571. <https://doi.org/10.1017/S1751731112000742>

Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., De Marchi, M., Penasa, M., Bittante, G., 2012. Comparison between mechanical and near-infrared methods for assessing coagulation properties of bovine milk. *J. Dairy Sci.*

Clark, S.A., Hickey, J.M., Daetwyler, H.D., van der Werf, J.H.J., 2012. The importance of information on relatives for the prediction of genomic breeding values and the implications for the

makeup of reference data sets in livestock breeding schemes. *Genet. Sel. Evol.* 44, 4. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-44-4>

Confelac, 2019. Confederación de Asociaciones de Criadores de Ovino de Razas Latxa y Carranzana [WWW Document]. URL <http://www.confelac.com/> (accessed 6.5.19).

Croguennec, T., Jeantet, R., Brulé, G., 2008. *Fondements physicochimiques de la technologie laitière*. Lavoisier TEC & DOC, Paris.

Daetwyler, H.D., Bolormaa, S., Brown, D., Van der Werf, J.H.J., Hayes, B.J., 2013a. A genomic prediction cross-validation approach combining ewe repeated phenotypes and ram daughter trait deviations, in: *Proc Assoc Advmt Anim Breed Genet.* p. 363.

Daetwyler, H.D., Calus, M.P.L., Pong-Wong, R., de los Campos, G., Hickey, J.M., 2013b. Genomic prediction in animals and plants: Simulation of data, validation, reporting, and benchmarking. *Genetics*. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.147983>

Daetwyler, H.D., Hickey, J.M., Henshall, J.M., Dominik, S., Gredler, B., van der Werf, J.H.J., Hayes, B.J., 2010a. Accuracy of estimated genomic breeding values for wool and meat traits in a multi-breed sheep population. *Anim. Prod. Sci.* 50, 1004. <https://doi.org/10.1071/AN10096>

Daetwyler, H.D., Kemper, K.E., van der Werf, J.H.J., Hayes, B.J., 2012a. Components of the accuracy of genomic prediction in a multi-breed sheep population1. *J. Anim. Sci.* 90, 3375–3384. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4557>

Daetwyler, H.D., Pong-Wong, R., Villanueva, B., Woolliams, J.A., 2010b. The impact of genetic architecture on genome-wide evaluation methods. *Genetics* 185, 1021–1031. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.116855>

Daetwyler, H.D., Swan, A.A., van der Werf, J.H., Hayes, B.J., 2012b. Accuracy of pedigree and genomic predictions of carcass and novel meat quality traits in multi-breed sheep data assessed by cross-validation. *Genet. Sel. Evol.* 44, 33. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-44-33>

Daetwyler, H.D., Villanueva, B., Woolliams, J.A., 2008. Accuracy of predicting the genetic risk of disease using a genome-wide approach. *PLoS One* 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003395>

De la Fuente, L.F., Gabiña, D., Carolino, N., Ugarte, E., 2006. The Awassi and Assaf breeds in Spain and Portugal. 57th Annu. Meet. Eur. Assoc. Anim. Prod. Antalya, Turkey, 17-20 Sept. 2006. Pap. S14.2. Wageningen Acad. Publ. Netherlands. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-580-2>

de los Campos, G., Hickey, J.M., Pong-Wong, R., Daetwyler, H.D., Calus, M.P.L., 2013. Whole-genome regression and prediction methods applied to plant and animal breeding. *Genetics*. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.143313>

Dodds, K.G., Auvray, B., Newman, S.A.N., McEwan, J.C., 2014. Genomic breed prediction in New Zealand sheep. *BMC Genet.* <https://doi.org/10.1186/s12863-014-0092-9>

Doublet, A.-C., Croiseau, P., Fritz, S., Michenet, A., Hozé, C., Danchin-Burge, C., Laloë, D., Restoux, G., 2019. The impact of genomic selection on genetic diversity and genetic gain in three French dairy cattle breeds. *Genet. Sel. Evol.* 51, 52. <https://doi.org/10.1186/s12711-019-0495-1>

Duchemin, S.I., Colombani, C., Legarra, A., Baloche, G., Larroque, H., Astruc, J.-M., Barillet, F., Robert-Granié, C., Manfredi, E., 2012. Genomic selection in the French Lacaune dairy sheep breed. *J. Dairy Sci.* 95, 2723–2733. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4980>

EUROSTAT, 2019. Eurostat Database. European Commission <https://ec.europa.eu/eurostat/home?> (accessed 5.1.19).

Fernández, M.R., 2017. Oportunidades Que Ofrece La Genómica Para Acelerar La Introducción De Nuevos Caracteres De Selección En Ovino Lechero, in: Seminario Internacional de Genómica En Ovino. OVIESpaña.

Fernando, R., Grossman, M., 1989. Marker assisted selection using best linear unbiased prediction. *Genet. Sel. Evol.* 21, 467. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-21-4-467>

Fisher, R.A., 1918. The Correlation between Relatives on the Supposition of Mendelian Inheritance. *Trans. R. Soc. Edinburgh* 52, 399–433. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0080456800012163>

Galton, F., 1869. Hereditary genius: An inquiry into its laws and consequences., Hereditary genius: An inquiry into its laws and consequences. Macmillan and Co, London. <https://doi.org/10.1037/13474-000>

García-Gámez, E., Gutiérrez-Gil, B., Sahana, G., Sánchez, J.P., Bayón, Y., Arranz, J.J., 2012a. GWA Analysis for Milk Production Traits in Dairy Sheep and Genetic Support for a QTN Influencing Milk Protein Percentage in the LALBA Gene. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047782>

García-Gámez, E., Gutiérrez-Gil, B., Suarez-Vega, A., de la Fuente, L.F., Arranz, J.J., 2013. Identification of quantitative trait loci underlying milk traits in Spanish dairy sheep using linkage plus combined linkage disequilibrium and linkage analysis approaches. *J. Dairy Sci.* 96, 6059–69. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6824>

García-Gámez, E., Sahana, G., Gutiérrez-Gil, B., Arranz, J.J., 2012b. Linkage disequilibrium and inbreeding estimation in Spanish Churra sheep. *BMC Genet.* 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-13-43>

García-Ruiz, A., Cole, J.B., VanRaden, P.M., Wiggans, G.R., Ruiz-López, F.J., Van Tassell, C.P., 2016. Changes in genetic selection differentials and generation intervals in US Holstein dairy cattle as a result of genomic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E3995–E4004. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519061113>

Garrick, D.J., 2007. Equivalent mixed model equations for genomic selection. *J. Anim. Sci.* 85, 376–376.

Garrick, D.J., Taylor, J.F., Fernando, R.L., 2009. Deregressing estimated breeding values and weighting information for genomic regression analyses. *Genet. Sel. Evol.* 41, 55. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-41-55>

Gianola, D., 2013. Priors in whole-genome regression: The Bayesian alphabet returns. *Genetics*. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.151753>

Gianola D., de los Campos G., Hill W. G., Manfredi E., Fernando R. 2009. Additive genetic variability and the Bayesian alphabet. *Genetics* 183: 347–363.

Gianola, D., de los Campos, G., Gonzalez-Recio, O., Long, N., Okut, H., Rosa, G.J.M., Weigel, K.A., Wu, X.-L., 2010. Statistical learning methods for genome-based analysis of quantitative traits. *Proc. World Genet. Congr. Appl. to Livest. Prod. Leipzig, Ger.*

Gilmour, A.R., Gogel, B.J., Cullis, B.R., Welham, S.J., Thompson, R., 2014. ASReml User Guide Release 4.1 Functional Specification. VSN Int. Ltd, Hemel Hempstead, HP1 1ES, UK www.vsn.co.uk.

Goddard, M., 2009. Genomic selection: prediction of accuracy and maximisation of long term response. *Genetica* 136, 245–257. <https://doi.org/10.1007/s10709-008-9308-0>

Goddard, M.E., 1992. A mixed model for analyses of data on multiple genetic markers. *Theor. Appl. Genet.* 83, 878–886. <https://doi.org/10.1007/BF00226711>

Goddard, M.E., Hayes, B.J., 2007. Genomic selection. *J. Anim. Breed. Genet.* 124, 323–330. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.2007.00702.x>

Goddard, M.E., Hayes, B.J., Meuwissen, T.H.E., 2011. Using the genomic relationship matrix to predict the accuracy of genomic selection. *J. Anim. Breed. Genet.* 128, 409–421. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.2011.00964.x>

Goldberger, A.S., 1962. Best Linear Unbiased Prediction in the Generalized Linear Regression Model. *J. Am. Stat. Assoc.* 57, 369–375. <https://doi.org/10.1080/01621459.1962.10480665>

Gómez-Romano, F., Villanueva, B., Fernández, J., Woolliams, J.A., Pong-Wong, R., 2016. The use of genomic coancestry matrices in the optimisation of contributions to maintain genetic

diversity at specific regions of the genome. *Genet. Sel. Evol.* 48, 2. <https://doi.org/10.1186/s12711-015-0172-y>

González-Recio, O., Gianola, D., Long, N., Weigel, K.A., Rosa, G.J.M., Avendaño, S., 2008. Nonparametric methods for incorporating genomic information into genetic evaluations: An application to mortality in broilers. *Genetics* 178, 2305–2313. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.084293>

Gonzalo, C., Othmane, M.H., Fuertes, J.Á., De La Fuente, L.F., Primitivo, F.S., 2003. Losses of precision associated with simplified designs of milk recording for dairy ewes. *J. Dairy Res.* <https://doi.org/10.1017/S0022029903006447>

Granleese, T., Clark, S.A., van der Werf, J.H.J., 2019. Genotyping strategies of selection candidates in livestock breeding programmes. *J. Anim. Breed. Genet.* <https://doi.org/10.1111/jbg.12381>

Guo, G., Lund, M.S., Zhang, Y., Su, G., 2010. Comparison between genomic predictions using daughter yield deviation and conventional estimated breeding value as response variables. *J. Anim. Breed. Genet.* 127, 423–432. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.2010.00878.x>

Guo, G., Zhao, F., Wang, Y., Zhang, Y., Du, L., Su, G., 2014. Comparison of single-trait and multiple-trait genomic prediction models. *BMC Genet.* <https://doi.org/10.1186/1471-2156-15-30>

Gutiérrez-Gil, B., Alvarez, L., de la Fuente, L.F., Sanchez, J.P., San Primitivo, F., Arranz, J.J., 2011. A genome scan for quantitative trait loci affecting body conformation traits in Spanish Churra dairy sheep. *J. Dairy Sci.* <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4027>

Gutiérrez-Gil, B., El-Zarei, M.F., Alvarez, L., Bayón, Y., De La Fuente, L.F., San Primitivo, F., Arranz, J.J., 2009. Quantitative trait loci underlying milk production traits in sheep. *Anim. Genet.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01856.x>

Gutiérrez-Gil, B., El-Zarei, M.F., Bayón, Y., Álvarez, L., de la Fuente, L.F., Primitivo, F.S., Arranz, J.J., 2007. Short Communication: Detection of Quantitative Trait Loci Influencing Somatic Cell Score in Spanish Churra Sheep. *J. Dairy Sci.* [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72643-7](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72643-7)

Gutiérrez-Gil, B., Esteban-Blanco, C., Suarez-Vega, A., Arranz, J.J., 2018. Detection of quantitative trait loci and putative causal variants affecting somatic cell score in dairy sheep by using a 50K SNP-Chip and whole genome sequencing. *J. Dairy Sci.* <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14736>

Habier, D., Fernando, R.L., Dekkers, J.C.M., 2007. The impact of genetic relationship information on genome-assisted breeding values. *Genetics* 177, 2389–2397. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.081190>

- Habier, D., Fernando, R.L., Garrick, D.J., 2013. Genomic BLUP decoded: A look into the black box of genomic prediction. *Genetics* 194, 597–607. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.152207>
- Habier, D., Fernando, R.L., Kizilkaya, K., Garrick, D.J., 2011. Extension of the bayesian alphabet for genomic selection. *BMC Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-186>
- Habier, D., Tetens, J., Seefried, F.R.F.-R., Lichtner, P., Thaller, G., 2010. The impact of genetic relationship information on genomic breeding values in German Holstein cattle. *Genet. Sel. Evol.* 42, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-42-5>
- Hayes, B.J., Bowman, P.J., Chamberlain, A.C., Verbyla, K., Goddard, M.E., 2009a. Accuracy of genomic breeding values in multi-breed dairy cattle populations. *Genet. Sel. Evol.* 41, 51. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-41-51>
- Hayes, B.J., Bowman, P.J., Chamberlain, A.J., Goddard, M.E., 2009b. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *J. Dairy Sci.* 92, 433–443. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1646>
- Hayes, B.J., Goddard, M.E., 2008. Technical note: Prediction of breeding values using marker-derived relationship matrices. *J. Anim. Sci.* 86, 2089–2092. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0733>
- Hayes, B.J., Lewin, H.A., Goddard, M.E., 2013. The future of livestock breeding: Genomic selection for efficiency, reduced emissions intensity, and adaptation. *Trends Genet.* <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.11.009>
- Hayes, B.J., Visscher, P.M., Goddard, M.E., 2009c. Increased accuracy of artificial selection by using the realized relationship matrix. *Genet. Res. (Camb.)* 91, 47–60. <https://doi.org/10.1017/S0016672308009981>
- Hazel, L.N., 1943. The Genetic Basis for Constructing Selection Indexes. *Genetics* 28(6), 476-490.
- Hazel, L.N., Lush, J.L., 1942. The efficiency of three methods of selection. *J. Hered.* <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a105102>
- Henderson, C., 1949. Estimation of changes in herd environment (Abstract), *Journal of Dairy Science*.
- Henderson, C., 1982. Best linear unbiased prediction in populations that have undergone selection, in: Barton R.A., S.W.C. (Ed.), *Proceedings of the World Congress on Sheep and Beef Cattle Breeding*. Dunmore Press, Palmerston North, Massey University, Palmerston North, New Zealand, pp. 191–201.

- Henderson, C., 1950. Estimation of Genetic Parameters. *Ann. Math. Stat.* 21, 309–310.
- Henderson, C.R., 1984. *Applications of Linear Models in Animal Breeding Models*, University of Guelph.
- Henderson, C.R., 1976. A Simple Method for Computing the Inverse of a Numerator Relationship Matrix Used in Prediction of Breeding Values. *Biometrics* 32, 69. <https://doi.org/10.2307/2529339>
- Henderson, C.R., 1975. Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. *Biometrics* 31, 423–447. <https://doi.org/10.2307/2529430>
- Henderson, C.R., 1973. SIRE EVALUATION AND GENETIC TRENDS. *J. Anim. Sci.* 1973, 10–41. <https://doi.org/10.1093/ansci/1973.Symposium.10>
- Henderson, C.R., 1963. Selection Index and Expected Genetic Advance. *Stat. Genet. Plant Breed.* 141-163. NAS-NRC 982, Washington, DC.
- Henderson, C.R., Kempthorne, O., Searle, S.R., von Krosigk, C.M., 1959. The Estimation of Environmental and Genetic Trends from Records Subject to Culling. *Biometrics* 15, 192. <https://doi.org/10.2307/2527669>
- Hill, W.G., 1975. Linkage disequilibrium among multiple neutral alleles produced by mutation in finite population. *Theor. Popul. Biol.* 8, 117–126. [https://doi.org/10.1016/0040-5809\(75\)90028-3](https://doi.org/10.1016/0040-5809(75)90028-3)
- Hill, W.G., Robertson, A., 1968. Linkage disequilibrium in finite populations. *Theor. Appl. Genet.* <https://doi.org/10.1007/BF01245622>
- Howard, J.T., Rathje, T.A., Bruns, C.E., Wilson-Wells, D.F., Kachman, S.D., Spangler, M.L., 2018. The impact of selective genotyping on the response to selection using single-step genomic best linear unbiased prediction. *J. Anim. Sci.* <https://doi.org/10.1093/jas/sky330>
- Howard, R., Carriquiry, A.L., Beavis, W.D., 2014. Parametric and Nonparametric Statistical Methods for Genomic Selection of Traits with Additive and Epistatic Genetic Architectures. *G3: Genes|Genomes|Genetics*. <https://doi.org/10.1534/g3.114.010298>
- ICAR, 2016. *International Committee for Animal Recording Guidelines*, International Committee for Animal Recording. (accessed 2.5.19).
- Ikonen, T., Ahlfors, K., Kempe, R., Ojala, M., Ruottinen, O., 1999. Genetic Parameters for the Milk Coagulation Properties and Prevalence of Noncoagulating Milk in Finnish Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 82, 205–214. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75225-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75225-2)
- InfoHolstein, 2015. *Genomics 101*. https://www.holstein.ca/Public/en/Services/Genetic_Information_and_Services/Genomics_101. (accessed 1.2.19).

Israel, C., Weller, J.I., 2000. Effect of Misidentification on Genetic Gain and Estimation of Breeding Value in Dairy Cattle Populations. *J. Dairy Sci.* 83, 181–187. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74869-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74869-7)

Jaramillo, D.P., Zamora, A., Guamis, B., Rodríguez, M., Trujillo, A.J., 2008. Cheesemaking aptitude of two Spanish dairy ewe breeds: Changes during lactation and relationship between physico-chemical and technological properties. *Small Rumin. Res.* 78, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.04.005>

Jensen, H.B., Poulsen, N.A., Andersen, K.K., Hammershøj, M., Poulsen, H.D., Larsen, L.B., 2012. Distinct composition of bovine milk from Jersey and Holstein-Friesian cows with good, poor, or noncoagulation properties as reflected in protein genetic variants and isoforms. *J. Dairy Sci.* 95, 6905–6917. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5675>

Johanssen, W., 1903. *Über Erbllichkeit in Populationen und in reinen Linien* [About heritability in populations and in pure lines]. G. Fish. Jena.

Jurado, J.J., 2017. Incorporación de la información genómica a los programas de mejora genética de ovino lechero: cómo, cuándo, dónde., in: *Seminario Internacional de Genómica En Ovino*. OVIESpaña.

Kennedy, B.W., Sorenson, D.A., 1988. Properties of mixed-model methods for prediction of genetic merit. *Proc. Second Int. Conf. Quant. Genet.* Ed. by B.S. Weir, E.J. Eisen, M.M. Goodman, G. Namkoong, Sunderland, MA Sinauer Assoc. Inc. 91–103.

Kijas, J.W., Lenstra, J.A., Hayes, B., Boitard, S., Neto, L.R., Cristobal, M.S., Servin, B., McCulloch, R., Whan, V., Gietzen, K., Paiva, S., Barendse, W., Ciani, E., Raadsma, H., McEwan, J., Dalrymple, B., 2012. Genome-wide analysis of the world's sheep breeds reveals high levels of historic mixture and strong recent selection. *PLoS Biol.* <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001258>

Knol, E.F., Nielsen, B., Knap, P.W., 2016. Genomic selection in commercial pig breeding. *Anim. Front.* 6, 15–22. <https://doi.org/10.2527/af.2016-0003>

Larroque, H., Barillet, F., Baloche, G., Astruc, J.-M., Buisson, D., Shumbusho, F., Clément, V., Lagriffoul, G., Palhière, I., Rupp, R., Carillier-Jacquin, C., Robert-Granié, C., Legarra, A., 2014. Toward genomic breeding programs in French dairy sheep and goats. *Conf. 10 th World Congr. Genet. Appl. to Livest. Prod.* Vancouver, Canada. <https://doi.org/10.13140/2.1.1550.7207>

Lee, M.A., Cullen, N.G., Newman, S.A.N., Dodds, K.G., McEwan, J.C., Shackell, G.H., 2015. Genetic analysis and genomic selection of stayability and productive life in New Zealand ewes. *J. Anim. Sci.* <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8259>

- Lee, S.H., Clark, S., Van Der Werf, J.H.J., 2017a. Estimation of genomic prediction accuracy from reference populations with varying degrees of relationship. *PLoS One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189775>
- Lee, S.H., Weerasinghe, W.M.S.P., Wray, N.R., Goddard, M.E., Van Der Werf, J.H.J., 2017b. Using information of relatives in genomic prediction to apply effective stratified medicine. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/srep42091>
- Legarra, A., Aguilar, I., Misztal, I., 2009. A relationship matrix including full pedigree and genomic information. *J. Dairy Sci.* 92, 4656–4663. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2061>
- Legarra, A., Baloché, G., Barillet, F., Astruc, J.M., Soulas, C., Aguerre, X., Arrese, F., Mintegi, L., Lasarte, M., Maeztu, F., Beltrán de Heredia, I., Ugarte, E., 2014a. Within- and across-breed genomic predictions and genomic relationships for Western Pyrenees dairy sheep breeds Latxa, Manech, and Basco-Béarnaise. *J. Dairy Sci.* 97, 3200–3212. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7745>
- Legarra, A., Christensen, O.F., Aguilar, I., Misztal, I., 2014b. Single Step, a general approach for genomic selection. *Livest. Sci.* 166, 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.04.029>
- Legarra, A., Robert-Granié, C., Manfredi, E., Elsen, J.M., 2008. Performance of genomic selection in mice. *Genetics* 180, 611–618. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.088575>
- Lourenco, D.A.L., Fragomeni, B.O., Tsuruta, S., Aguilar, I., Zumbach, B., Hawken, R.J., Legarra, A., Misztal, I., 2015. Accuracy of estimated breeding values with genomic information on males, females, or both: An example on broiler chicken. *Genet. Sel. Evol.* 47. <https://doi.org/10.1186/s12711-015-0137-1>
- Lush, J.L., 1936. *Animal Breeding Plans*. Collegiate Press Inc, Ames, IA.
- Lynch, M., Walsh, B., 1998. *Genetics and analysis of quantitative traits.*, First Edit. ed. Sinauer & Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts. 01375. USA, Sunderland, Massachusetts.
- Malécot, G., 1948. *Les mathématiques de l'hérédité*. Masson et Cie, Paris.
- MAPAMA, 2019. MAPAMA. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/default.aspx> (accessed 5.28.19).
- McMahon, D.J., Brown, R.J., 1982. Evaluation of Formagraph for Comparing Rennet Solutions. *J. Dairy Sci.* 65, 1639–1642. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82390-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82390-4)
- McVean, G.A.T., 2002. A genealogical interpretation of linkage disequilibrium. *Genetics* 162, 987–991.

Mendel, G., 1865. Experiments in plant hybridization (1865).

Meuwissen, T., Goddard, M., 2010. Accurate prediction of genetic values for complex traits by whole-genome resequencing. *Genetics* 185, 623–631.
<https://doi.org/10.1534/genetics.110.116590>

Meuwissen, T., Hayes, B., Goddard, M., 2013. Accelerating Improvement of Livestock with Genomic Selection. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 1, 221–237. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103705>

Meuwissen, T.H.E., Hayes, B.J., Goddard, M.E., 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157, 1819–1829. <https://doi.org/11290733>

Misztal, I., Gianola, D., 1988. Indirect Solution of Mixed Model Equations. *J. Dairy Sci.* [https://doi.org/10.1016/S0022-0302\(88\)79987-7](https://doi.org/10.1016/S0022-0302(88)79987-7)

Misztal, I., Legarra, A., Aguilar, I., 2009. Computing procedures for genetic evaluation including phenotypic, full pedigree, and genomic information. *J. Dairy Sci.* 92, 4648–4655. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2064>

Morota, G., 2015. The Origin of BLUP and MME [WWW Document]. URL <http://morotalab.org/literature/2015/03/07/The-Origin-of-BLUP-and-MME/> (accessed 9.5.19).

Mrode, R.A., 2014. Linear models for the prediction of animal breeding values. Third edition. Boston, MA: CABI, [2014] ©2014.

Munoz, P.R., Resende, M.F.R., Huber, D.A., Quesada, T., Resende, M.D.V., Neale, D.B., Wegrzyn, J.L., Kirst, M., Peter, G.F., 2014. Genomic relationship matrix for correcting pedigree errors in breeding populations: Impact on genetic parameters and genomic selection accuracy. *Crop Sci.* 54, 1115–1123. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.12.0673>

Neimann-Sorensen, A., Robertson, A., 1961. The Association between Blood Groups and Several Production Characteristics in Three Danish Cattle Breeds. *Acta Agric. Scand.* 11, 163–196. <https://doi.org/10.1080/00015126109433054>

Oldenbroek, K., van der Waaij, L., 2015. Textbook Animal Breeding: Animal Breeding and Genetics for BSc Students. Centre for Genetic Resources and Animal Breeding and Genomics Group, Wageningen University and Research Centre.

Ota, T., Kimura, M., 1971. Linkage disequilibrium between two segregating nucleotide sites under the steady flux of mutations in a finite population. *Genetics* 68, 571–580.

Othmane, M.H., Carriedo, J., Primitivo, F.S., De La Fuente, L.F., 2002a. Genetic parameters for lactation traits of milking ewes: protein content and composition, fat, somatic cells and individual laboratory cheese yield. *Genet. Sel. Evol.* 34, 581. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-34-5-581>

Othmane, M.H., Carriedo, J.A., De La Fuente, L.F., Primitivo, F.S., 2002b. Factors affecting test-day milk composition in dairy ewes, and relationships amongst various milk components. *J. Dairy Res.* 69, 53–62. <https://doi.org/10.1017/S0022029901005234>

Othmane, M.H., De La Fuente, L.F., Carriedo, J.A., Primitivo, F.S., 2002c. Heritability and Genetic Correlations of Test Day Milk Yield and Composition, Individual Laboratory Cheese Yield, and Somatic Cell Count for Dairy Ewes. *J. Dairy Sci.* 85, 2692–2698. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74355-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74355-5)

OVIespaña, 2019. Ovino España. <https://www.oviespana.com/> (accessed 6.5.19).

Patterson, H. D., and Thompson, R., 1971. Recovery of Inter-Block Information When Block Sizes Are Unequal. *Biometrika* 58, no. 3. 545-54. doi:10.2307/2334389.

Panthi, R.R., Jordan, K.N., Kelly, A.L., Sheehan, J.J. (Diarmuid), 2017. Selection and Treatment of Milk for Cheesemaking, in: *Cheese*. Elsevier, pp. 23–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00002-8>

Payne, F., 1918. The Effect of Artificial Selection on Bristle Number in *Drosophila ampelophila* and its Interpretation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 4, 55–58. <https://doi.org/10.1073/pnas.4.3.55>

Pazzola, M., 2019. Coagulation Traits of Sheep and Goat Milk. *Anim.* an open access J. from MDPI 9, 540. <https://doi.org/10.3390/ani9080540>

Pazzola, M., Cipolat-Gotet, C., Bittante, G., Cecchinato, A., Dettori, M.L., Vacca, G.M., 2018. Phenotypic and genetic relationships between indicators of the mammary gland health status and milk composition, coagulation, and curd firming in dairy sheep. *J. Dairy Sci.* 101, 3164–3175. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13975>

Politis, I., Ng-Kwai-Hang, K.F., 1988. Effects of Somatic Cell Count and Milk Composition on Cheese Composition and Cheese Making Efficiency. *J. Dairy Sci.* 71, 1711–1719. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79737-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79737-4)

Pryce, J.E., Gredler, B., Bolormaa, S., Bowman, P.J., Egger-Danner, C., Fuerst, C., Emmerling, R., Sölkner, J., Goddard, M.E., Hayes, B.J., 2011. Short communication: Genomic selection using a multi-breed, across-country reference population. *J. Dairy Sci.* 94, 2625–2630. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3719>

Puledda, A., Gaspa, G., Manca, M.G., Serdino, J., Urgeghe, P.P., Dimauro, C., Negrini, R., Macciotta, N.P.P., 2017. Estimates of heritability and genetic correlations for milk coagulation

properties and individual laboratory cheese yield in Sarda ewes. *animal* 11, 920–928. <https://doi.org/10.1017/S1751731116002147>

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A.R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I.W., Daly, M.J., Sham, P.C., 2007. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 559–575. <https://doi.org/10.1086/519795>

Quaas, R.L., 1976. Computing the Diagonal Elements and Inverse of a Large Numerator Relationship Matrix. *Biometrics* 32, 949. <https://doi.org/10.2307/2529279>

R Core Team, 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>.

Raoul, J., Swan, A.A., Elsen, J.M., 2017. Using a very low-density SNP panel for genomic selection in a breeding program for sheep. *Genet. Sel. Evol.* <https://doi.org/10.1186/s12711-017-0351-0>

Remeuf, F., Cossin, V., Dervin, C., Lenoir, J., Tomassone, R., 1991. Relations entre les caractères physico-chimiques des laits et leur aptitude fromagère. *Lait*. <https://doi.org/10.1051/lait:1991431>

Riggio, V., Abdel-Aziz, M., Matika, O., Moreno, C.R., Carta, A., Bishop, S.C., 2014. Accuracy of genomic prediction within and across populations for nematode resistance and body weight traits in sheep. *Animal* 8, 520–528. <https://doi.org/10.1017/S1751731114000081>

Robinson, G.K., 1991. That BLUP is a good thing: The estimation of random effects. *Stat. Sci.* <https://doi.org/10.1214/ss/1177011926>

Rupp, R., Larroque, H., McEwan, J., Mucha, S., Conington, J., 2016. Genomic application in sheep and goat breeding. *Anim. Front.* <https://doi.org/10.2527/af.2016-0006>

Sánchez-Mayor, M., Pong-Wong, R., Gutiérrez-Gil, B., Garzón, A., de la Fuente, L.F., Arranz, J.J., 2019. Phenotypic and genetic parameter estimates of cheese-making traits and their relationships with milk production, composition and functional traits in Spanish Assaf sheep. *Livest. Sci.* 228, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.08.004>

Sánchez-Mayor, M., Pong-Wong, R., Navarro, P., de la Fuente, L., Arranz, J., 2018. Análisis preliminar sobre las posibilidades del uso de la selección genómica en el programa de mejora genética para la producción de leche en la raza churra. XIX Reun. Nac. Mejor. Genética Anim. León. Spain

Sánchez, J.P., García-Gámez, E., Gutiérrez-Gil, B., Arranz, J.J., 2011. Evaluación preliminar de procedimientos de selección genómica en una población de ganado ovino lechero de raza churra. XIV Jornadas sobre Prod. Anim. AIDA TOMO II, 551–553.

Sanders, K., Bennewitz, J., Kalm, E., 2006. Wrong and Missing Sire Information Affects Genetic Gain in the Angeln Dairy Cattle Population. *J. Dairy Sci.* 89, 315–321. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72096-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72096-3)

Schaeffer, L., 2019. *Animal Models*. Self-Published.

Schaeffer, L., 2014. Making Covariance Matrices Positive Definite 1–4. <https://doi.org/http://animalbiosciences.uoguelph.ca/~lrs/ELARES/PDforce.pdf>

Schumm, J.W., Knowlton, R.G., Braman, J.C., Barker, D.F., Botstein, D., Akots, G., Brown, V.A., Gravius, T.C., Helms, C., Hsiao, K., 1988. Identification of more than 500 RFLPs by screening random genomic clones. *Am J Hum Genet.*

Shumbusho, F., Raoul, J., Astruc, J.M., Palhiere, I., Elsen, J.M., 2013. Potential benefits of genomic selection on genetic gain of small ruminant breeding programs. *J. Anim. Sci.* <https://doi.org/10.2527/jas.2012-6205>

Shumbusho, F., Raoul, J., Astruc, J.M., Palhiere, I., Lemarié, S., Fugeray-Scarbel, A., Elsen, J.M., 2016. Economic evaluation of genomic selection in small ruminants: A sheep meat breeding program. *Animal.* <https://doi.org/10.1017/S1751731115002049>

Smith, C., 1967. Improvement of metric traits through specific genetic loci. *Anim. Sci.* 9, 349–358. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0003356100038642>

Smith, C., Simpson, S.P., 1986. The use of genetic polymorphisms in livestock improvement. *J. Anim. Breed. Genet.* 103, 205–217. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.1986.tb00083.x>

Smith, H.F., 1936. A Discriminant Function for Plant Selection. *Ann. Eugen.* 7, 240–250. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1936.tb02143.x>

Smyth, G.K. and Verbyla, A.P. (1996), A Conditional Likelihood Approach to Residual Maximum Likelihood Estimation in Generalized Linear Models. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 58: 565-572. [doi:10.1111/j.2517-6161.1996.tb02101.x](https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1996.tb02101.x)

Soller, M., 1978. The use of loci associated with quantitative effects in dairy cattle improvement. *Anim. Sci.* 27, 133–139. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0003356100035960>

Soller, M., Beckmann, J.S., 1983. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. *Theor. Appl. Genet.* <https://doi.org/10.1007/BF00303917>

Stuber, C.W., Goodman, M.M., Moll, R.H., 1982. Improvement of Yield and Ear Number Resulting from Selection at Allozyme Loci in a Maize Population1. *Crop Sci.* 22, 737–740. <https://doi.org/10.2135/cropsci1982.0011183X002200040010x>

Suárez-Vega, A., Gutiérrez-Gil, B., Benavides, J., Perez, V., Tosser-Klopp, G., Klopp, C., Keenel, S.J., Arranz, J.J., 2015. Combining GWAS and RNA-Seq approaches for detection of the causal mutation for hereditary junctional epidermolysis bullosa in sheep. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126416>

Suárez-Vega, A., Gutiérrez-Gil, B., Cuchillo-Ibañez, I., Saéz-Valero, J., Pérez, V., García-Gómez, E., Benavides, J., Arranz, J.J., 2013. Identification of a 31-bp deletion in the RELN gene causing lissencephaly with cerebellar hypoplasia in sheep. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081072>

Sved, J.A., 1971. Linkage disequilibrium and homozygosity of chromosome segments in finite populations. *Theor. Popul. Biol.* 2, 125–141. [https://doi.org/10.1016/0040-5809\(71\)90011-6](https://doi.org/10.1016/0040-5809(71)90011-6)

Swan, A.A., 2012. Genomic selection in the Australian sheep industry, *AGBU Pig Genetics Workshop*.

Swan, A.A., Brown, D.J., Daetwyler, H.D., Hayes, B.J., Kelly, M., Moghaddar, N., Van Der Werf, J.H.J., 2014. Genomic Evaluations in the Australian Sheep Industry, in: *Proceedings of the 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*.

Swan, A.A., Johnston, D.J., Brown, D.J., Tier, B., Graser, H.U., 2012. Integration of genomic information into beef cattle and sheep genetic evaluations in Australia. *Anim. Prod. Sci.* <https://doi.org/10.1071/AN11117>

Syrstad, O., 1970. Estimating Direct and Correlated Response to Selection. A Note for Clarification. *Acta Agric. Scand.* 20, 205–206. <https://doi.org/10.1080/00015127009433408>

Tenesa, A., Navarro, P., Hayes, B.J., Duffy, D.L., Clarke, G.M., Goddard, M.E., Visscher, P.M., 2007. Recent human effective population size estimated from linkage disequilibrium. *Genome Res.* 17, 520–526. <https://doi.org/10.1101/gr.6023607>

Troch, T., Lefébure, É., Sindic, M., Baeten, V., Colinet, F., Gengler, N., 2017. Cow milk coagulation: Process description, variation factors and evaluation methodologies. a review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 21, 276–287. <https://doi.org/10.25518/1780-4507.13692>

Tsai, H.-Y., Hamilton, A., Tinch, A.E., Guy, D.R., Bron, J.E., Taggart, J.B., Gharbi, K., Stear, M., Matika, O., Pong-Wong, R., Bishop, S.C., Houston, R.D., 2016. Genomic prediction of host resistance to sea lice in farmed Atlantic salmon populations. *Genet. Sel. Evol.* 48, 47. <https://doi.org/10.1186/s12711-016-0226-9>

Tsuruta, S., Misztal, I., Aguilar, I., Lawlor, T.J., 2011. Multiple-trait genomic evaluation of linear type traits using genomic and phenotypic data in US Holsteins. *J. Dairy Sci.* <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4256>

Turelli, M., 2017. Commentary: Fisher's infinitesimal model: A story for the ages. *Theor. Popul. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2017.09.003>

Turelli, M., 2016. Edward east on the mendelian basis of quantitative trait variation. *Genetics*. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.196915>

Vacca, G.M., Pazzola, M., Dettori, M.L., Pira, E., Malchiodi, F., Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., Bittante, G., 2015. Modeling of coagulation, curd firming, and syneresis of milk from Sarda ewes. *J. Dairy Sci.* 98, 2245–2259. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8902>

Vallas, M., Bovenhuis, H., Kaart, T., Pärna, K., Kiiman, H., Pärna, E., 2010. Genetic parameters for milk coagulation properties in Estonian Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 93, 3789–3796. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2435>

VanRaden, P.M., 2008. Efficient methods to compute genomic predictions. *J. Dairy Sci.* 91, 4414–23. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0980>

VanRaden, P.M., 2007. Genomic Measures of Relationship and Inbreeding. *Interbull Bull.* 111–114. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

VanRaden, P.M., Van Tassell, C.P., Wiggans, G.R., Sonstegard, T.S., Schnabel, R.D., Taylor, J.F., Schenkel, F.S., 2009. Invited Review: Reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 92, 16–24. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1514>

Verbyla, A.P., 1990. A Conditional Derivation of Residual Maximum Likelihood. *Aust. J. Stat.* 32, 227–230. <https://doi.org/10.1111/j.1467-842X.1990.tb01015.x>

Visscher, P.M., 2018. Comments to the book “Evolution and Selection of Quantitative Traits”. “Missing Heritability” and human complex traits.

Visscher, P.M., Brown, M.A., McCarthy, M.I., Yang, J., 2012. Five Years of GWAS Discovery. *Am. J. Hum. Genet.* 90, 7–24. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.11.029>

Visscher, P.M., Hill, W.G., Wray, N.R., 2008. Heritability in the genomics era - Concepts and misconceptions. *Nat. Rev. Genet.* <https://doi.org/10.1038/nrg2322>

Vitezica, Z.G., Aguilar, I., Misztal, I., Legarra, A., 2011. Bias in genomic predictions for populations under selection. *Genet. Res. (Camb.)* 93, 357–366. <https://doi.org/10.1017/S001667231100022X>

Wainschtein, P., Jain, D.P., Yengo, L., Zheng, Z., Cupples, L.A., Shadyab, A.H., McKnight, B., Shoemaker, B.M., Mitchell, B.D., Psaty, B.M., Kooperberg, C., Roden, D., Darbar, D., Arnett, D.K., Regan, E.A., Boerwinkle, E., Rotter, J.I., Allison, M.A., McDonald, M.-L.N., Chung, M.K., Smith, N.L., Ellinor, P.T., Vasan, R.S., Mathias, R.A., Rich, S.S., Heckbert, S.R., Redline, S.,

Guo, X., Chen, Y.-D.I., Liu, C.-T., de Andrade, M., Yanek, L.R., Albert, C.M., Hernandez, R.D., McGarvey, S.T., North, K.E., Lange, L.A., Weir, B.S., Laurie, C.C., Yang, J., Visscher, P.M., 2019. Recovery of trait heritability from whole genome sequence data. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/588020>

Walsh, B., Lynch, M., 2018. *Evolution and Selection of Quantitative Traits*. Oxford University Press, New York. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198830870.001.0001>

Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J., 2006. *Dairy science and technology*, second edition. Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis Group.

Weir, B.S., Hill, W.G., 1980. Effect of mating structure on variation in linkage disequilibrium. *Genetics* 95, 477–488. [https://doi.org/10.1016/0040-5809\(80\)90061-1](https://doi.org/10.1016/0040-5809(80)90061-1)

Weller, J.I., 2016. *Genomic Selection in Animals*, *Genomic Selection in Animals*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ. <https://doi.org/10.1002/9781119213628>

Weller, J.I., Ezra, E., Ron, M., 2017. Invited review: A perspective on the future of genomic selection in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 100, 8633–8644. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12879>

Weng, Z., Wolc, A., Shen, X., Fernando, R.L., Dekkers, J.C.M., Arango, J., Settar, P., Fulton, J.E., O’Sullivan, N.P., Garrick, D.J., 2016. Effects of number of training generations on genomic prediction for various traits in a layer chicken population. *Genet. Sel. Evol.* 48. <https://doi.org/10.1186/s12711-016-0198-9>

Werf, J. Van Der, 2003. Introduction to Linear Models, in: *Materials on Linear Models in Animal Breeding*. Animal Genetics, UNE, Armidale (AU), pp. 1–17.

Werf, J. Van Der, Banks, R.G., Clark, S.A., Lee, S.J., Daetwyler, H.D., Hayes, B.J., Swan, A.A., 2014. *Genomic Selection in Sheep Breeding Programs*. 10th World Congr. Genet. Appl. to Livest. Prod. Genomic.

Wiggans, G.R., Cole, J.B., Hubbard, S.M., Sonstegard, T.S., 2017. Genomic Selection in Dairy Cattle: The USDA Experience. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 5, 309–327. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021815-111422>

Wiggans, G.R., VanRaden, P.M., Bacheller, L.R., Tooker, M.E., Hutchison, J.L., Cooper, T.A., Sonstegard, T.S., 2010. Selection and management of DNA markers for use in genomic evaluation. *J. Dairy Sci.* 93, 2287–2292. <https://doi.org/10.3168/JDS.2009-2773>

Wolc, A., Arango, J., Settar, P., Fulton, J.E., O’Sullivan, N.P., Preisinger, R., Habier, D., Fernando, R., Garrick, D.J., Dekkers, J.C.M., 2011. Persistence of accuracy of genomic estimated breeding values over generations in layer chickens. *Genet. Sel. Evol.* 43. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-43-23>

Wolc, A., Kranis, A., Arango, J., Settar, P., Fulton, J.E., O'Sullivan, N.P., Avendano, A., Watson, K.A., Hickey, J.M., de los Campos, G., Fernando, R.L., Garrick, D.J., Dekkers, J.C.M., 2016. Implementation of genomic selection in the poultry industry. *Anim. Front.* 6, 23–31. <https://doi.org/10.2527/af.2016-0004>

Woolliams, J.A., Berg, P., Dagnachew, B.S., Meuwissen, T.H.E., 2015. Genetic contributions and their optimization. *J. Anim. Breed. Genet.* 132, 89–99. <https://doi.org/10.1111/jbg.12148>

Wright, S., 1922. Coefficients of Inbreeding and Relationship. *Am. Nat.* 56, 330–338.

Yule, G.U., 1906. On the theory of inheritance of quantitative compound characters on the basis of Mendel's laws; a preliminary note. *Rep. 3rd Int. Conf. Genet. R. Hortic. Soc.* 140–142.

Zhao, F., Wang, G., Zeng, T., Wei, C., Zhang, L., Wang, H., Zhang, S., Liu, R., Liu, Z., Du, L., 2014. Estimations of genomic linkage disequilibrium and effective population sizes in three sheep populations. *Livest. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.10.015>