

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA PRESENCIA DE LUNARES EN LA
RAZA CORRIEDALE MEDIANTE ENFOQUES CUANTITATIVOS Y
MOLECULARES**

por

Francisco PEÑAGARICANO SOSA

**TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magister en Ciencias Agrarias opción
Ciencias Animales**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2010**

Tesis aprobada por:

LAURA ASTIGARRAGA

IGNACIO AGUILAR

GABRIEL CIAPPESONI

EDUARDO FRANK

Fecha: **20 de Agosto de 2010**

Autor: -----
FRANCISCO PEÑAGARICANO

Tutor: -----
JORGE URIOSTE

Co-tutor: -----
HUGO NAYA

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	V
RESUMEN.....	VII
SUMMARY.....	VIII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1 ABORDAJE CUANTITATIVO DEL PROBLEMA.....	2
1.2 ABORDAJE MOLECULAR DEL PROBLEMA.....	5
2. <u>MODEL COMPARISON FOR ANALYSIS OF BLACK SPOTS IN SHEEP</u>	8
2.1 SUMMARY.....	9
2.2 INTRODUCTION.....	10
2.3 MATERIALS AND METHODS.....	12
2.4 RESULTS AND DISCUSSION.....	18
2.5 CONCLUSIONS.....	29
2.6 ACKNOWLEDGEMENTS.....	30
2.7 REFERENCES.....	30
3. <u>EXPRESIÓN GÉNICA EN LUNARES NEGROS Y PIEL BLANCA</u>	35
3.1 RESUMEN.....	36
3.2 SUMMARY.....	37
3.3 INTRODUCCIÓN.....	38
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
3.6 CONCLUSIONES.....	52
3.7 AGRADECIMIENTOS.....	55

3.8 BIBLIOGRAFÍA.....	55
4. <u>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</u>	60
4.1 DISCUSIÓN GENERAL.....	60
4.2 CONCLUSIONES GLOBALES.....	64
5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	66
6. <u>ANEXOS</u>	73
6.1 INSTRUCCIONES PARA AUTORES JABG.....	73
6.2 INSTRUCCIONES PARA AUTORES REVISTA AGROCIENCIA.....	78

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro No.	Página
2.1. Percentage of animals with black spots, mean and standard deviation of number of black spots by class of age at hearing.....	19
2.2. Estimates of mean and quantiles (0.025, 0.975) of the posterior distribution of variance components and genetic parameters by response and model.....	21
2.3. Mean squared error and correlation between observed and fitted values by response and model.....	22
2.4. Spearman rank correlations between predictions of random effects obtained from different models fitted to different response variables.....	23
2.5. Mean squared error of prediction for a 3-fold cross-validation study by response and model.....	26
3.1. Secuencia de los cebadores y largo esperado del producto amplificado en las reacciones de PCR en tiempo real.....	44
3.2. Sondas expresadas en forma diferencial entre la piel blanca y ambos tipos de lunares (con y sin producción de fibras pigmentadas).....	46
3.3. Expresión génica estimada mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando el gen GAPDH como control endógeno y calculando la expresión relativa a la de la piel blanca.....	54

Figura No.	Página
2.1. Empirical distribution of the estimated expected of presence or absence of black spots and number of black spots for the first record of an animal.....	27
3.1. Diseño experiemental.....	41

RESUMEN

La presencia de fibras pigmentadas (FP) en la lana blanca disminuye su calidad y causa importantes pérdidas económicas. La selección directa contra FP es un método caro y engorroso. Una alternativa es usar un rasgo de fácil medición y asociado genéticamente con FP. En este contexto, la presencia de lunares aparece como un rasgo interesante a analizar. El objetivo de esta tesis fue estudiar los lunares en ovinos Corriedale mediante enfoques de genética cuantitativa (I) y molecular (II). En el Trabajo I se evaluaron diferentes modelos para el análisis genético de la presencia (BINBS) y número de lunares (NUMBS). Se ajustaron modelos lineal y Probit para BINBS y modelos lineal y de Poisson para NUMBS. Las estimaciones de heredabilidad estuvieron entre 0,154 y 0,230 para BINBS y 0,269 y 0,474 para NUMBS. Para BINBS, los modelos mostraron similares desempeños en bondad de ajuste y capacidad predictiva y una correlación de 0,984 entre las estimaciones de valores de cría. Para NUMBS, el modelo de Poisson con residuo ajustó mejor los datos y mostró mejor capacidad predictiva. Los valores de cría estimados con este modelo estuvieron más correlacionados con los obtenidos para BINBS que con el modelo lineal. Para implementar una evaluación genética, a pesar del buen desempeño del modelo de Poisson, parece más razonable registrar BINBS y utilizar cualquiera de los modelos aquí estudiados. En el Trabajo II se analizó mediante microarreglos la expresión génica en lunares (con y sin FP) y en piel blanca de manera de identificar posibles genes involucrados en el desarrollo de este rasgo. La mayoría de los genes propuestos por la bibliografía (ASIP, MC1R y *c-kit*) no mostraron diferencias en su expresión. Muchos de los genes expresados en forma diferencial ($p < 0.005$), por ejemplo *c-fos*, *KLF4* y *UFC1*, cumplen funciones biológicas que los hacen plausibles de estar implicados en la formación de lunares. La identificación y caracterización de estos genes posibilitará discernir los mecanismos moleculares que subyacen este fenómeno; un primer paso hacia el desarrollo de herramientas moleculares que asistan la selección.

Palabras clave: fibras pigmentadas, parámetros genéticos, comparación de modelos, expresión génica, genes candidatos, microarreglos.

SUMMARY

The presence of pigmented fibers (PF) in white wool decreases the quality and causes severe economic losses. Direct selection against PF is an expensive and cumbersome method. An alternative approach is to use an easy measured trait genetically associated with PF. In this context, the presence of black spots appears as an interesting trait to be analyzed. The objective of this thesis was to study the spots in Corriedale sheep using quantitative (I) and molecular (II) genetic approaches. In Study I, we evaluated different models for the genetic analysis of the presence (BINBS) and number of black spots (NUMBS). Linear and probit models for BINBS and linear and Poisson models for NUMBS were fitted. Estimates of heritability ranged from 0.154 to 0.230 for BINBS and 0.269 to 0.474 for NUMBS. For BINBS, both models exhibited similar performance in terms of goodness of fit and predictive ability and a correlation of 0.984 between estimated breeding values. For NUMBS, the Poisson model with residual fitted the data better and showed a better predictive ability. Estimated breeding values from this model were more strongly correlated with those obtained from BINBS models than those from the linear model. To implement a genetic evaluation, despite the good performance of the Poisson model, it seems more reasonable to record BINBS and use any of the models studied here. In Study II, we analyzed gene expression in black spots (with and without PF) and in white skin by microarray techniques, in order to identify possible genes involved in the development of this trait. Most of the genes proposed in the literature (ASIP, MC1R and *c-kit*) showed no expression difference. Many of the differentially expressed genes ($p < 0.005$), for example *c-fos*, KLF4 and UFC1, fulfill biological functions that are plausible to be involved in the formation of black skin spots. Identification and characterization of these genes will help to discern the molecular mechanisms underlying this phenomenon, a first step towards developing molecular tools to assist the selection.

Keywords: pigmented fibers, genetic parameters, model comparison, gene expression, candidate genes, microarrays.

1. INTRODUCCIÓN

La lana posee una importancia ineludible en la economía uruguaya: en las últimas seis zafas las exportaciones de lana generaron un ingreso promedio anual de 203 millones de dólares por concepto de 53.3 millones de kilos anuales (Secretariado Uruguayo de la Lana, 2010a). El 70% de la lana se exporta como lana peinada donde las mejores oportunidades están en mercados con altos niveles de exigencia y parámetros de calidad (Otegui, 2008). Dentro del rubro ovino uruguayo, la raza Corriedale es la más importante en número de criadores y volúmenes de lana producidos, constituyendo el 65% de la majada nacional (Secretariado Uruguayo de la Lana, 2010b).

La lana blanca posee un cierto número de fibras coloreadas que al momento de su procesamiento disminuyen la versatilidad de colores a utilizar en su tinción. Actualmente, la presencia de fibras coloreadas es el principal defecto de las lanas Corriedale, por encima de la presencia de fibras meduladas y del color, limitando su competitividad con otras fibras textiles y reduciendo su valor hasta en un 15% (Raquet y Ruvira 2008, com. pers.).

Las fibras coloreadas pueden tener un origen ambiental o genético. Las primeras ocurren por tinción de las fibras con la orina, materias fecales o productos químicos y se ubican mayoritariamente en los bordes del vellón. Las segundas son fibras que durante su crecimiento en el folículo incorporan un pigmento oscuro denominado melanina, producido por los melanocitos ubicados en la piel y los folículos. Las fibras coloreadas de origen genético (pigmentadas) se originan principalmente de lunares en la piel y de fibras pigmentadas aisladas, distribuidas al azar en el vellón (Cardellino *et al.*, 1990; Fleet, 1996). El Plan de Acondicionamiento de la Lana propuesto por el Secretariado Uruguayo de la Lana ha sido exitoso eliminando una gran proporción de las fibras de origen ambiental, quedando las de origen genético, que aún superan ampliamente el mínimo exigido por los mercados de calidad (Cardellino y Mendoza, 1996).

Ante este panorama se deben buscar herramientas genéticas que permitan disminuir la presencia de fibras pigmentadas en la lana. La medición directa de la presencia de fibras pigmentadas en el vellón de cada animal requiere un sofisticado y caro procesamiento a nivel de laboratorio lo que la hace impracticable como criterio de selección. La alternativa es buscar características heredables, más sencillas de medir y genéticamente correlacionadas con la presencia de fibras pigmentadas en el vellón. En este sentido, la presencia de lunares aparece como una muy buena característica a ser estudiada; es una característica de fácil medición y resultados preliminares sugieren que está fuertemente correlacionada con la presencia de fibras pigmentadas en el vellón (Urioste *et al.*, 2008a).

La biología y control de la pigmentación de las fibras de lana es un proceso muy complejo. El rol de los genes involucrados y los factores que regulan la proliferación de las células pigmentadas todavía no han sido identificados en forma precisa en ovinos (Fleet, 2002; Renieri *et al.*, 2008). En este contexto, aparece como muy favorable abordar la problemática de la pigmentación en ovinos, en nuestro caso la presencia de lunares negros en la zona de vellón, no sólo desde el mejoramiento genético clásico sino también utilizando las herramientas alternativas y complementarias que ofrece actualmente la genética molecular (Purvis *et al.*, 2005; Van der Werf, 2007).

1.1 ABORDAJE CUANTITATIVO DEL PROBLEMA

El punto de inicio de cualquier programa de mejora genética, según Ponzoni (1992), consiste en la identificación de los objetivos y la elección de criterios de selección. Los objetivos de selección son rasgos biológicos que debemos mejorar genéticamente por su importancia económica mientras que los criterios de selección son características correlacionadas genéticamente con el objetivo, de razonable heredabilidad y fácil medición, que se van a medir para determinar el mérito genético de los animales individuales. En nuestro caso, se podría definir el objetivo de selección

como número de fibras pigmentadas por kilo de lana peinada, dado que su disminución presenta indudable valor económico. Sin embargo, la medición directa de las fibras pigmentadas es un procedimiento caro y engorroso, lo que lo hace impracticable como criterio de selección. La alternativa es buscar características más sencillas de medir y genéticamente correlacionadas con la presencia de fibras pigmentadas en el vellón. Se han propuesto una serie de características como cantidad y superficie de lunares en la zona de vellón, pigmentación en cabeza, orejas, patas, pezuñas, fibras oscuras en el sitio de los cuernos y halo hair (fibras de color marrón o negro que sobresalen en el cuello de algunos corderos al nacer y caen a las pocas semanas) (Fleet y Stafford, 1989).

A nivel internacional, los parámetros genéticos reportados (heredabilidades y correlaciones genéticas) tanto para la presencia de fibras pigmentadas como para otras características de pigmentación (presencia de lunares en la zona de vellón y pigmentación en zonas de no vellón) son escasos y en algún caso de limitada calidad debido a la baja precisión en sus estimaciones (Fleet, 1996; Enns y Nicoll, 2002). Estos valores están referidos a las razas Merino y Romney Marsh, por lo que además tienen poco valor para plantear un programa de selección en el Corriedale en Uruguay.

A nivel nacional, desde el año 2001 la Universidad de la República, con el apoyo del Secretariado Uruguayo de la Lana y la Sociedad de Criadores de Corriedale, viene investigando sobre los factores genéticos y ambientales involucrados en el desarrollo de fibras pigmentadas en la raza Corriedale. Animales y vellones de 2 majadas experimentales fueron inspeccionados anualmente a través de análisis de laboratorio y recolección de datos de campo. Los primeros resultados sugieren la existencia de variabilidad genética en la inmensa mayoría de las características analizadas (Llaneza *et al.*, 2007, Peñagaricano *et al.*, 2007). Estimaciones preliminares sugieren que la presencia de lunares es una característica de moderada heredabilidad y alta repetibilidad y que está correlacionada genéticamente con la presencia de fibras pigmentadas en el vellón (Urioste *et al.*, 2008a).

En este contexto, los aspectos metodológicos a considerar para el tratamiento estadístico de las variables candidatas no son menores. Algunas características de pigmentación pueden ser visualizadas como respuestas ordenadas en pocas clases, siendo el caso más extremo la presencia o la ausencia de la observación. Numerosos trabajos han sido reportados sobre análisis de datos discretos en el área del mejoramiento genético animal; trabajos pioneros en esta área son los de Gianola (1982) y Gianola y Foulley (1983). En nuestro caso, la variable presencia de lunares puede considerarse una variable binaria y modelarse utilizando un modelo umbral o probit (Wright, 1934). Para que una característica discontinua sea expresada, un determinado valor umbral en una escala continua, subyacente, debe ser cruzado. La variable subyacente es influenciada tanto por efectos ambientales como por numerosos genes que tienen pequeños efectos aditivos. En este caso, se puede incluso agrupar la presencia de lunares en pocas categorías según la predominancia de fibras pigmentadas y utilizar un modelo multiumbral. Otra alternativa, a pesar de la naturaleza binaria de la variable, es la utilización de un modelo lineal.

Por otra parte, la variable número de lunares, variable de conteo, puede ser modelada mediante una distribución de Poisson (Foulley *et al.*, 1987). Esta distribución es caracterizada por un parámetro (λ), que es al mismo tiempo la media y la varianza, de tal manera que el cociente entre ambos es igual a uno. Los datos provenientes del conteo de lunares se caracterizan por tener una varianza bastante mayor a la media. En este caso una alternativa válida es la utilización de un modelo de Poisson con la introducción de un residuo aleatorio de manera de modelar diferencias individuales y acomodar la sobredispersión. Otra alternativa es la utilización de un modelo de Poisson con exceso de ceros (ZIP: Zero Inflated Poisson) que involucra una mezcla de distribuciones (Lambert, 1992). Naya *et al.* (2008) trabajando con ambos modelos han demostrado que pueden llegar a ser muy útiles para analizar número de lunares en la zona de vellón. Finalmente, el conteo de lunares puede ser modelado también mediante un modelo lineal.

Tanto la presencia como el número de lunares en la zona de vellón presentan un interesante desafío a la hora de su análisis genético. En ambos casos existe más de una alternativa de análisis y resulta fundamental, además de la estimación de parámetros genéticos, comparar la bondad de ajuste y la capacidad predictiva de los diversos modelos antes de proponer uno para analizar y evaluar genéticamente estas características a nivel poblacional.

1.2 ABORDAJE MOLECULAR DEL PROBLEMA

Los ovinos productores de lana blanca carecen de melanocitos (células derivadas de la cresta neural especializadas en la producción de melanina) en la piel al momento que se desarrollan los folículos de la fibra de lana, y esta ausencia persiste generalmente en el animal adulto (Fleet *et al.*, 2004). Sin embargo y por mecanismos aún desconocidos, algunos animales nacen con, y la mayoría desarrolla con el tiempo, lunares en la piel que pueden además producir fibras de lana pigmentadas. Posiblemente los genes que intervienen en este proceso sean numerosos. A pesar de la relevancia que tiene la pigmentación en la calidad de la lana, solamente dos de los genes involucrados, *melanocortin-1 receptor* (MC1R) y *agouti signalling peptide* (ASIP), responsables de producir animales de color negro, han sido hasta el momento caracterizados a nivel molecular (Våge *et al.*, 1999; Norris y Whan, 2008). Tanto en el ratón como en el bovino y en el cerdo, se han encontrado diferentes genes que están involucrados en los distintos patrones de pigmentación observados. Entre ellos, los genes MC1R, ASIP, *c-Kit*, *mast cell growth factor* (MGF) y *endothelin receptor B* (EDNRB) parecen ser los más relevantes (Klungland y Våge, 2000; Fleet, 2002). Aún falta demostrar en el ovino que estos genes estén realmente involucrados en la presencia de lunares y la producción de fibras pigmentadas.

Resulta fundamental identificar los genes que están implicados en el proceso de formación de lunares negros en animales de capa blanca, para luego comprender los

mecanismos moleculares que subyacen este fenotipo. Identificar los genes responsables permitirá en un futuro generar herramientas moleculares que permitan seleccionar en contra de la aparición de esta característica indeseada.

Para abordar esta problemática, una opción sería la de caracterizar a nivel molecular los genes candidatos propuestos por la bibliografía y observar si existen diferencias entre animales que producen lunares y aquellos que no los producen. Otra alternativa, recomendable en estos casos donde el conocimiento previo es escaso (Cassar Malek *et al.*, 2008), es la de estudiar mediante microarreglos la expresión génica a nivel de los lunares y piel blanca sin lunares y detectar aquellos genes que se expresan de manera diferencial. Walsh y Henderson (2004) hacen una muy buena descripción de la tecnología de los microarreglos mencionando los potenciales usos de esta tecnología en el área del mejoramiento genético animal. Estudios de expresión génica en ovinos mediante microarreglos han sido reportados para estudiar susceptibilidad a parásitos gastrointestinales (por ejemplo, Keane *et al.*, 2006) y para estudiar el desarrollo folicular de la fibra de lana (Norris *et al.*, 2005). Este trabajo, de especial interés en nuestro caso, utiliza microarreglos que combinan secuencias expresadas en la piel del ovino (feto y adulto) y bovino (adulto). Incluso se han reportado estudios de expresión génica en ovinos utilizando microarreglos de bovino dada la gran similitud que existe entre las secuencias codificantes de los dos genomas (Maddox y Cockett, 2007). Cabe remarcar que hasta el momento no han sido reportados trabajos utilizando la tecnología de los microarreglos enfocados a resolver temas de pigmentación en el ovino.

El objetivo general de esta tesis fue la caracterización genética de la presencia de lunares en la zona de vellón de ovinos de la raza Corriedale mediante enfoques cuantitativos y moleculares. La estructura central de la tesis consiste en dos artículos científicos que abordan cada uno de estos enfoques complementarios. El primer artículo, titulado *Assessment of Poisson, Probit and Linear Models for Genetic Analysis of Presence and Number of Black Spots in Corriedale Sheep*, constituye el segundo

capítulo de esta tesis que se denomina *Model Comparison for Analysis of Black Spots in Sheep*. En este artículo, aceptado para publicar en el Journal of Animal Breeding and Genetics, se evaluaron modelos alternativos para el análisis genético de la presencia y número de lunares. Cuatro modelos fueron estudiados: modelo Probit y modelo lineal para la presencia de lunares, y modelo Poisson y modelo lineal para el número de lunares. Se abordó la estimación de parámetros genéticos y se estudió la bondad de ajuste y la predicción de efectos aleatorios para cada modelo. Además, se comparó la capacidad de predicción de los modelos mediante validación cruzada. El segundo artículo de esta tesis se titula *Análisis de la expresión génica en lunares negros y piel blanca en ovinos mediante microarreglos* y constituye el tercer capítulo de esta tesis que se denomina *Expresión génica en lunares negros y piel blanca*. En este artículo, escrito según las instrucciones de la Revista Agrocienza, se estudió mediante microarreglos la expresión génica a nivel de lunares negros y piel blanca de manera de identificar posibles genes responsables de la aparición de esta característica indeseable en ovinos productores de lana blanca. En el cuarto capítulo de esta tesis se presenta una discusión general y conclusiones globales del problema aquí estudiado.

2. MODEL COMPARISON FOR ANALYSIS OF BLACK SPOTS IN SHEEP

Assessment of Poisson, Probit and Linear Models for Genetic Analysis of Presence and Number of Black Spots in Corriedale Sheep

Model Comparison for Analysis of Black Spots in Sheep

F. Peñaricano¹, J. I. Urioste¹, H. Naya^{1,2}, G. de los Campos³, and D. Gianola^{3,4}

¹Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay.

²Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay.

³Department of Animal Sciences, University of Wisconsin, Madison, WI, USA.

⁴Department of Biostatistics and Medical Informatics, University of Wisconsin, Madison, WI, USA.

Correspondence: F. Peñaricano, Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Av. Garzón 780, Montevideo, Uruguay. Tel: (+5982)3559636; Fax: (+5982)3543460. E-mail: panchomanya@gmail.com

Keywords: skin spot, pigmented wool, genetic parameters, model comparison.

2.1 SUMMARY

Black skin spots are associated with pigmented fibers in wool, an important quality fault. Our objective was to assess alternative models for genetic analysis of presence (BINBS) and number (NUMBS) of black spots in Corriedale sheep. During 2002-2008, 5624 records from 2839 animals in two flocks, aged 1 through 6 years, were taken at shearing. Four models were considered: linear and Probit for BINBS and linear and Poisson for NUMBS. All models included flock-year and age as fixed effects and animal and permanent environmental as random effects. Models were fitted to the whole data set and were also compared based on their predictive ability in cross-validation. Estimates of heritability ranged from 0.154 to 0.230 for BINBS and 0.269 to 0.474 for NUMBS. For BINBS, the Probit model fitted slightly better to the data than the linear model. Predictions of random effects from these models were highly correlated and both models exhibited similar predictive ability. For NUMBS, the Poisson model, with a residual term to account for overdispersion, performed better than the linear model in goodness of fit and predictive ability. Predictions of random effects from the Poisson model were more strongly correlated with those from BINBS models than those from the linear model. Overall, the use of Probit or linear models for BINBS and of a Poisson model with a residual for NUMBS seems a reasonable choice for genetic selection purposes in Corriedale sheep.

2.2 INTRODUCTION

The presence of dark fibers in white wool limits the flexibility of end-use, causing severe economic losses (Fleet *et al.* 2008). In Corriedale sheep, even tops produced following a strict protocol aimed at minimizing dark fiber contamination (especially urine stain and faeces) show a high occurrence of pigmented black fibers, these probably having a genetic background (Mendoza *et al.* 2001).

While genetic selection should ideally focus on reducing the amount of pigmented fibers in Corriedale wool, direct selection against presence of pigmented fibers is expensive and cumbersome, because it requires elaborate laboratory techniques for measuring the fleece of each animal. An alternative approach is the use of indirect selection via correlated traits. The number of black skin spots in the fleece area of the animals may be a useful indicator trait, for several reasons. First, preliminary results suggest that the presence of black spots is a moderately heritable trait and that it has a positive genetic correlation with the presence of pigmented fibers in the fleece (Urioste *et al.* 2008a). Second, spot scoring is less subjective than for other candidate measures such as the percentage of spot area with pigmented fibres (Fleet & Forrest 1984; Fleet & Lush 1997). Third, spots can be assessed easily and quickly and a nation-wide recording system would be straightforward to implement.

Previous studies in Romney sheep (Enns & Nicoll 2002) have addressed the occurrence of black wool spots at weaning and at yearling age. These authors used a threshold model for a binary response variable (defined as presence or absence of pigmented spots) and their largest heritability estimates were 0.070 (0.018) and 0.072 (0.014) for black wool spots at weaning and yearling, respectively. However, defining the trait as presence or absence of black spots (BINBS) may involve an important loss of information since the number of black spots (NUMBS) and the fleece area covered by them may vary greatly between animals. In this study, we considered both BINBS and NUMBS as response variables.

Several probability models can be used for describing the presence or the number of black spots in sheep. For binary outcomes such as BINBS, the Bernoulli distribution parameterized either using a probit or logit link, is a natural approach. For counting responses such as NUMBS, several alternatives are available, e.g., Poisson, linear, or ordinal threshold models. Naya *et al.* (2008) compared the performance of Poisson and zero-inflated Poisson (ZIP) models for analysis of number of black spots in Corriedale sheep. These authors also considered extensions of the standard Poisson and ZIP models obtained by including a residual term at the regression level. Both Poisson and ZIP models with a residual performed better than their counterparts without such residual, and parameter estimates were similar for both models.

The objective of this study was to assess alternative models for genetic analysis of BINBS (Probit and linear) and NUMBS (Poisson and linear). Models were compared based on their predictive ability assessed using a 3-fold cross-validation. Parameter estimates, goodness of fit and predictions of random effects from each of these models were also targeted in the comparison.

2.3 MATERIALS AND METHODS

Data

Data consisted of 5624 records of number of black spots in the fleece area from 2839 animals. Records were collected by close inspection at shearing over seven years (2002-2008) from two experimental flocks belonging to the Universidad de la República, Uruguay. Genetic ties were through two rams with progeny in both flocks each year. The pedigree file included 3792 animals.

Statistical Models

Two traits were studied: presence (BINBS) and number (NUMBS) of black spots in the fleece area, and different models were considered for each of these traits: linear and Probit for BINBS and linear and Poisson for NUMBS. This section describes each of these models. For ease of presentation parameters are denoted using a generic notation; however, in the data analysis all unknowns were response/model specific.

All models included a linear predictor, $\eta_{ijkl} = \beta_o + FY_i + Ag_j + a_k + pe_l$, where: η_{ijkl} is a function of the expected NUMBS or BINBS in the fleece area of the $ijkl^{th}$ record; β_o is an intercept; FY_i is the fixed effect of the i^{th} flock-year class ($i = 1, 2, \dots, 14$); Ag_j is the fixed effect of the j^{th} class of age at shearing, in years ($j = 1, 2, \dots, 6$); a_k is the random additive genetic effect of the k^{th} animal ($k = 1, 2, \dots, 3792$) and pe_l is the permanent environmental effect of the l^{th} animal with records ($l = 1, 2, \dots, 2839$).

Random effects were assumed to follow the multivariate normal distribution,

$$\begin{pmatrix} \mathbf{a} \\ \mathbf{pe} \end{pmatrix} \Big| \sigma_a^2, \sigma_{pe}^2 \sim N \left[\mathbf{0}, \begin{pmatrix} \mathbf{A}\sigma_a^2 & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{I}\sigma_{pe}^2 \end{pmatrix} \right]$$

where \mathbf{a} and \mathbf{pe} are the vectors of additive and permanent environmental effects, respectively; σ_a^2 and σ_{pe}^2 are the additive genetic and permanent environmental effect variances, respectively; \mathbf{A} represents the matrix of additive relationships between animals in the pedigree (3792×3792) and \mathbf{I} is an identity matrix of order 2839. Animal and permanent environmental effects were assumed to be independent of residuals in the models.

Probit Model for BINBS. The Probit model (e.g., Gianola 1982; Gianola & Foulley 1983) describes the observable outcome (BINBS) using an underlying linear model, $z_{ijklm} = \eta_{ijkl} + e_m$, where e_m are independent and identically distributed standard normal random variables. The classification rule is:

$BINBS_{ijklm} = \{1 \text{ if } z_{ijklm} > 0 ; 0 \text{ otherwise}\}$. Therefore, the conditional probability of the presence of a black spot is $P(BINBS_{ijklm} = 1 | \eta_{ijkl}) = \Phi(\eta_{ijkl})$, where $\Phi(\cdot)$ is the standard normal cumulative distribution function. Using this, the likelihood function becomes:

$$p\{\mathbf{BINBS} | \boldsymbol{\eta}\} = \prod_{ijklm} \Phi(\eta_{ijkl})^{BINBS_{ijklm}} [1 - \Phi(\eta_{ijkl})]^{1 - BINBS_{ijklm}}, \text{ where } \mathbf{BINBS} = \{BINBS_{ijklm}\}$$

and $\boldsymbol{\eta} = \{\eta_{ijkl}\}$ are vectors of the binary outcomes and the linear predictors, respectively.

Poisson Model for NUMBS. The standard Poisson model is indexed by a single parameter (λ) which represents the expected value and the variance of the random variable. The introduction of a residual allows modeling individual differences in propensity and accommodates overdispersion. The mixed Poisson model for NUMBS assumed that the number of black spots in the fleece area of an animal, given the fixed and random effects, followed a Poisson distribution with parameter λ_{ijklm} , where: $\log(\lambda_{ijklm}) = \eta_{ijkl} + e_{ijklm}$, and e_{ijklm} are independent and identically distributed as $e_{ijklm} \sim N(0, \sigma_e^2)$.

Therefore, the likelihood function becomes, $p\{\mathbf{NUMBS} | \boldsymbol{\lambda}\} = \prod_{ijklm} \frac{\lambda_{ijklm}^{NUMBS_{ijklm}} \exp\{-\lambda_{ijklm}\}}{NUMBS_{ijklm}!}$,

where $\mathbf{NUMBS} = \{NUMBS_{ijklm}\}$ and $\boldsymbol{\lambda} = \{\lambda_{ijklm}\}$ are vectors of the counting outcomes and of parameters of the Poisson model, respectively.

Linear Model. Linear mixed models were fitted to BINBS and NUMBS. Linear models are obtained by adding a Gaussian residual to the linear predictor, that is, $y_{ijklm} = \eta_{ijkl} + e_{ijklm}$ where y_{ijklm} is either $BINBS_{ijklm}$ or $NUMBS_{ijklm}$ and e_{ijklm} are independent and identically distributed Gaussian random variables with null mean and variance σ_e^2 . The likelihood function for each of these responses is

$$p\{\mathbf{BINBS}|\boldsymbol{\eta}\} = \prod_{ijklm} N\left(BINBS_{ijklm} \mid \eta_{ijkl}, \sigma_e^2\right) \text{ and,}$$

$$p\{\mathbf{NUMBS}|\boldsymbol{\eta}\} = \prod_{ijklm} N\left(NUMBS_{ijklm} \mid \eta_{ijkl}, \sigma_e^2\right), \text{ respectively.}$$

Inference

All models were implemented in a Bayesian framework. Following Bayes rule, the posterior density of model unknowns is $p(\boldsymbol{\theta}|y) \propto p(y|\boldsymbol{\theta})p(\boldsymbol{\theta})$ where:

$\boldsymbol{\theta} = \{\beta_0, \mathbf{F}\mathbf{Y}, \mathbf{A}\mathbf{g}, \mathbf{a}, \mathbf{pe}, \sigma_a^2, \sigma_{pe}^2, \sigma_e^2\}$ is the collection of model unknowns, $p(\boldsymbol{\theta})$ is the

joint prior distribution of $\boldsymbol{\theta}$, $p(y|\boldsymbol{\theta})$ is the conditional distribution of the data (a

likelihood function when viewed as a function of $\boldsymbol{\theta}$) and $p(\boldsymbol{\theta}|y)$ is the posterior

distribution of model unknowns. The joint prior distribution of model unknown was as

follows

$$p(\boldsymbol{\theta}) \propto p(\mathbf{a}|\sigma_a^2) p(\mathbf{pe}|\sigma_{pe}^2) p(\sigma_a^2) p(\sigma_{pe}^2) p(\sigma_e^2) \\ N(\mathbf{a}|\mathbf{0}, \mathbf{A}\sigma_a^2) N(\mathbf{pe}|\mathbf{0}, \mathbf{I}\sigma_{pe}^2) \chi^{-2}(\sigma_a^2 | df_a, S_a) \chi^{-2}(\sigma_{pe}^2 | df_{pe}, S_{pe}) \chi^{-2}(\sigma_e^2 | df_e, S_e)$$

where $\chi^{-2}(\cdot|df.,S.)$ is a scaled inverse chi-square distribution with degrees of freedom $df.$ and scale parameter $S.$

Implementation

The fully conditional posterior distribution of these models does not have a closed form; however, samples can be obtained using a Gibbs sampler (Sorensen & Gianola 2002). For the Poisson and linear models, samples were obtained using the MCMCglmm package (Hadfield 2010) which is available in the R language/environment (R Development Core Team 2009). Samples from the posterior distribution of the Probit models were obtained using the thrgibbs1f90 software, kindly provided by Shogo Tsuruta, University of Georgia, USA.

Inferences for each of the models were based on 800,000 samples obtained after discarding 200,000 samples as burn in. A thinning interval of 200 was used for computing features of the posterior distribution. Convergence diagnostics and statistical and graphical analysis of Markov chain Monte Carlo sampling output were carried out with the BOA package (Smith 2007) of the R language/environment (R Development Core Team 2009). The method of Raftery and Lewis (Raftery & Lewis 1992) and visual inspection of trace plots were used to assess convergence of the MCMC output.

Genetic Parameter Estimates

In linear and Poisson models, heritability (h^2) and repeatability (R) can be evaluated in the observable and log-scale, respectively, using standard formulae:

$$h^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_{pe}^2 + \sigma_e^2}, \quad R = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_{pe}^2}{\sigma_a^2 + \sigma_{pe}^2 + \sigma_e^2}.$$

In the Probit model h^2 and R can be evaluated at the liability scale using the above formulae with $\sigma_e^2 = 1$.

Model Comparison

Goodness of fit of each of the models was assessed by computing the mean squared error statistic (MSE), $MSE = n^{-1} \sum_{ijklm} (y_{ijklm} - \hat{y}_{ijkl})^2$, where \hat{y}_{ijkl} is the conditional expectation function evaluated at the posterior mean of model unknowns, y_{ijklm} is the corresponding value of the response (either BINBS or NUMBS) and n is the number of observations. The conditional expectation function of the linear, Probit and Poisson models are: $\hat{y}_{ijkl} = \hat{\eta}_{ijkl}$, $\hat{y}_{ijkl} = \Phi(\hat{\eta}_{ijkl})$ and,

$$\hat{y}_{ijkl} = \exp(\hat{\eta}_{ijkl}) \int \exp(e_{ijklm}) N(e_{ijklm} | 0, \hat{\sigma}_e^2) \partial e_{ijklm} = \exp\left(\hat{\eta}_{ijkl} + \frac{1}{2} \hat{\sigma}_e^2\right), \text{ respectively.}$$

In addition, Pearson's correlation (COR) between \hat{y}_{ijkl} and y_{ijklm} was also obtained.

Model comparison also involved assessing Spearman rank correlations between predictions of random effects obtained with different models. Random effects were predicted using the estimated posterior mean of those effects.

Predictive ability was evaluated using a 3-fold cross-validation (McCarthy 1976; Picard & Cook 1984). Data were split randomly into 3 disjoint folds $f = \{1,2,3\}$ and the mean-

squared predictive error was defined as: $MSEP = n^{-1} \sum_f \sum_{(ijklm) \in f} (y_{ijklm} - \hat{y}_{ijklm}^{-f})^2$, where \hat{y}_{ijklm}^{-f}

is a conditional expectation function evaluated at the posterior mean of model unknowns obtained when the data in fold f was excluded from the analysis.

2.4 RESULTS AND DISCUSSION

Descriptive Statistics

Fifty eight percent of the animals had one record, 15% had two records, 12% had three records and the rest had more than three records (up to six per animal). Table 1 shows the percentage of animals with black spots and the mean and standard deviation of NUMBS per age at shearing. The percentage of animals with black spots and the number of black spots per animal increased markedly with age. Other authors reported the same relationship between black spots and age of the animal in the Merino and Corriedale breeds (Fleet 1996; Fleet 2006; Urioste *et al.* 2008b). Fleet (2006) showed that twice yearly shearing increased the development of pigmented spots after 2 years of treatment.

This result, with the age-related trends observed here, are consistent with the idea that exposure of the skin to ultraviolet light (e.g. following shearing) increases the risk of developing black spots in the fleece area (Forrest & Fleet 1986).

Table 1. Percentage of animals with black spots (BS), mean and standard deviation (SD) of number of black spots (NUMBS) by class of age at shearing.

	Age (years)					
	1	2	3	4	5	6
Animal with BS (%)	33	56	71	76	83	93
Mean NUMBS	0.6	1.6	3.3	4.6	6.7	10.0
SD NUMBS	1.2	2.5	4.5	6.3	7.7	11.8

Estimates of Variance and Genetic Parameters

Estimates of the mean and quantiles (0.025 and 0.975) of the posterior distribution of variance components and of genetic parameters under each model are displayed in Table 2. In the linear models, variance parameters pertain to the observable scale, in the Poisson model for NUMBS, variance components describe variability in the log scale, and in the Probit model variance parameters are in the liability scale. Thus, variance components are not directly comparable between models. A more meaningful comparison can be based on ratios between variances components, e.g., h^2 and R .

Heritability estimates were low to moderate for presence of black spots (0.154 and 0.230 for linear and Probit models, respectively) and moderate to high for number of black spots (0.269 and 0.474 for linear and Poisson models, respectively). Heritability estimates were larger than those reported by Enns & Nicoll (2002) in Romney sheep. This study only addressed the presence of black wool spots at weaning and at yearling ages. Naya *et al.* (2008) reported estimates of the posterior median of heritability for NUMBS of 0.246 and 0.166, for zero inflated Poisson and Poisson, models respectively; however, the distribution was very skewed, presumably because of the few rams used.

Repeatability estimates were moderate for BINBS (0.341 and 0.495 for linear and Probit models, respectively) and moderate to high for NUMBS (0.351 and 0.747 for linear and Poisson models, respectively). To our account this is the first study reporting estimates of repeatability for these traits.

Heritability and repeatability were estimated with a reasonable precision. Reliable parameter estimates are needed for defining a breeding strategy for these traits. The magnitude of the estimates of heritability suggests an important scope for genetic selection. Moreover, the magnitude of the estimates of repeatability suggests that one record would suffice for making accurate selection decisions.

Table 2. Estimates of mean and quantiles (0.025, 0.975) of the posterior distribution of variance components and genetic parameters by response (presence or absence of black spots, BINBS, and number of black spots, NUMBS) and model (Linear, Probit and Poisson).

	<i>BINBS</i>		<i>NUMBS</i>	
	<i>Linear</i>	<i>Probit</i>	<i>Linear</i>	<i>Poisson</i>
σ_a^2	0.029 (0.023, 0.037)	0.458 (0.291, 0.654)	10.13 (8.03, 12.11)	0.719 (0.523, 0.921)
σ_{pe}^2	0.036 (0.028, 0.043)	0.530 (0.338, 0.759)	3.09 (1.93, 4.57)	0.412 (0.254, 0.586)
σ_e^2	0.125 (0.119, 0.131)	1.000	24.42 (23.38, 25.51)	0.382 (0.341, 0.424)
h^2	0.154 (0.122, 0.189)	0.230 (0.150, 0.316)	0.269 (0.218, 0.313)	0.474 (0.354, 0.587)
R	0.341 (0.309, 0.375)	0.495 (0.442, 0.546)	0.351 (0.322, 0.379)	0.747 (0.714, 0.778)

σ_a^2 = additive variance; σ_{pe}^2 = permanent environmental variance; σ_e^2 = residual variance; h^2 =

Heritability; R = Repeatability.

Goodness of Fit

Table 3 shows the mean squared error (MSE) and the correlation (COR) between observed and fitted values. For BINBS, the Probit model gave a slightly smaller MSE than the linear model (0.088 versus 0.097 for Probit and linear, respectively); however, the COR between observed and fitted values was similar (0.80 and 0.79). For NUMBS,

the Poisson model fitted the data markedly better than the linear model both in terms of MSE and COR (13.88 versus 19.24 and 0.86 versus 0.81, respectively). Fitting a Poisson model with a residual term allowed capturing overdispersion, a feature that may arise with count data, resulting in much better performance than the Poisson model without such residual (Naya *et al.* 2008) or the linear model.

Table 3. Mean squared error (MSE) and correlation (COR) between observed and fitted values by response (presence or absence of black spots, BINBS, and number of black spots, NUMBS) and model (Linear, Probit and Poisson).

	<i>BINBS</i>		<i>NUMBS</i>	
	<i>Linear</i>	<i>Probit</i>	<i>Linear</i>	<i>Poisson</i>
<i>MSE</i>	0.097	0.088	19.24	13.88
<i>COR</i>	0.79	0.80	0.81	0.86

Prediction of Random Effects

From a breeder's perspective, a central question is whether predictions of genetic values from these models yield different breeding decisions (i.e., the extent of re-ranking). The Spearman rank correlations between random effect predictions (animal and permanent environmental effects) across models are displayed in Table 4. The correlations between predictions from binary response models were the largest (0.984 and 0.986 for breeding values and permanent environmental effects, respectively), whereas predictions from the

Poisson model were more correlated with those of models for BINBS (between 0.805 and 0.832) than with predictions from the linear model for the same trait (between 0.733 and 0.758). The correlations between predictions from the linear model for NUMBS and those from models for BINBS were the lowest (between 0.415 and 0.501). Moreover, the Spearman rank correlations between rams' breeding values were also obtained. The correlations were 0.986 between BINBS models and 0.510 between NUMBS models. Across response variables, the correlations were 0.889 and 0.901 between Poisson model and BINBS models (linear model and probit model, respectively) and only 0.341 and 0.391 between the linear model for NUMBS and linear and Probit models for BINBS. Overall, the linear model for NUMBS fitted the data poorly and this led to important differences in animal rankings compared to the other models discussed.

Table 4. Spearman rank correlations between predictions of random effects (additive effects above diagonal, permanent environmental effects below diagonal) obtained from different models (Linear, Probit and Poisson) fitted to different response variables (presence or absence of black spots, BINBS, and number of black spots, NUMBS).

<i>Model</i>	<i>Linear (BINBS)</i>	<i>Probit</i>	<i>Linear (NUMBS)</i>	<i>Poisson</i>
<i>Linear (BINBS)</i>		0.984	0.501	0.832
<i>Probit</i>	0.986		0.447	0.825
<i>Linear (NUMBS)</i>	0.415	0.437		0.758
<i>Poisson</i>	0.813	0.805	0.733	

Predictive Ability in Cross-Validation

The mean squared errors of prediction (MSEP) for the 3-fold cross-validation are shown in Table 5. In addition to overall MSEP, we report MSEP by number of records per animal available in the training set (N). Probit and linear models for BINBS exhibited similar predictive ability. In models for BINBS, MSEP decreased as N increased; this is expected because the amount of information available for predicting random effects increases as N does. The highest MSEP was observed when there were no records of the animal in the training fold so prediction was entirely based on the pedigree structure.

Using simulations, Meijering & Gianola (1985) found that models for categorical data performed better than the linear model only when heritability was moderate to high and the incidence of the binary trait in the population was equal or less than 10 %. In our dataset, 33 % of one-year old animals showed black spots and the incidence of the trait increased markedly with age. Therefore, our results are consistent with those of reported by these authors. Failure of models for categorical data to outperform linear models for analyzing discrete livestock data has been observed in other empirical studies (e.g., Olesen *et al.* 1994; Matos *et al.* 1997; Vázquez *et al.* 2009; Pérez-Cabal *et al.* 2009).

The sample variance of the counts of black spots increased with the age of the animal (and therefore with the numbers of records per animal, see Table 1) and this has important consequences on the results of MSEP for the NUMBS models. Overall, the Poisson model had a better predictive ability than the linear model. Unexpectedly, the

smallest MSEP was observed when $N=0$. Most animals, with only one record in the data set, are one year old and, therefore, have the smallest counts of black spots with the minimum variance. The highest MSEP was observed for animals with more than two records; these animals have higher counts of black spots and the variance of this variable increased markedly with age. Other studies also compared the performance of linear and classical Poisson models, in terms of goodness of fit and predictive ability, and obtained no difference between these models (Pérez-Enciso *et al.* 1993) or a slightly better performance of the linear model (Olesen *et al.* 1994; Matos *et al.* 1997; Pérez-Cabal *et al.* 2009; Vázquez *et al.* 2009). However, none of these studies used a Poisson model with a residual term; here, using this model, we found that the Poisson specification outperformed the linear model. Another alternative is to deal with the increment of the variance of counts with age using linear models with heterogeneous residual variances (Gianola 1986).

The predictive ability of each model was also evaluated for prediction of the first record in the life of an animal (i.e., animals of one year of age without records in the training set). This kind of prediction, entirely based on the pedigree structure, has a large error associated with it but it is pertinent for selection purposes. Following Vázquez *et al.* (2009), for this situation we display the distribution of the estimated expected BINBS and NUMBS for each model when the first count observed was zero or greater than zero (Figure 1). This graphical analysis allows assessing how well these models can discriminate between animals with and without black spot in the testing set. The

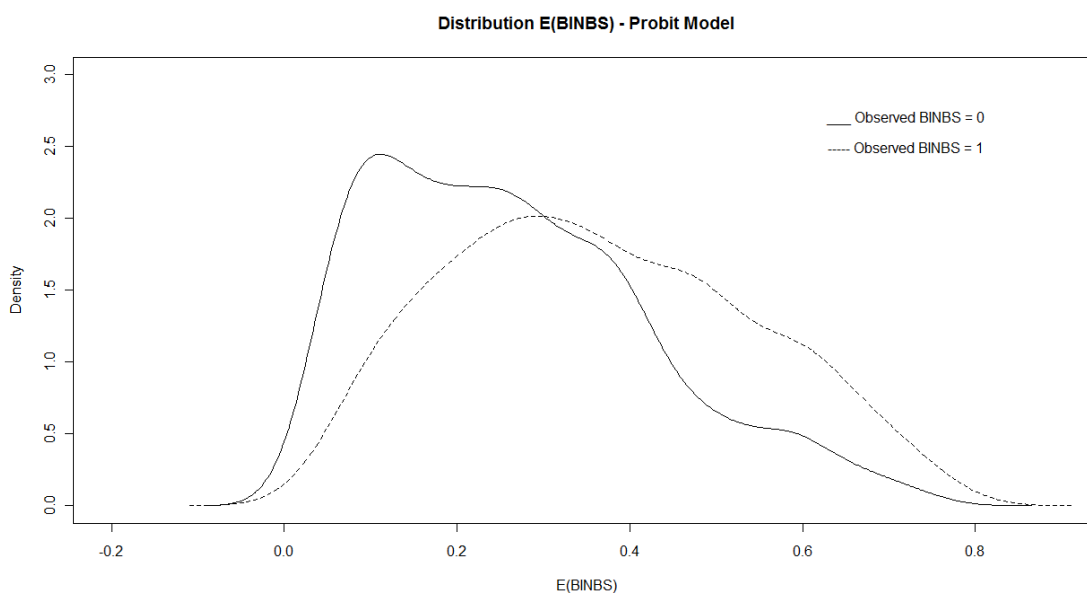
differences between the medians of the two empirical distributions were 0.11 for the Probit model and 0.08 for the linear model. For NUMBS, the Poisson model showed differences between both distributions (median difference was 0.11); however, the linear model for NUMBS did not exhibit a difference in the median of both empirical distributions. Overall, Probit and linear models for BINBS exhibited similar predictive ability for animal's first record. For NUMBS, the Poisson model had better predictive ability than that of the linear model.

Table 5. Mean squared error of prediction (MSEP) for a 3-fold cross-validation study by response (presence or absence of black spots, BINBS, and number of black spots, NUMBS) and model (Linear, Probit and Poisson). N represents the number of records of the animal that appears in the training fold.

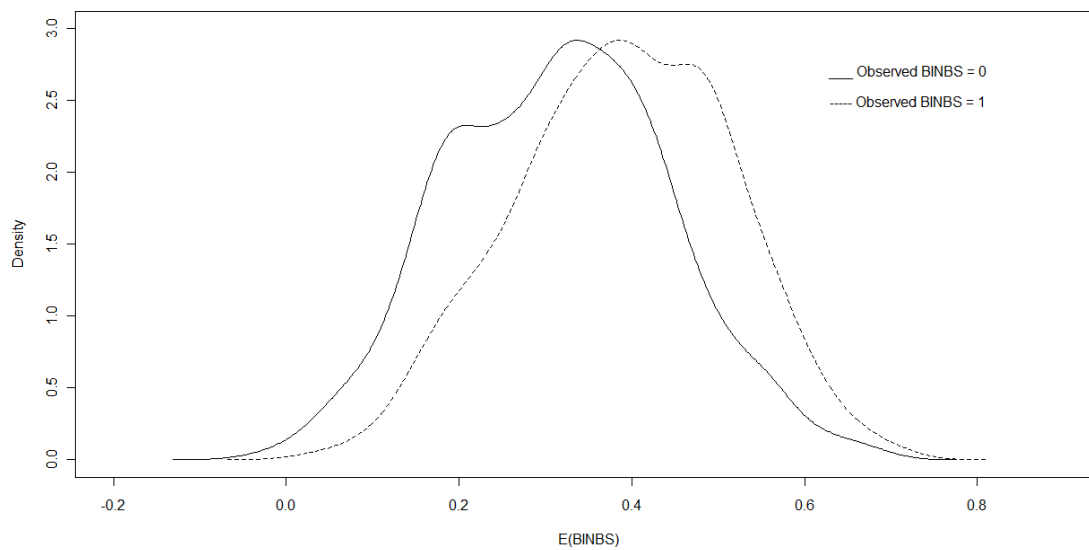
	<i>BINBS</i>		<i>NUMBS</i>	
	<i>Linear</i>	<i>Probit</i>	<i>Linear</i>	<i>Poisson</i>
<i>Total</i>	0.169	0.168	31.50	30.77
<i>N = 0</i>	0.198	0.199	20.06	19.68
<i>N = 1</i>	0.172	0.173	32.25	28.92
<i>N = 2</i>	0.153	0.150	30.65	28.79
<i>N > 2</i>	0.130	0.126	51.83	54.11

Estimates from a Poisson model are more difficult to interpret and, more importantly, including a Poisson model in multiple-trait evaluations is more difficult. In practice the easiest way to implement a genetic evaluation for black spots is to record its presence or absence and to analyze the trait with either linear or Probit models. These models can be easily implemented and the predicted breeding values obtained with them are highly correlated with each other and with those obtained for NUMBS with a Poisson model.

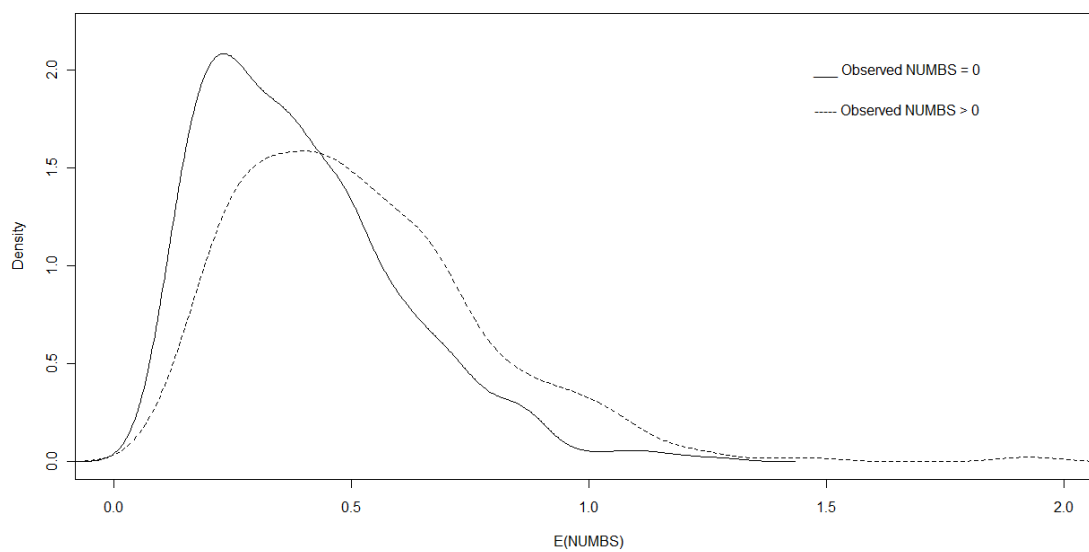
Figure 1. Empirical distribution of the estimated expected of presence or absence of black spots, BINBS, and number of black spots, NUMBS, for the first record of an animal under each model (Linear, Probit and Poisson) and two scenarios: observed BINBS and NUMBS were zero or greater than zero.

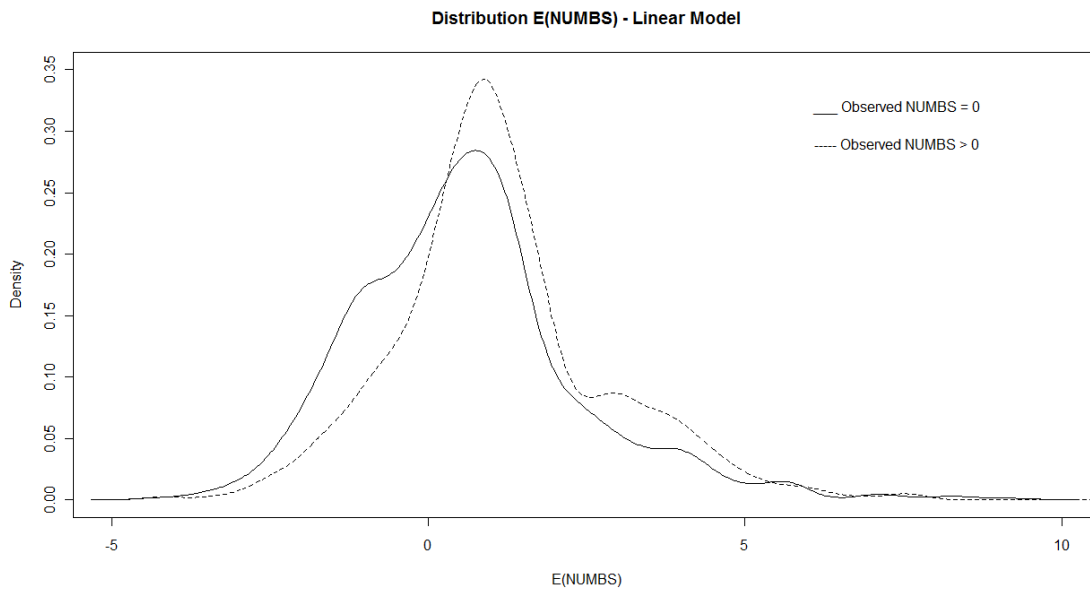


Distribution E(BINBS) - Linear Model



Distribution E(NUMBS) - Poisson Model





2.5 CONCLUSIONS

Presence and number of black spots in the fleece area of Corriedale sheep seem to be moderately heritable traits. For presence of black spots, the Probit model had a slightly better goodness of fit than the linear model. Random effects predictions of models were highly correlated and the cross-validation study suggested a similar overall predictive performance for both models. These results suggest that both models could be useful for genetic selection purposes.

For number of black spots, a Poisson model with random residual performed better than a linear model in terms of goodness of fit and predictive ability. Random effect predictions of the Poisson model were more correlated with BINBS models than with

the linear model. Fitting models with heterogeneous variance could be an interesting alternative and this requires further research.

2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Ana Inés Vázquez and Guilherme J.M. Rosa for helpful discussions. This research was supported by grants PDT35-02 from Programa de Desarrollo Tecnológico (Uruguay) and FCE2007_547 and BE_MOV_2009_1060 from Agencia Nacional de Investigación e Innovación (Uruguay).

2.7 REFERENCES

Enns R.M., Nicoll G.B. (2002) Incidence and heritability of black wool spots in Romney sheep. *N. Z. J. Agric. Res.*, **45**, 67–70.

Fleet M.R. (1996) Pigmentation types - understanding the heritability and importance. *Wool Tech. Sheep Breed.*, **44**, 264–280.

Fleet M.R. (2006) Development of black pigmented skin spots and pigmented wool fibres in a Merino flock – causes, field observations, and wool measurement. *Aust. J. Agric. Res.*, **57**, 751–760.

Fleet M.R., Forrest J.W. (1984) The occurrence of spots of pigmented skin and pigmented wool fibres in adult Merino sheep. *Wool Tech. Sheep Breed.*, **32**, 83–90.

Fleet M.R., Lush B. (1997) Sire effects on visible pigmentation in a Corriedale flock. *Wool Tech. Sheep Breed.*, **45**, 167–173.

Fleet M.R., Foulds R.A., Mahar T.J., Turk J.A. (2008) Relationship between pigmented fibre in raw and processed wool when other dark fibre is controlled - a review. *Int. J. Sheep Wool Sci.*, **56**, 40–59.

Forrest J.W., Fleet M.R. (1986) Pigmented spots in the wool-bearing skin induced by ultraviolet light. *Aust. J. Biol. Sci.*, **39**, 123–136.

Gianola D. (1982) Theory and analysis of threshold characters. *J. Anim. Sci.*, **54**, 1079–1096.

Gianola D. (1986) On selection criteria and estimation of parameters when the variance is heterogeneous. *Theor. Appl. Genet.*, **72**, 671–677.

Gianola D., Foulley J.L. (1983) Sire evaluation for ordered categorical data with a threshold model. *Genet. Sel. Evol.*, **15**, 201–224.

Hadfield J. (2010) MCMC Methods for Multi-Response Generalized Linear Mixed Models: The MCMCglmm R Package. *J. Stat. Softw.*, **33**, 1–22.

Matos C.A.P., Thomas D.L., Gianola D., Pérez-Enciso M., Young L.D. (1997) Genetic analysis of discrete reproductive traits in sheep using linear and nonlinear models: II. Goodness of fit and predictive ability. *J. Anim. Sci.*, **75**, 88–94.

McCarthy P.J. (1976) The use of balanced half-sample replication in cross-validation studies. *J. Am. Stat. Assoc.*, **71**, 596–604.

Meijering A., Gianola D. (1985) Linear versus nonlinear methods of sire evaluation for categorical traits: A simulation study. *Genet. Sel. Evol.*, **17**, 115–132.

Mendoza J., Cardellino R., Maggiolo J., Garín M. (2001) Fibras coloreadas en Corriedale. *Lananoticias*, **129**, 37–40.

Naya H., Urioste J.I., Chang Y.M., Rodriguez-Motta M., Kremer R., Gianola D. (2008). A comparison between Poisson and zero-inflated Poisson regression models with and application to number of black spots in Corriedale sheep. *Genet. Sel. Evol.*, **40**, 379–394.

Olesen I., Pérez-Enciso M., Gianola D., Thomas D.L. (1994) A comparison of normal and nonnormal mixed models for number lambs born in Norwegian sheep. *J. Anim. Sci.*, **72**, 1166–1173.

Pérez-Cabal M.A., de los Campos G., Vázquez A.I., Gianola D., Rosa G.J.M., Weigel K.A., Alenda R. (2009) Genetic evaluation of susceptibility to clinical mastitis in Spanish Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, **92**, 3472–3480.

Pérez-Enciso M., Tempelman R.J., Gianola D. (1993) A comparison between linear and Poisson mixed models for litter size in Iberian pigs. *Livest. Prod. Sci.*, **35**, 303–316.

Picard R.R., Cook R.D. (1984) Cross-validation of regression models. *J. Am. Stat. Assoc.*, **79**, 575–583.

R Development Core Team. (2009) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>. Accessed Nov. 2009.

Raftery A.E., Lewis S.M. (1992) Comment: One long run with diagnostics: implementation strategies for Markov Chain Monte Carlo. *Stat. Sci.*, **7**, 493–497.

Smith B.J. (2007) Boa: An R Package for MCMC Output Convergence Assessment and Posterior Inference. *J. Stat. Softw.*, **21**, 1–37.

Sorensen D., Gianola D. (2002) *Likelihood, Bayesian, and MCMC Methods in Quantitative Genetics*. Springer, New York, NY, USA.

Urioste J.I., Peñagaricano F., López R., Lafuente C., Laporta J., Naya H., Sienna I., Kremer R. (2008a) Dark skin spots and pigmentation scores in mouth-lips as indicator traits for presence of pigmented fibres in Corriedale fleeces. In: Proceedings of the 10th World Conference on Animal Production, 23–28 November 2008, Cape Town, South Africa.

Urioste J.I., Peñagaricano F., López R., Laporta J., Llana F., Lafuente C., Kremer, R. (2008b) Incidence of dark skin spots and pigmentation in commercial Corriedale flocks. In: Proceedings of the 10th World Conference on Animal Production, 23–28 November 2008, Cape Town, South Africa.

Vázquez A.I., Gianola D., Bates D., Weigel K.A., Heringstad B. (2009) Assessment of Poisson, logit, and linear models for genetic analysis of clinical mastitis in Norwegian Red cows. *J. Dairy Sci.*, **92**, 739–748.

3. EXPRESIÓN GÉNICA EN LUNARES NEGROS Y PIEL BLANCA

Análisis de la expresión génica en lunares negros y piel blanca en ovinos mediante microarreglos

F. Peñagaricano¹, P. Zorrilla², H. Naya^{1,3}, C. Robello² y J.I. Urioste¹

¹Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay.

²Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay.

³Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay.

Correspondencia: F. Peñagaricano, Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Av. Garzón 780, Montevideo, Uruguay. Tel: (+5982)3559636; Fax: (+5982)3543460. E-mail: panchomanya@gmail.com

Expresión génica en lunares negros y piel blanca en ovinos

3.1 RESUMEN

Análisis de la expresión génica en lunares negros y piel blanca en ovinos mediante microarreglo. Los ovinos de lana blanca carecen de melanocitos en la piel. Por mecanismos desconocidos, algunos animales nacen y otros desarrollan con el tiempo, lunares en la piel que pueden producir fibras pigmentadas (FP). La presencia de FP en la lana blanca disminuye sensiblemente su calidad. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión génica en lunares (con y sin FP) y piel blanca mediante microarreglos de manera de identificar posibles genes involucrados en el desarrollo de esta característica. Se utilizaron 5 ovejas no emparentadas de la raza Corriedale y para cada animal se realizaron las tres comparaciones posibles entre los tres tejidos de interés. La mayoría de los genes propuestos por la bibliografía no mostraron diferencias en su expresión (ASIP, MC1R y *c-kit*). Muchos de los genes expresados en forma diferencial ($p < 0.005$), por ejemplo *c-fos*, KLF4 y UFC1, cumplen funciones biológicas que los hacen plausibles de estar implicados en la formación de lunares. La expresión de los genes *c-fos* y KLF4, factores de transcripción implicados en la respuesta celular a factores externos como la luz ultravioleta, fue validada mediante PCR cuantitativo. Identificar y caracterizar los genes involucrados en la formación de los lunares posibilitará discernir los mecanismos moleculares que subyacen este fenómeno; un primer paso hacia el desarrollo de herramientas moleculares que asistan la selección en contra de la presencia de FP.

Palabras clave: fibras pigmentadas, genes candidatos, raza Corriedale

3.2 SUMMARY

Analysis of Gene Expression in Black Spots and White Skin in Sheep Using Microarrays. The white wool sheep lack melanocytes in the skin. For unknown reasons, some animals are born and others develop with the time, black skin spots that can also produce pigmented fibers (PF). The presence of PF in the white wool decreases significantly the product quality. The aim of this work was to study gene expression in black spots (with and without PF) and white skin by microarray techniques, in order to identify possible genes involved in the development of this trait. Five unrelated Corriedale sheep were used and for each animal the three possible comparisons between the three tissues of interest were analyzed. Most of the genes proposed in the literature showed no expression difference (ASIP, MC1R and *c-kit*). Many of the differentially expressed genes ($p < 0.005$), for example *c-fos*, KLF4 and UFC1, fulfill biological functions that are plausible to be involved in the formation of black skin spots. The gene expression of *c-fos* and KLF4, transcription factors involved in the cellular response to external factors such as ultraviolet light, was validated by quantitative PCR. Identify and characterize the genes involved in the formation of black spots will allow to discern the molecular mechanisms underlying this phenomenon, a first step towards developing molecular tools to assist the selection against the presence of PF.

Keywords: pigmented fibers, candidate genes, Corriedale breed.

3.3 INTRODUCCIÓN

Los ovinos productores de lana blanca carecen de melanocitos (células derivadas de la cresta neural especializadas en la producción de melanina) en la piel al momento que se desarrollan los folículos de la fibra de lana y esta ausencia persiste generalmente en el animal adulto (Fleet *et al.*, 2004). Sin embargo y por mecanismos aún desconocidos, algunos animales nacen y la mayoría desarrolla con el tiempo, lunares en la piel que pueden además producir fibras de lana pigmentadas. La presencia de fibras pigmentadas disminuye severamente la calidad en la lana blanca ocasionando importantes pérdidas económicas (Fleet *et al.*, 2008).

A pesar de la relevancia que tiene la pigmentación en la calidad de la lana, solamente dos de los genes involucrados en este proceso, *melanocortin-1 receptor* (MC1R) y *agouti signalling peptide* (ASIP), han sido caracterizados a nivel molecular en el ovino. Ambos genes presentan diferentes variantes alélicas que han sido vinculadas con diferentes patrones de pigmentación en ovinos y también otros animales domésticos (Sponenberg, 1997; Klunland y Våge, 2000). Por ejemplo, una variante alélica del gen MC1R ha sido reportada como la responsable de generar el color negro con herencia dominante en el ovino (Våge *et al.*, 1999). En cuanto al gen ASIP, diferencias en su expresión génica han sido reportadas como la causa de generar el color negro con herencia recesiva en el ovino (Norris y Whan, 2008; Royo *et al.*, 2008). Ambos fenotipos son identificados fácilmente al momento del nacimiento del animal y no

presentan realmente mayores desafíos para incrementar la producción de lana blanca. Sucede todo lo contrario con la aparición de lunares negros en la zona de vellón en ovinos seleccionados para la producción de lana blanca de calidad.

Hasta el momento se desconocen los factores genéticos involucrados en la formación de lunares negros en la zona de vellón de los ovinos de capa blanca. Entre los genes propuestos se encuentran *MC1R*, *ASIP*, *c-Kit*, *mast cell growth factor* y *endothelin receptor B* (Fleet, 2002; Fleet *et al.*, 2004). Identificar los genes involucrados en este proceso resulta fundamental si se desea en un futuro generar herramientas moleculares que permitan seleccionar en contra de la aparición de esta característica indeseada. Una alternativa disponible para estudiar qué genes están involucrados en la aparición o desarrollo de una característica son los estudios de expresión génica mediante microarreglos (Cassar Malek *et al.*, 2008). Estudios de este tipo en ovinos han sido reportados para estudiar susceptibilidad a parásitos gastrointestinales (por ejemplo, Keane *et al.*, 2006; MacKinnon *et al.*, 2009) y para analizar el desarrollo folicular de la fibra de lana (Norris *et al.*, 2005). Sin embargo, hasta el momento no han sido reportados trabajos enfocados en temas de pigmentación.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión génica a nivel de la piel con lunares (lunares con y sin producción de fibras pigmentadas) y la piel sin lunares mediante la tecnología de los microarreglos, de manera de poder identificar posibles genes responsables de la aparición de esta característica.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y tejidos

Los tejidos de piel se obtuvieron de ovejas no emparentadas de la raza Corriedale de diferentes edades. De cada animal se obtuvieron los 3 tejidos de interés: piel blanca sin lunares, piel con lunares pero sin producción de fibras pigmentadas y piel con lunares con gran producción de fibras pigmentadas. Los tejidos fueron almacenados en nitrógeno líquido hasta el momento de su procesamiento.

Extracción y purificación de ARN

La extracción de ARN total se realizó utilizando el QuickPrep Total RNA Extraction Kit de General Electric Healthcare siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. La calidad del ARN se analizó mediante electroforesis capilar con el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Mississauga, ON). Se utilizaron únicamente muestras con un RNA Integrity Number (RIN) mayores a 7.0. La concentración de ARN se evaluó mediante espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

Experimento de microarreglos

Un experimento de microarreglos de dos colores supone una hibridación competitiva entre dos poblaciones de ARN por una misma sonda ubicada sobre un sustrato sólido denominado array. El diseño experimental utilizado en el experimento de microarreglos

se describe en la Figura 1. Se realizaron los tres tipos de comparaciones posibles entre los tres tejidos de interés. Se utilizaron un total de 5 ovejas; 5 réplicas biológicas donde cada réplica consiste en las tres comparaciones posibles entre los tejidos de interés. Por lo tanto, se realizaron un total de 15 hibridaciones. En este trabajo se utilizó el array comercial ovino de Agilent (G4813A) que contiene un total de 15.208 sondas. La síntesis de ADNc así como los pasos posteriores involucrados en todo el experimento se realizaron siguiendo estrictamente el protocolo Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Quick Amp Labeling) de Agilent. Los vidrios fueron escaneados utilizando el equipo Agilent G2565BA microarray scanner. El procesamiento de la imagen se realizó utilizando el programa Agilent Feature Extraction software (Agilent Technologies, versión A.6.1.1).

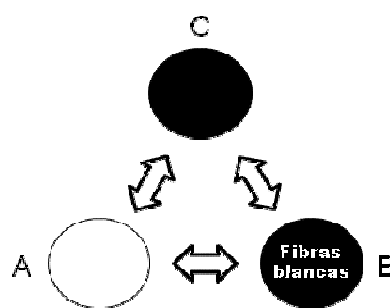


Figura 1. Diseño experimental. A: piel blanca, B: lunar negro con producción de lana blanca y C: lunar negro con producción de fibras pigmentadas.

Análisis de los datos

Los datos fueron normalizados utilizando el método de ajuste de lowess (Quackenbush, 2002). La calidad de cada hibridación se analizó utilizando la información que aporta el programa Feature Extraction de Agilent sobre los spikes (mezclas conocidas de ARNs

utilizadas como controles positivos en las plataformas de Agilent). Fue necesario descartar dos hibridaciones dado que presentaban signos de una mala calidad.

La información de cada sonda fue analizada utilizando el programa Gene-Spring GX 7.3 Expression Analysis Software (Agilent Technologies) de manera de descartar todas aquellas sondas que no tuvieran una señal positiva, uniforme y por encima del ruido o señal de fondo (background). De las 15208 sondas reportadas para el array comercial ovino, luego de este filtrado por calidad, quedaron para ser analizadas un total de 9320.

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa Gene-Spring GX 7.3 de Agilent. Dos situaciones distintas fueron consideradas para el análisis. Por un lado, se analizó si había sondas que simultáneamente estaban sobre-expresadas o sub-expresadas en los lunares (con y sin producción de fibras pigmentadas) comparadas con la piel blanca. Para esto se utilizó un t-Test para dos muestras no pareadas y se consideró que una sonda estaba expresada en forma diferencial si $p < 0.005$. Por otro lado, se estudió si existía expresión génica diferencial entre los dos tipos de lunares. Se utilizó un t-Test con un p valor umbral de 0.005.

En ambos casos, debido a los múltiples test de hipótesis realizados, es esperable encontrar un número importante de falsos positivos al utilizar este p valor. De todas maneras, la disminución del p valor lleva a aumentar el error de tipo II y a disminuir el poder de la prueba para detectar genes expresados verdaderamente en forma diferencial.

Por lo tanto, considerando a los microarreglos como un verdadero método exploratorio, en este trabajo se utilizó un p valor umbral de 0.005, de manera de contar con un número adecuado de genes para luego poder validar alguno de ellos mediante PCR cuantitativo.

Validación por PCR cuantitativo

Dos de los cinco animales utilizados en el experimento de microarreglos fueron utilizados para validar por PCR en tiempo real algunos de los genes sobre-expresados a nivel de los lunares. Además, dos nuevos animales se utilizaron para analizar la expresión de estos genes comparando el lunar con producción de fibras pigmentadas con la piel blanca.

El ADNc fue sintetizado mediante transcripción reversa utilizando SuperScript III First-Strand Synthesis System Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) con cebadores aleatorios usando 340 ng de ARN total como molde.

Los cebadores para amplificar de forma específica los genes *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa* (GAPDH), *c-fos*, *cAMP response element binding* (CREB) y *Krüppel-like factor* (KLF4) fueron creados utilizando las secuencias de ovino disponibles en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> , acceso marzo 2010). La secuencia de los cebadores y el largo de los productos esperados se detallan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Secuencia de los cebadores y largo esperado del producto amplificado en las reacciones de PCR en tiempo real.

Gen ^a	Nº de acceso ^b	Secuencia del cebador ^c	Largo (pb)
GAPDH	EE761748	D – CGAAGGTAGAAGAGTGAGTGTCG R – TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG	114
C-FOS	EE779059	D – CAACGAGCCTTCCTCTGACT R – CCTCTCTGTATGCGCCAAC	119
CREB	FE035394	D – ACAATGGTACGGATGGGGTA R – GGGCACTAGGATTTGCTGTC	125
KLF4	EE851484	D – GGACCACCTCGCCTTACATA R – GACTTGTTGGGAACCTTGACCAT	170

^a GAPDH = *glicelaldehído-3-fosfato deshidrogenasa*, CREB = *cAMP response element binding*, KLF4 = *Krüppel-like factor 4*. ^b Acceso en el GeneBank (NCBI). ^c D = directo, R = reverso.

Las reacciones de PCR en tiempo real fueron realizadas utilizando 5 µl de SYBR[®] Green mastermix (Quantimix EASY SYG kit, Biotools B&M Labs, Madrid, Spain), 100 nM de cada cebador y 3 µl de ADNc diluido (1:5.5) en un volumen final de 10 µl. Las muestras fueron analizadas por triplicado en un Rotor-Gene[™] 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia).

Las condiciones de la amplificación fueron de 10 min a 95°C y 40 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 60°C y 30 s a 72°C. Luego de cada reacción de PCR, las curvas de disociación fueron analizadas de manera de verificar la detección del producto deseado y descartar contaminación o dímeros de primers.

En cada corrida de PCR en tiempo real, el primer ciclo de amplificación que estuvo por encima del umbral de fluorescencia (Ct) fue determinado para cada muestra. La expresión génica fue estimada mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando el gen GAPDH como control endógeno y calculando la expresión relativa a la de la piel blanca. En nuestro caso $\Delta Ct = Ct(\text{gen}) - Ct(\text{GAPDH})$ y $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{lunar}) - \Delta Ct(\text{piel blanca})$ (Livak y Schmittgen, 2001).

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento de microarreglos

En el Cuadro 2 se muestran las sondas del array ovino de Agilent expresadas de manera diferencial entre la piel blanca y ambos tipos de lunares (con y sin producción de fibras pigmentadas). La mayoría de las sondas pudieron ser asignadas a sus respectivos genes y sus productos proteicos haciendo uso del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, acceso marzo 2010).

Entre las sondas que se expresaron significativamente más en los lunares que en la piel blanca se destacan aquellas que pertenecen a los genes *c-fos*, *cAMP response element binding* (CREB) y *Krüppel-like factor 4* (KLF4).

Cuadro 2. Sondas expresadas en forma diferencial entre la piel blanca y ambos tipos de lunares (con y sin producción de fibras pigmentadas).

Nº de acceso ^a	Gen ^b	Nombre del gen	P valor ^c
<i>Sondas sobre-expresadas en ambos tipos de lunares</i>			
EE779059	C-FOS	<i>c-fos</i>	0,00004
FE035394	CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>	0,00085
EE851484	KLF4	<i>Krüppel-like factor 4</i>	0,0017
EE849930	*		0,0038
EE806573	LRRFIP2	<i>leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2</i>	0,0043
<i>Sondas sub-expresadas en ambos tipos de lunares</i>			
FE037007	*		0,0013
EE835247	UFC1	<i>ubiquitin-fold modifier conjugating enzyme 1</i>	0,0013
NM_001009779	OVGP1	<i>Ovis aries oviductal glycoprotein 1</i>	0,0015
EE777727	NENF	<i>neuron derived neurotrophic factor</i>	0,0018
EE783149	*		0,0019
EE822975	AP1G2	<i>adaptor-related protein complex 1, gamma 2 subunit</i>	0,0019
EE795293	Nr2f6	<i>nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6</i>	0,0022

^a Acceso en el GeneBank (NCBI). ^b * = No fue posible determinar de forma inequívoca a qué gen pertenece la sonda. ^c t-Test para dos muestras no pareadas.

El gen *c-fos* es un proto-oncogén que pertenece a una familia de factores de transcripción de respuesta rápida involucrados en la respuesta celular frente a diversos factores externos. Uno de los principales factores externos que activan la transcripción de este gen es la radiación ultravioleta (Djavaheri-Mergny *et al.*, 1996; Silvers *et al.*, 2003). Está bien documentado que la radiación ultravioleta promueve a nivel de piel la

proliferación de los melanocitos y la síntesis de melanina (Costin y Hearing, 2007). La exposición de la piel a la luz ultravioleta ha sido reportada en ovinos como un factor que aumenta el riesgo del desarrollo de lunares en la zona de vellón (Forrest y Fleet, 1986). Cabe remarcar que el Uruguay está situado en una región de Sudamérica que presenta elevados registros de radiación ultravioleta (Díaz *et al.*, 2006). En este mismo sentido, la activación temprana del gen *c-fos* ha sido propuesta como un factor genético involucrado en la producción de melanina en células expuestas a luz ultravioleta (Gordon *et al.*, 1992). Además, ha sido reportada la activación de este gen a nivel de melanomas de piel (Milde-Langosch, 2005). A pesar de existir información que vincula la activación del gen *c-fos* y la producción de melanina, hasta el momento se desconocen en forma precisa los mecanismos moleculares subyacentes en esta relación.

Cabe remarcar que en este trabajo, las dos sondas del array ovino de Agilent diseñadas para el gen *c-fos* mostraron una marcada sobre-expresión de este gen en ambos tipos de lunares. Este es el primer trabajo en animales domésticos que reporta una asociación entre una característica de pigmentación, en este caso la presencia de lunares de piel en la zona de vellón, y la expresión del gen *c-fos*.

El gen CREB es un factor de transcripción estrechamente vinculado con el proceso de la melanogénesis a nivel de los melanocitos. La unión de un agonista al receptor de membrana MC1R en los melanocitos lleva a la activación de la enzima adenilato ciclasa provocando un aumento de adenosín monofosfato cíclico (cAMP). El aumento

intracelular de cAMP lleva a la activación mediante fosforilación de CREB (Lin y Fisher, 2007). El gen CREB activa la transcripción de diversos genes involucrados en la síntesis de melanina incluyendo el gen *microphthalmia transcription factor* (MITF) considerado el principal factor de transcripción involucrado en el proceso de la melanogénesis.

El gen KLF4 es un factor de transcripción que se expresa en una amplia variedad de tejidos, incluyendo la piel, y está vinculado con diferentes procesos fisiológicos, incluido el desarrollo, la proliferación, la diferenciación y el mantenimiento de la homeostasis tisular. Diversos estímulos activan la expresión de este gen, entre los cuales se destaca el estrés oxidativo y el daño en el ADN (Evans y Liu, 2008). Ambos fenómenos, estrechamente vinculados, pueden ser provocados a nivel de la piel por la incidencia de la radiación ultravioleta. Aunque no ha sido reportada hasta el momento una asociación directa entre el aumento de la expresión génica del gen KLF4 y la melanogénesis, se sabe que ambos fenómenos son activados por la luz ultravioleta (Costin y Hearing, 2007; Evans y Liu, 2008). Este es el primer trabajo que reporta una asociación entre la expresión del gen KLF4 y la aparición de una característica de pigmentación como es el desarrollo de lunares de piel.

Entre las sondas que se sub-expresaron a nivel de los lunares comparados con la piel blanca se destacan la secuencia FE037007 y el gen *ubiquitin-fold modifier conjugating enzyme 1* (UFC1).

No fue posible determinar de forma inequívoca a qué gen pertenece la secuencia FE037007. El gen UFC1 codifica para una enzima involucrada en el sistema de ubiquitinación y degradación proteica mediada por el proteosoma. Este sistema está vinculado con la regulación de la melanogénesis a nivel de la piel mediante la degradación de factores de transcripción y enzimas involucradas en la producción de melanina (Ando *et al.*, 2009). Nuestro resultado estaría indicando que el silenciamiento de esta vía de regulación podría mediar la formación de lunares de piel en los ovinos.

Es importante analizar también qué sucedió con los genes MC1R, ASIP y *c-kit*, tres de los principales genes propuestos por la bibliografía como posibles responsables de la generación de lunares de piel en los ovinos productores de lana blanca.

El gen MC1R no mostró diferencias significativas en su expresión génica entre la piel blanca y ambos tipos de lunares. En cerdos, un alelo del gen MC1R es propenso a sufrir una mutación somática a nivel de la piel y generar lunares negros sobre una capa blanca (Kijas *et al.*, 2001). Nuestros resultados descartan que una mutación somática en el gen MC1R, que ocasione diferencias en la expresión génica, sea responsable de la aparición de lunares de piel en los ovinos.

Tampoco hubo diferencias significativas en la expresión del gen ASIP entre la piel blanca y ambos tipos de lunares. Marcadas diferencias en la expresión génica de este gen han sido reportadas entre la piel de ovinos blancos y la piel de ovinos de color negro

(Norris y Whan, 2008; Royo *et al.*, 2008). Nuestros hallazgos descartan que una mutación somática en el gen ASIP, que ocasione un silenciamiento génico, sea responsable de la aparición de lunares negros en la piel.

El gen *c-kit* está estrechamente vinculado al proceso de migración y diferenciación que sufren los melanocitos desde la cresta neural hasta su llegada a la piel (Lin y Fisher, 2007). Este gen ha sido propuesto como uno de los responsables de la ausencia de melanocitos a nivel de la piel en ovinos productores de lana blanca y por lo tanto estar vinculado con la formación de lunares negros (Fleet, 2002). Nuestros resultados indican que el gen *c-kit* no se expresa en ninguno de los tres tejidos analizados y por lo tanto no estaría involucrado en el desarrollo de lunares de piel.

No se detectaron diferencias significativas en la expresión génica entre lunares que producen lana blanca y aquellos lunares que producen gran cantidad de fibras pigmentadas. Por lo tanto, esta diferencia fenotípica no estaría explicada a nivel de la activación o silenciamiento de genes sino simplemente en el hecho azaroso que los melanocitos, una vez llegados a la piel, invadan el folículo de la lana de manera de poder pigmentarla.

Validación por PCR cuantitativo

Dos de los cinco animales (animales 1 y 2) incluidos en el experimento de microarreglos fueron utilizados para validar por PCR cuantitativo la sobre-expresión de los genes *c-fos*,

CREB y KLF4 en ambos tipos de lunares. Además, se analizó la expresión relativa de estos tres genes a nivel del lunar con producción de fibras pigmentadas comparado con la piel blanca en dos nuevos animales (animales 3 y 4). En el Cuadro 3 se muestran los resultados de expresión génica calculada mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando el gen GAPDH como control endógeno y calculando la expresión génica relativa a la de la piel blanca. Cada tejido de cada animal se analizó por triplicado y por lo tanto se expresó el valor de la media de $\Delta\Delta Ct$ con su respectivo desvío estándar. La expresión génica en los lunares relativa a la expresión en la piel blanca fue calculada como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ tomando en cuenta la media de $\Delta\Delta Ct \pm$ su desvío estándar. La expresión génica relativa indica cuantas veces más o menos se expresa el gen a nivel del lunar comparado con la piel blanca (usada en este caso como tejido control).

El gen *c-fos* mostró una mayor expresión génica en ambos tipos de lunares en los dos animales utilizados en el experimento de microarreglos. Además, este gen mostró una marcada sobre-expresión en los lunares con producción de fibras pigmentadas en los otros dos animales analizados. Estos resultados coinciden plenamente con lo obtenido en el experimento de microarreglos donde las dos sondas del gen *c-fos* mostraron marcadas diferencias en su expresión entre ambos tipos de lunares y la piel blanca.

No se observó una marcada diferencia en la expresión del gen CREB entre los lunares y la piel blanca. Los intervalos calculados para la expresión génica a nivel de ambos tipos

de lunares relativos a la piel blanca no son contundentes en mostrar una mayor expresión del gen CREB en los dos animales utilizados en el experimento de microarreglos. Incluso este mismo gen mostró mayor expresión génica a nivel de la piel blanca en el animal 4. Estos resultados no son concluyentes en afirmar, como sí lo hizo el experimento de microarreglos, que el gen CREB está marcadamente sobre-expresado en ambos tipos de lunares de piel en los ovinos.

Excepto en el lunar sin fibras pigmentadas del animal 2, el gen KLF4 mostró una marcada sobre-expresión génica a nivel de los dos tipos de lunares de piel en los dos animales utilizados en el experimento de microarreglos. En el animal 3 no se observó una marcada diferencia en la expresión génica entre ambos tejidos y sí se observó una importante diferencia en el animal 4. Los resultados de PCR en tiempo real, aunque sin ser del todo concluyentes, remarcan la posibilidad de que el gen KLF4 esté involucrado en el desarrollo de lunares de piel en la zona de vellón.

3.6 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el experimento de microarreglos no apoyan la mayoría de los genes propuestos por la bibliografía como responsables de generar lunares de piel en los ovinos. Específicamente, los genes MC1R y ASIP no mostraron diferencias significativas en su expresión génica entre la piel blanca y los lunares y el gen *c-kit* no se

expresó en ninguno de los tejidos analizados. En su lugar, contamos con una nueva lista de genes candidatos que deberán de ser estudiados en mayor profundidad.

Cabe remarcar que los genes *c-fos* y *KLF4*, sobre-expresados en ambos tipos de lunares, no habían sido hasta el momento considerados por la bibliografía como posibles genes responsables de generar lunares de piel. Ambos genes son factores de transcripción involucrados en la respuesta celular a daños ocasionados por factores externos como la luz ultravioleta. La caracterización molecular de los genes que sistemáticamente están sobre-expresados o incluso sub-expresados a nivel de los lunares posibilitará discernir los mecanismos moleculares involucrados en la formación de lunares en la piel en ovinos productores de lana blanca. El conocimiento de estos mecanismos resulta fundamental si se desea en un futuro tratar de utilizar herramientas moleculares para disminuir la incidencia de esta característica indeseable en ovinos seleccionados para producir lana blanca de calidad.

Cuadro 3. Expresión génica estimada mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando el gen GAPDH como control endógeno y calculando la expresión relativa a la de la piel blanca.

Animal ^a	Tejido ^b	$\Delta\Delta Ct$ ^c	Expresión relativa ^d
Gen <i>c-fos</i>			
1	Lunar sin FP	- 1,99 ± 0,34	4,0 (3,1 – 5,0)
	Lunar con FP	- 4,62 ± 0,32	24,7 (19,8 – 30,7)
2	Lunar sin FP	-0,88 ± 0,73	1,8 (1,1 – 3,1)
	Lunar con FP	-2,40 ± 0,92	5,3 (2,8 – 10,0)
3	Lunar con FP	-2,05 ± 0,42	4,2 (3,1 – 5,5)
4	Lunar con FP	-2,71 ± 0,83	6,5 (3,7 – 11,7)
Gen <i>cAMP response element binding protein (CREB)</i>			
1	Lunar sin FP	0,33 ± 0,87	0,8 (0,4 – 1,5)
	Lunar con FP	- 0,24 ± 0,58	1,2 (0,8 – 1,8)
2	Lunar sin FP	-0,88 ± 0,75	1,8 (1,1 – 3,1)
	Lunar con FP	0,28 ± 0,90	0,8 (0,4 – 1,5)
3	Lunar con FP	-1,12 ± 0,93	2,2 (1,1 – 4,1)
4	Lunar con FP	1,41 ± 0,98	0,4 (0,2 – 0,7)
Gen <i>Krüppel-like factor 4 (KLF4)</i>			
1	Lunar sin FP	-2,54 ± 0,30	5,8 (4,7 – 7,1)
	Lunar con FP	- 4,68 ± 0,29	25,6 (21,0 – 31,2)
2	Lunar sin FP	0,17 ± 0,25	0,9 (0,8 – 1,1)
	Lunar con FP	-1,78 ± 0,22	3,4 (3,0 – 4,0)
3	Lunar con FP	0,45 ± 0,69	0,7 (0,5 – 1,2)
4	Lunar con FP	-3,15 ± 0,38	8,9 (6,8 – 11,6)

^a 1 y 2 usados en el experimento de microarreglos, 3 y 4 son nuevos. ^b FP = fibras pigmentadas. ^c Media $\Delta\Delta Ct$ ± desvío estándar. ^d Relativa a la piel blanca.

3.7 AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a Gonzalo Greif y Gabriela Libisch por su valiosa colaboración en el trabajo de laboratorio. Este trabajo fue financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación Proyecto FCE2007_547.

3.8 BIBLIOGRAFÍA

Ando H., Ichihashi M., Hearing V.J. 2009. Role of the ubiquitin proteasome system in regulating skin pigmentation. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 4428-4434.

Cassar Malek I., Picard B., Bernard C., Hocquette J.F. 2008. Application of gene expression studies in livestock production systems: a European perspective. *Aust. J. Exp. Agric.* 48: 701-710.

Costin G.E., Hearing V.J. 2007. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* 21: 976-994.

Díaz S., Camilión C., Deferrari G., Fuenzalida H., Armstrong R., Booth C., Paladini A., Cabrera S., Casiccia C., Lovengreen C., Pedroni J., Rosales A., Zagarese H., Vernet M. 2006. Ozone and UV radiation over southern South America: climatology and anomalies. *Photochemistry and Photobiology.* 82 (4): 834-843.

Djavaheri-Mergny M, Mergny J.L., Bertrand F, Santus R., Mazière C., Dubertret L., Mazière J.C. 1996. Ultraviolet-A induces activation of AP-1 in cultured human keratinocytes. *FEBS Lett.* 384: 92-6.

Evans P.M., Liu C. 2008. Roles of Krüpel-like factor 4 in normal homeostasis, cancer and stem cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 40: 554-564.

Fleet M.R. 2002. Pigment prevention in sheep: Complex or simple? *Wool Tech. Sheep Breed.* 50: 410-416.

Fleet M.R., Forrest J.W., Walker S.K., Rogers G.E. 2004. Foetal development of melanocyte populations in Merino wool-bearing skin. *Wool Tech. Sheep Breed.* 52: 101-123.

Fleet M.R., Foulds R.A., Mahar T.J., Turk J.A. 2008. Relationship between pigmented fibre in raw and processed wool when other dark fibre is controlled - a review. *Int. J. Sheep Wool Sci.* 56: 40-59.

Forrest J.W., Fleet M.R. 1986. Pigmented spots in the wool-bearing skin induced by ultraviolet light. *Aust. J. Biol. Sci.* 39: 123-136.

Gordon L., Peacocke M., Gilchrist B.A. 1992. Induction of c-fos but not c-myc in S-91 cells by melanization signals. *J. Dermatol. Sci.* 3: 35-41.

Keane O.M., Zadissa A., Wilson T., Hyndman D.L., Greer G.J., Baird D.B., McCulloch A.F., Crawford A.M., McEwan, J.C. 2006. Gene expression profiling of Naïve sheep genetically resistant and susceptible to gastrointestinal nematodes. *BMC Genomics.* 7: 42.

Kijas J.M.H., Moller M., Plastow G., Andersson L. 2001. A frameshift mutation in MC1R and a high frequency of somatic reversions cause black spotting in pigs. *Genetics.* 158: 779-785.

Klungland H., Våge D.I. 2000. Molecular Genetics of Pigmentation in Domestic Animals. *Current Genomics. Curr. Genomics.* 1: 223-242.

Lin J.Y., Fisher D.E. 2007. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature.* 445: 843-850.

Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods.* 25: 402-408.

MacKinnon K.M., Burton J.L., Zajac A.M., Notter D.R. 2009. Microarray analysis reveals difference in gene expression profiles of hair and wool sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 130: 210-220.

Milde-Langosch K. 2005. The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis. *Eur. J. Cancer.* 41: 2449-2461.

Norris B.J., Bower N.I., Smith W.J.M., Cam G.R., Reverter, A. 2005. Gene expression profiling of ovine skin and wool follicle development using a combined ovine – bovine skin cDNA microarrays. *Aust. J. Exp. Agric.* 45: 867-877.

Norris B. J., Whan V. A. 2008. A gene duplication affecting expression of the ovine ASIP gene is responsible for white and black sheep. *Genome Res.* 18: 1282-1293.

Quackenbush J. 2002. Microarray data normalization and transformation. *Nature Genet.* 32: 496-501.

Royo L.J., Alvarez I., Arranz J.J., Fernández I., Rodríguez A., Pérez-Pardal L., Goyache F. 2008. Differences in the expression of the ASIP gene are involved in the recessive black coat colour pattern in sheep: evidence from the rare Xalda sheep breed. *Anim. Genet.* 39: 290-293.

Silvers A.L., Bachelor M.A., Bowden G.T. 2003. The role of JNK and p38 MAPK activities in UVA-induced signaling pathways leading to AP-1 activation and c-Fos expression. *Neoplasia*. 5: 319-29.

Sponenberg D.P. 1997. Genetics of colour and hair texture. En: *The Genetics of Sheep*. Ed. CAB International. Wallingford, UK. pp. 51-85.

Våge D.I., Klunland H., Lu D., Cone R.D. 1999. Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. *Mamm. Genome*. 10: 39-43.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

La aplicación de programas de mejora genética para disminuir el número de fibras pigmentadas en la lana Corriedale traería aparejado un importante beneficio económico en toda la cadena textil lanera nacional. Sin embargo, la selección directa en contra de la presencia de fibras es un método caro y engorroso, requiere de un sofisticado análisis de laboratorio, y por lo tanto es impracticable como criterio de selección. Una alternativa es seleccionar en forma indirecta, haciendo uso de una característica de fácil medición, de heredabilidad razonable y genéticamente correlacionada con la presencia de fibras pigmentadas en el vellón. En este contexto, la presencia y número de lunares en la zona de vellón resulta una característica muy interesante de estudiar.

Los aspectos metodológicos a considerar para el tratamiento estadístico de las variables candidatas no son menores. Por un lado, la característica presencia de lunares puede visualizarse como una respuesta ordenada en pocas clases, agrupando los lunares de acuerdo a la cantidad de fibras pigmentadas que producen, o simplemente visualizando la variable como presencia o ausencia de la observación. En este caso, un enfoque clásico sería el de utilizar un modelo umbral o Probit (Gianola 1982, Gianola y Foulley 1983). Cabe destacar que definir la variable en forma binaria llevaría a perder valiosa información dado que el número de lunares como la superficie que estos cubren en el animal, pueden variar de forma importante entre individuos. La variable número de lunares, variable de conteo, podría ser modelada convenientemente mediante una distribución de Poisson (Foulley *et al.* 1987) o incluso usando este mismo modelo pero con la introducción de un residuo aleatorio que permita modelar diferencias individuales y acomodar así la sobredispersión, una característica común en los datos de conteo (Naya *et al.* 2008).

Otra alternativa, de creciente interés a nivel del mejoramiento genético animal, es el uso de marcadores moleculares asociados a rasgos biológicos de interés económico. Su uso es recomendado particularmente en situaciones donde la característica es de baja heredabilidad o difícil de medir. Desafortunadamente, los desarrollos en esta área en el ovino son todavía muy incipientes (Van der Werf 2007).

En este trabajo la presencia de lunares negros en la zona de vellón de ovinos Corriedale fue abordada desde dos enfoques complementarios: en el primer estudio se evaluaron modelos alternativos para el análisis genético de la presencia y número de lunares. En el segundo estudio se analizó la expresión génica a nivel de lunares negro y piel blanca de manera de identificar genes responsables de la aparición de esta característica.

En el primer estudio cuatro modelos fueron analizados: modelo Probit y modelo lineal para la presencia de lunares y modelo Poisson y modelo lineal para el número de lunares. Se abordó la estimación de parámetros genéticos y se estudió la bondad de ajuste y la predicción de efectos aleatorios para cada modelo. Además, se comparó la capacidad de predicción de los modelos mediante validación cruzada.

Tener estimaciones precisas de parámetros genéticos es fundamental a la hora de proponer una estrategia de selección. La presencia y el número de lunares en la zona de vellón parecen ser características de heredabilidad media (entre 0,154 y 0,474) lo que sugiere una posibilidad cierta para la selección. Ambas características presentan una repetibilidad de media a alta (entre 0,341 y 0,747) lo que sugiere que una sola medida temprana en la vida del animal es suficiente como para tomar una adecuada decisión de selección.

En cuanto al análisis genético de la presencia de lunares, el modelo Probit fue algo superior al modelo lineal en términos del error cuadrático medio (0.088 versus 0.097

para el modelo Probit y lineal, respectivamente). Sin embargo, ambos modelos mostraron similares correlaciones entre valores observados y ajustados (0.80 y 0.79). Las predicciones de los efectos aleatorios de ambos modelos estuvieron altamente correlacionadas: 0,984 entre valores de cría y 0,986 entre efectos ambientales permanentes. Ambos modelos mostraron similares capacidades de predicción: 0,168 y 0,169 en términos de error cuadrático medio de predicción para el modelo Probit y lineal, respectivamente. Estos resultados sugieren fuertemente que ambos modelos podrían ser utilizados para evaluar genéticamente la presencia de lunares.

Para el número de lunares en la zona de vellón, el modelo de Poisson con residuo se desempeñó mejor que el modelo lineal, tanto en bondad de ajuste como en capacidad de predicción. Las predicciones de los efectos aleatorios obtenidas con el modelo de Poisson estuvieron más correlacionadas con aquellas obtenidas con los modelos para analizar presencia de lunares (entre 0.805 y 0.832) que las obtenidas con el modelo lineal con la misma variable de respuesta (entre 0.733 y 0.758). Este modelo ajusta pobremente los datos y eso trae aparejado un ordenamiento diferente de los animales con respecto a los otros tres modelos analizados. La utilización de modelos con varianza residual heterogénea para modelar número de lunares en la zona de vellón es una alternativa que se podría explorar a futuro.

En este trabajo, la característica número de lunares analizada con un modelo de Poisson con residuo mostró la mayor variabilidad genética (mayor heredabilidad). Sin embargo, las estimaciones obtenidas con este modelo son difíciles de interpretar y además resulta complejo incluir este tipo de modelo en evaluaciones genéticas que ya están marcha y que además evalúan simultáneamente más de una característica. En la práctica, lo más sencillo es registrar simplemente presencia o ausencia de lunares en la zona de vellón y analizar esta característica con un modelo lineal o Probit. Formalmente, un modelo Probit es mejor que un modelo lineal para analizar una variable binaria (Gianola 1982). Sin embargo, en este trabajo ambos modelos mostraron un desempeño

similar y cabe remarcar que las predicciones de estos modelos estuvieron muy correlacionadas con las obtenidas con el modelo de Poisson para analizar número de lunares. Ambos modelos pueden implementarse fácilmente en la práctica y por lo tanto pueden utilizarse para evaluar genéticamente esta característica.

En el segundo trabajo se estudió mediante microarreglos la expresión génica a nivel de lunares (con y sin producción de fibras pigmentadas) y piel blanca de manera de identificar aquellos genes que se expresan de forma diferencial y por lo tanto que podrían estar involucrados en el desarrollo de esta característica. Además, la expresión génica de tres de los genes sobre-expresados a nivel de los lunares fue analizada mediante PCR en tiempo real.

Cabe destacar que este es el primer trabajo que ha abordado a nivel internacional el tema de la pigmentación en ovinos utilizando la tecnología de los microarreglos. Además, la aplicación de esta tecnología fue una verdadera novedad a nivel nacional.

Los resultados obtenidos no apoyan la mayoría de los genes propuestos por la bibliografía como posibles responsables del desarrollo de lunares negros en la zona de vellón. Específicamente, los genes MC1R y ASIP, únicos genes del ovino involucrados en la melanogénesis que están caracterizados a nivel molecular, no mostraron diferencias significativas en su expresión génica entre la piel blanca y los lunares. Además, el gen *c-kit*, considerado uno de los responsables de la ausencia de melanocitos a nivel de la piel de ovinos de lana blanca, no se expresó en ninguno de los tejidos analizados.

A partir de este trabajo, contamos con una nueva lista de genes candidatos, posiblemente involucrados en la formación de lunares negros, que deberán de ser estudiados en mayor profundidad. Entre los genes que marcadamente se expresaron más en ambos tipos de lunares comparados con la piel blanca, se destacan los genes *c-fos* y

KFL4, ambos factores de transcripción involucrados en la respuesta rápida a factores externos como la luz ultravioleta. Si bien existen trabajos que han reportado que estos genes son activados como respuesta a la luz ultravioleta y al daño en el ADN y está bien documentada la producción de melanina como respuesta a estos fenómenos (Costin y Hearing 2007), este es el primer trabajo que asocia directamente un incremento en la expresión génica de estos dos genes y el desarrollo de una característica de pigmentación como lo son los lunares negros de piel.

Teóricamente, el desarrollo de una característica, en nuestro caso la formación de lunares negros, puede deberse no sólo por la activación de ciertos genes sino también por el silenciamiento de otros. Entre las sondas del array ovino de Agilent que se sub-expresaron a nivel de los lunares, se destacan la secuencia FE037007 y el gen (UFC1). No fue posible determinar con precisión a qué gen pertenece la secuencia FE037007. Seguramente en un futuro cuando se avance en el conocimiento del genoma ovino podremos determinar a qué gen pertenece esta secuencia y quizás determinar de qué manera está involucrado en el desarrollo de lunares de piel. Por otro lado, sabemos que el gen UFC1 está estrechamente vinculado con el sistema de degradación proteica mediado por ubiquitina y el proteosoma. Este sistema, involucrado en la regulación de varios procesos fisiológicos, está vinculado con la regulación de la melanogénesis a nivel de la piel mediante la degradación de factores de transcripción y enzimas involucradas en la producción de melanina (Ando *et al.* 2009). Nuestro resultado estaría indicando que el silenciamiento de esta vía de regulación podría estar mediando la formación de lunares de piel en los ovinos.

4.2 CONCLUSIONES GLOBALES

Una alternativa para encarar el problema de la presencia de fibras pigmentadas en la lana Corriedale es hacer uso de los lunares como criterio de selección y aplicar los modelos aquí estudiados para evaluar genéticamente los animales de una población. Este

clásico enfoque de genética cuantitativa podría ser aplicado de inmediato. Incluso, trabajos preliminares de nuestro equipo de investigación, aún sin publicar, muestran que existen correlaciones genéticas cercanas a cero o incluso levemente favorables entre la presencia de fibras pigmentadas y características productivas de suma importancia económica como el peso de vellón y el diámetro de la fibra. Por lo tanto, seleccionar en contra de la presencia de fibras utilizando los lunares como variable indicadora no estaría afectando otras características relevantes desde el punto de vista económico para cualquier productor ovino.

Otra alternativa, que requiere mayor estudio, es hacer uso de herramientas moleculares. La identificación y posterior caracterización de los genes involucrados en la formación de los lunares posibilitará discernir los mecanismos moleculares que subyacen el desarrollo de esta característica indeseable. Este trabajo ha generado una lista de genes posiblemente involucrados en el desarrollo de los lunares negros. Algunos de estos genes resultan muy novedosos dado que no habían sido reportados hasta el momento en la bibliografía aunque su función biológica claramente los vincula con la melanogénesis y una posible formación de lunares. En un futuro, identificar variantes alélicas que estén asociadas con una mayor incidencia de esta característica a nivel poblacional permitirá generar herramientas moleculares que permitan seleccionar en contra de la formación de lunares y de esa manera disminuir la presencia de fibras pigmentadas en lana.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Ando, H.; Ichihashi, M.; Hearing, V.J. 2009. Role of the ubiquitin proteasome system in regulating skin pigmentation. *International Journal of Molecular Science*. 10 (10): 4428-4434.
- Cardellino, R.; Guillamón, B.E.; Severi, J.F. 1990. Origen de las fibras coloreadas en tops de lana uruguaya. *Producción Ovina*. 3 (1): 81-83.
- Cardellino, R.; Mendoza, M. 1996. Fibras coloreadas en tops con lanas acondicionadas (zafra 94-95). *Lana Noticias SUL*. 115: 37-40.
- Cassar Malek, I.; Picard, B.; Bernard, C.; Hocquette, J.F. 2008. Application of gene expression studies in livestock production systems: a European perspective. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 48 (7): 701-710.
- Costin, G.E.; Hearing, V.J. 2007. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB Journal*. 21 (1): 976-994.
- Díaz, S.; Camilión, C.; Deferrari, G.; Fuenzalida, H.; Armstrong, R.; Booth, C.; Paladini, A.; Cabrera, S.; Casiccia, C.; Lovengreen, C.; Pedroni, J.; Rosales, A.; Zagarese, H.; Vernet, M. 2006. Ozone and UV radiation over southern South America: climatology and anomalies. *Photochemistry and Photobiology*. 82 (4): 834-843.
- Djavaheri-Mergny, M.; Mergny, J.L.; Bertrand, F.; Santus, R.; Mazière, C.; Dubertret, L.; Mazière, J.C. 1996. Ultraviolet-A induces activation of AP-1 in cultured human keratinocytes. *FEBS Letters*. 384 (1): 92-96.
- Enns, R.M.; Nicoll, G.B. 2002. Incidence and heritability of black spots in Romney sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 45 (1): 67-70.
- Evans, P.M.; Liu, C. 2008. Roles of Krüpel-like factor 4 in normal homeostasis, cancer and stem cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 40 (7): 554-564.
- Fleet, M.R.; Foulds, R.A.; Mahar, T.J.; Turk, J.A. 2008. Relationship between pigmented fibre in raw and processed wool when other dark fibre is controlled - a review. *International Journal of Sheep and Wool Science*. 56 (1): 40-59.

- Fleet, M.R. 2006. Development of black pigmented skin spots and pigmented wool fibres in a Merino flock – causes, field observations, and wool measurement. *Australian Journal of Agricultural Research*. 57 (7): 751-760.
- Fleet, M.R.; Forrest, J.W.; Wlaker, S.K.; Rogers, G.E. 2004. Foetal development of melanocyte populations in Merino wool-bearing skin. *Wool Technology and Sheep Breeding*. 52 (2): 101-123.
- Fleet, M.R. 2002. Pigmentation prevention in sheep, complex or simple? *Wool Technology and Sheep Breeding*. 50 (3): 410-416.
- Fleet, M.R.; Lush, B. 1997. Sire effects on visible pigmentation in a Corriedale flock. *Wool Technology and Sheep Breeding*. 45 (3): 167-173.
- Fleet, M.R. 1996. Pigmentation types - Understanding the heritability and importance. *Wool Technology and Sheep Breeding*. 44 (4): 264-280.
- Fleet, M.R.; Stafford, J.E. 1989. The association between non-fleece pigmentation and fleece pigmentation in Corriedale sheep. *Animal Production*. 49 (1): 241-247.
- Fleet, M.R.; Forrest, J.W. 1984. The occurrence of spots of pigmented skin and pigmented wool fibres in adult Merino sheep. *Wool Technology and Sheep Breeding*. 32 (2): 83-90.
- Forrest, J.W.; Fleet, M.R. 1986. Pigmented spots in the wool-bearing skin on white merino sheep induced by ultraviolet light. *Australian Journal of Biological Sciences*. 39 (2): 123-136.
- Foulley, J.L.; Gianola, D.; Im, S. 1987. Genetic Evaluation of Trait Distributed as Poisson – Binomial with Reference to Reproductive Characters. *Theoretical and Applied Genetics*. 73 (6): 870-877.
- Gianola, D. 1986. On selection criteria and estimation of parameters when the variance is heterogeneous. *Theoretical and Applied Genetics*. 72 (5): 671-677.
- Gianola, D.; Foulley, J.L. 1983. Sire evaluation for ordered categorical data with a threshold. *Genetics, Selection, Evolution*. 15 (2): 201-223.
- Gianola, D. 1982. Theory and Analysis of Threshold Characters. *Journal of Animal Science*. 54 (1): 1079-1096.

- Gordon, L.; Peacocke, M.; Gilchrest, B.A. 1992. Induction of c-fos but not c-myc in S-91 cells by melanization signals. *Journal of Dermatological Science*. 3 (1): 35-41.
- Hadfield, J. 2010. MCMC Methods for Multi-Response Generalized Linear Mixed Models: The MCMCglmm R Package. *Journal of Statistical Software*. 33 (2): 1-22.
- Keane, O.M.; Zadissa, A.; Wilson, T.; Hyndman, D.L.; Greer, G.J.; Baird, D.B.; McCulloch, A.F.; Crawford, A.M.; McEwan, J.C. 2006. Gene expression profiling of Naïve sheep genetically resistant and susceptible to gastrointestinal nematodes. *BMC Genomics*. 7 (1): 42-54.
- Kijas, J.M.H.; Moller, M.; Plastow, G.; Andersson, L. 2001. A frameshift mutation in MC1R and a high frequency of somatic reversions cause black spotting in pigs. *Genetics*. 158 (2): 779-785.
- Klungland, H.; Våge, D.I. 2000. Molecular Genetics of Pigmentation in Domestic Animals. *Current Genomics*. 1 (3): 223-242.
- Lambert, D. 1992. Zero-inflated Poisson regression with an application to defects in manufacturing. *Technometrics*. 34 (1): 1-14.
- Lin, J.Y.; Fisher, D.E. 2007. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*. 445 (7130): 843-850.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*. 25 (4): 402-408.
- Llaneza, F.; López, R.; Lafuente, C.; Peñagaricano, F.; Sienna, I.; Kremer, R.; Urioste, J. 2007. Variabilidad genética para caracteres de pigmentación en ovinos Corriedale: Resultados preliminares. 1. Fibras pigmentadas. *Actas de Fisiología*. 11 (1): 103.
- MacKinnon, K.M.; Burton, J.L.; Zajac, A.M.; Notter, D.R. 2009. Microarray analysis reveals difference in gene expression profiles of hair and wool sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 130 (3): 210-220.

- Maddox, J.F.; Cockett, N.E. 2007. An update on sheep and goat linkage maps and other genomic resources. *Small Ruminant Research*. 70 (1): 4-20.
- Matos, C.A.P.; Thomas, D.L.; Gianola, D.; Pérez-Enciso, M.; Young, L.D. 1997. Genetic analysis of discrete reproductive traits in sheep using linear and nonlinear models: II. Goodness of fit and predictive ability. *Journal of Animal Science*. 75 (1): 88-94.
- McCarthy, P.J. 1976. The use of balanced half-sample replication in cross-validation studies. *Journal of the American Statistical Association*. 71 (355): 596-604.
- Meijering, A.; Gianola, D. 1985. Linear versus nonlinear methods of sire evaluation for categorical traits: A simulation study. *Genetics, Selection and Evolution*. 17 (1): 115-132.
- Mendoza, J.; Cardellino, R.; Maggiolo, J.; Garín, M. 2001. Fibras coloreadas en Corriedale. *Lananoticias*. 129 (3): 37-40.
- Milde-Langosch, K. 2005. The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis. *European Journal of Cancer*. 41 (16): 2449-2461.
- Naya, H.; Urioste, J.; Chang, Y.; Rodríguez Motta, M.; Kremer, R.; Gianola, D. 2008. A comparison between Poisson and zero-inflated Poisson regression models with an application to number of black spots in Corriedale sheep. *Genetic, Selection and Evolution*. 40 (4): 379-394.
- Norris, B.J.; Bower, N.I.; Smith, W.J.M.; Cam, G.R.; Reverter, A. 2005. Gene expression profiling of ovine skin and wool follicle development using a combined ovine – bovine skin cDNA microarrays. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 45 (8): 867-877.
- Norris, B.J., Whan, V.A. 2008. A gene duplication affecting expression of the ovine ASIP gene is responsible for white and black sheep. *Genome Research*. 18 (8): 1282-1293.
- Olesen, I.; Pérez-Enciso, M.; Gianola D.; Thomas, D.L. 1994. A comparison of normal and nonnormal mixed models for number lambs born in Norwegian sheep. *Journal of Animal Science*. 72 (5): 1166-1173.

- Otegui, P. 2008. ¿Qué tipo de lana debe producir Uruguay para los próximos 10 años?
En: III Seminario sobre Mejoramiento Genético en Ovinos. Salto. Uruguay. Junio 2008.
- Peñagaricano, F.; López, R.; Lafuente, C.; Llana, F.; Sienna, I.; López Mazz, C.; Kremer, R.; Urioste, J. 2007. Variabilidad genética para caracteres de pigmentación en ovinos Corriedale: Resultados preliminares. 2. Halo hair, lunares y su asociación con fibras pigmentadas. *Actas de Fisiología*. 11 (1): 103.
- Pérez-Cabal, M.A.; de los Campos, G.; Vázquez, A.I.; Gianola, D.; Rosa, G.J.M.; Weigel, K.A.; Alenda, R. 2009. Genetic evaluation of susceptibility to clinical mastitis in Spanish Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 92 (7): 3472-3480.
- Pérez-Enciso, M.; Tempelman, R.J.; Gianola, D. 1993. A comparison between linear and Poisson mixed models for litter size in Iberian pigs. *Livestock Production Science*. 35 (3): 303-316.
- Picard, R.R.; Cook, R.D. 1984. Cross-validation of regression models. *Journal of the American Statistical Association*. 79 (387): 575-583.
- Ponzoni, R.W. 1992. Genetic improvement of hair sheep in the tropics. *FAO Animal Production and Health*. Paper 101. FAO. Rome. 168 pp.
- Purvis, I.W.; Franklin, I.R. 2005. Major genes and QTL influencing wool production and quality: a review. *Genetics, Selection and Evolution*. 37 (Suppl. 1): 97-107.
- Quackenbush, J. 2002. Microarray data normalization and transformation. *Nature Genetics*. 32 (4): 496-501.
- R Development Core Team. 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna. Austria. <http://www.R-project.org>. Acceso Noviembre 2009.
- Raftery, A.E.; Lewis, S.M. 1992. Comment: One long run with diagnostics: implementation strategies for Markov Chain Monte Carlo. *Statistical Science*. 7 (4): 493-497.
- Raquet, F.; Ruvira, F. 2008. Comunicación personal.

- Renieri, C.; Valbonesi, A.; La Manna, V.; Antonini, M.; Lauvergne, J.J. 2008. Inheritance of coat color in Merino sheep. 2008. *Small Ruminant Research*. 74 (1): 23-29.
- Royo, L.J.; Alvarez, I.; Arranz, J.J.; Fernández, I.; Rodríguez, A.; Pérez-Pardal, L.; Goyache, F. 2008. Differences in the expression of the ASIP gene are involved in the recessive black coat colour pattern in sheep: evidence from the rare Xalda sheep breed. *Animal Genetics*. 39 (3): 290-293.
- Silvers, A.L.; Bachelor, M.A.; Bowden, G.T. 2003. The role of JNK and p38 MAPK activities in UVA-induced signaling pathways leading to AP-1 activation and c-Fos expression. *Neoplasia*. 5 (4): 319-29.
- Smith, B.J. 2007. Boa: An R Package for MCMC Output Convergence Assessment and Posterior Inference. *Journal of Statistical Software*. 21(11): 1-37.
- Sorensen, D.; Gianola, D. 2002. *Likelihood, Bayesian, and MCMC Methods in Quantitative Genetics*. Springer. New York. USA. 740 p.
- Sponenberg, D.P. 1997. Genetics of colour and hair texture. En: *The Genetics of Sheep*. Editorial CAB International. Wallingford. UK. pp. 51-85.
- Urioste J.I., Peñagaricano F., López R., Lafuente C., Laporta J., Naya H., Sienna I., Kremer R. (2008a) Dark skin spots and pigmentation scores in mouth-lips as indicator traits for presence of pigmented fibres in Corriedale fleeces. En: *Proceedings of the 10th World Conference on Animal Production*. 23–28 November 2008. Cape Town. South Africa.
- Urioste J.I., Peñagaricano F., López R., Laporta J., Llaneza F., Lafuente C., Kremer, R. (2008b) Incidence of dark skin spots and pigmentation in commercial Corriedale flocks. En: *Proceedings of the 10th World Conference on Animal Production*. 23–28 November 2008. Cape Town. South Africa.
- Uruguay. Secretariado Uruguayo de la Lana. 2010a. Estadísticas laneras. Consultado julio 2010. Disponible en www.sul.org.uy.
- Uruguay. Secretariado Uruguayo de la Lana. 2010b. Producción ovina uruguaya. Consultado julio 2010. Disponible en www.sul.org.uy.

- Våge, D.I.; Klungland, H.; Lu, D.; Cone, R.D. 1999. Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. *Mammalian Genome*. 10 (1): 39-43.
- Van der Werf, J. 2007. Marked-assisted Selection in Sheeps and Goats. En: *Marked-assisted Selection. Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish*. Roma. FAO. pp. 229-247.
- Vázquez, A.I.; Gianola, D.; Bates, D.; Weigel, K.A.; Heringstad, B. 2009. Assessment of Poisson, logit, and linear models for genetic analysis of clinical mastitis in Norwegian Red cows. *Journal of Dairy Science*. 92 (2): 739-748.
- Walsh, B.; Henderson, D. 2004. Microarrays and beyond: What potential do current and future genomics tools have for breeders? *Journal of Animal Science*. 82 (13): 292-299.
- Wright, S. 1934. An analysis of variability in number of digits in an inbred strain of guinea pigs. *Genetics*. 19 (6): 506-536.

6. ANEXOS

6.1 INSTRUCCIONES PARA AUTORES JABG

<http://www.wiley.com/bw/submit.asp?ref=0931-2668&site=1>

Requirements for manuscripts

Format

The first page of the manuscript should indicate the name of the author(s), the official name of the institution(s) where the work was carried out and the corresponding author's complete mailing address (postal address, phone, fax, and e-mail address). Each original article should be divided into Summary, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and References. Summaries should not be longer than 1200 characters each.

The manuscript comprises the text, tables and captions of figures and tables. Please do not import the figures into the text file but upload them separately. Each figure, table, and bibliographical entry must have a reference in the text. Any corrections requested by the reviewer should already be integrated into the file.

When preparing your file, please use only standard fonts such as Times, Times New Roman or Arial for text, and Symbol font for Greek letters, to avoid inadvertent character substitutions. In particular, please do not use Japanese or other Asian fonts. Do not use automated or manual hyphenation. Please do not include footnotes. Manuscripts must conform to the journal style. Manuscripts not complying with the submission format will be returned to the author(s).

Authors are encouraged to visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/journal.asp> which details further information on the preparation and submission of articles and figures.

Length

Original papers should not exceed 20 typewritten pages, including illustrations, tables and references. Short Communications and Pictorial Reports that do not exceed 5 typewritten pages (10,000 characters) are preferably published.

Units, abbreviations and nomenclature

All specifications must be stated according to the S. I. system. Concentrations of chemical solutions are to be given in mol/l. All other concentrations should be given in % (volume or weight).

Any abbreviations of chemical, biological, medical or other terms should only be employed when it is certain that they are internationally known. The full name must be stated in parentheses when the abbreviation is first used.

All medical, chemical, biological or other terms should be used according to the most recent recommendations of the respective international nomenclature. Enzymes should be given in I.U. (International Units), according to 'Enzyme Nomenclature' (Elsevier Publishing Co., 1965). In the case of commercially obtained substances or reagents, when they are first mentioned in the text, the name and address of the manufacturer or supplier should be given as a footnote, including the product name and name and address of the distributor. Products with a registered trademark should be marked with ®.

Bacterial names should be in accordance with the latest edition of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (The Williams and Wilkins Co., Baltimore). Viruses are to be given the classification and names recommended by the International Committee on the Nomenclature of Viruses. Names of micro-organisms and zoological names will be printed in italics and should be underlined in the manuscript.

Illustrations and tables

The number of illustrations and tables should be kept to a minimum. Do not repetitiously show the same data in both a table and a figure. In the case of figures or tables taken from already published material, their exact source must be stated.

Figures should be saved in a neutral data format such as TIFF, PDF or EPS. Powerpoint and Word graphics are unsuitable for reproduction. Please do not use any pixel-oriented programmes. Scanned figures (only in TIFF format) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size. Please submit the data for figures in black and white. However, colour photos can be reproduced in black and white (with a possible loss of contrast). Figures printed in colour are subject to an added charge. Our colour print charges and payment policy are explained on the [Colour Work Agreement Form](#). Further prices will be quoted on demand. Colour graphics should be created using the CMYK colour palette (print colours), not RGB (monitor colours).

Numbering and lettering (maps, microscopic pictures) should be adjusted to fit within the column-width or the print area. If a figure is to be cropped, please mark the lines on a photocopy or tracing paper. Printouts should be made with a laser printer at the highest resolution (≥ 600 dpi). If artwork is to be scanned, line drawings should only be contour drawings without halftones (photo, shades of grey). Please do not use patterns for shading; rough hatching is possible.

Graphs with an x and y axis should not be enclosed in frames; use only 2-dimensional representations. Do not forget the labels and units. Captions for the figures should give a precise description of the content and should not be repeated within the figure. Tables should be created using the table function or tabs.

Detailed information on digital illustration standards is available at:
<http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Check your electronic artwork before submitting it:
<http://authorservices.wiley.com/bauthor/eacchecklist.asp>

References

Each original paper should include bibliographical references, which should be restricted to the necessary minimum (no more than 30 references). The list of references should be arranged alphabetically by the first authors' surnames.

Examples:

Standard Journal Article

Schmid, M., Saitbekova, N., Gaillard, C., Dolf, G. (1999) Genetic diversity in Swiss cattle breeds. *J. Anim. Breed. Genet.*, 116, 1-8.

Supplement

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

Books

Weir, B. S. (1996) *Genetic Data Analysis II*. Sinauer, Sunderland, MA, USA.

Chapter in a book

Alderson, G.L.H. (1991) A system to maximize the maintenance of genetic variability in small populations. In: Alderson, L. (ed.), *Genetic Conservation of Domestic Livestock*, CAB International, Wallingford, pp. 18-29.

Proceedings Paper

Gama, L. T.; Delgado, J. V. (2000) Assessing the risk status of a breed. In: Proceedings of the 5th World Conference on Conservation of Animal Genetic Resources. Brasilia (Brazil), 20-25 November 2000. CDD 591.15 Copyright EMBRAPA, Brasilia, Brasil.

Laboratory animals

In the case of a research project in which experimental animals were involved, the authors are requested to give precise details about the animals in the interest of reproducibility of the findings (e.g. source, breeding, pathogen-free, conventional, weight) and their maintenance (standard diet, environment etc.). In addition, it is necessary to document that all procedures with animals were carried out in accordance with the appropriate humane methods.

6.2 INSTRUCCIONES PARA AUTORES REVISTA AGROCIENCIA

http://www.fagro.edu.uy/agrociencia/Instr_autores_Agrociencia.pdf

Remisión y categorías de los artículos

Los trabajos puestos a consideración del Consejo editor de la Revista Agrociencia deben ser inéditos, y se enviarán como archivos electrónicos en MS-Word® a los Editores responsables: agrocien@fagro.edu.uy. El archivo se designará con el apellido y nombre del primer autor. Los trabajos pueden corresponder a las siguientes categorías:

- *Artículo de investigación*: presenta resultados de investigación original. Los artículos de investigación pueden ir bajo la forma de Comunicación breve.
- *Revisión*: por lo general es solicitada por el Consejo editor a especialistas. La revisión corresponde al análisis y sistematización de resultados de investigaciones sobre un campo en el que el o los autores tienen comprobada trayectoria.
- *Nota técnica*: incluye los resultados de investigación desde una perspectiva interpretativa y crítica sobre un tema específico, a partir de fuentes originales. Algunos ejemplos pueden ser la descripción de alguna región, una problemática socioeconómica rural o la situación de rubros de producción agropecuaria.

El artículo de investigación no debe exceder las 6.500 palabras y la Comunicación breve y la Nota técnica las 3.500 palabras. La Revisión puede extenderse hasta 8.500 palabras. Presentación. Los trabajos se enviarán en formato electrónico, en tamaño carta, a doble espacio, con fuente Times New Roman de 12 puntos, con márgenes de 3 cm en la parte superior, 2 cm en la inferior y 2,5 cm en las márgenes laterales. Las hojas se numerarán en el margen inferior derecho, y los renglones en el margen izquierdo.

Carátula. Figurará el título del trabajo en el idioma original, y el apellido y nombre del autor/es, (Ej. Rodríguez Alvaró;...), el lugar de trabajo de cada uno (identificado con el

superíndice) y la dirección postal y el correo electrónico del autor con el que se mantendrá la correspondencia relacionada al trabajo. No deben figurar títulos académicos ni cargos laborales.

Al pie de la carátula debe figurar un título abreviado del artículo para el encabezamiento de las páginas.

Títulos. El título, de no más de 15 palabras, va en minúscula y negrita, cuerpo 14; los subtítulos igual con un cuerpo de letra 12. Si hay títulos de tercer orden, irán en cursiva sin negrita.

Resumen, *Summary* y palabras clave, *key words*. El resumen en español y el *summary* en inglés, de hasta 250 palabras, irán precedidos del título del trabajo en el idioma respectivo, y seguidos de las palabras clave y *key words*. Las Palabras clave, hasta cinco, van en minúscula y separadas por comas.

Las abreviaturas deben definirse cuando se mencionen por primera vez. Se prefiere el uso de los nombres biológicos comunes, indicando el nombre científico la primera vez que se menciona la especie.

Idiomas y unidades

Los idiomas de la revista son el español y el inglés. Los trabajos se deben ajustar a las normas gramaticales que establece el Diccionario de la Real Academia Española, o a sus equivalentes en otros idiomas. Se utilizará el Sistema Internacional de Unidades (SI) y sus abreviaturas, además de unidades derivadas de éste de uso frecuente en el área en cuestión. Entre la cifra y la abreviatura de la unidad va un espacio (Ej.: 89 kg, 37° C). Entre los sitios de consulta sobre el SI referirse a: www.cem.es.

Estructura del artículo. El texto del trabajo se organiza en las siguientes secciones:

Introducción, Materiales y métodos, Resultados, Discusión, Agradecimientos, Bibliografía, Cuadros y figuras. Se podrán unificar Resultados y Discusión, e incorporar Conclusiones si se considera necesario.

Las citas bibliográficas en el texto se realizarán como [autor(es), año]. Cuando la cita tenga dos autores se usará «y» entre ambos (Ej. Böger y Sandmann 1999). Cuando sean más de dos autores se mencionará el primero seguido de la expresión “*et al*” En la sección Bibliografía, se reproducirá el título y autores según el idioma original del trabajo (Ej. Böger and Sandmann 1999). Las comunicaciones personales se citarán de igual forma, seguidas de “com. pers.”

En el texto se debe sugerir el lugar de ubicación de la tabla o figura como: intercalar Cuadro X o Figura X. Cuando el archivo sea mayor a de 500 Kb deberá comprimirse (Winzip).

Cuadros y figuras

Los cuadros y figuras deben presentarse en formato MS-Excel®, en hojas independientes con numeración consecutiva, en Times New Roman y en cuerpo 10 sin negritas (Cuadro 1, Cuadro n; Figura 1, Figura n, etc.). Figuras, tales como fotos y mapas, se presentarán en formato digital comprimido JPG (JPEG) o GIF con resolución mínima 300 dpi al tamaño definitivo (preferentemente 600 x 600 dpi).

Seguido irán los textos correspondientes a los encabezados de cuadro o pie de figura, por ej. Cuadro 1., Cuadro n, Figura 1., Figura n., etc., sin salto de página entre cada uno. En el encabezado de cuadros y pie de figuras aparecerán las abreviaciones usadas, aunque ya hayan sido definidas en el texto.

Bibliografía. Las referencias bibliográficas van al final del artículo. Los autores se ordenan por el orden alfabético de sus apellidos, y cuando se cita más de una publicación del mismo autor se ordenan cronológicamente. Los nombres de las revistas deben ir abreviados según el código internacional. En caso de no tenerlo, use su nombre completo. A continuación se detalla la forma de citar distintas fuentes.

Artículos de revistas

Autor (es), año. Título del artículo, nombre de la revista, número, página-página. Ejemplo: Zhang C., Laurent S., Sakr S., Peng L. and Bédu S. 2006. Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: a chorus of signals. *Mol. Microbiol.* 59: 367-375.

Capítulos de libros

Autor (es), año. Título del capítulo. En: título del libro, apellido de los compiladores o editores (Ed/s.), casa editora, páginas consultadas (pp). Ejemplo: Barbulova A. and Chiurazzi M. 2005. A procedure for *in vitro* nodulation studies. En: *Lotus japonicus Handbook*. Ed. Márquez A. Springer, Netherlands. pp. 83-86.

Internet

Actualmente no hay una norma reconocida en el ámbito científico sobre las citas desde medios electrónicos, pero hay consenso sobre formas en que pueden realizarse. La recomendada es: Autor (es), año. Título del artículo. En: Nombres de la publicación electrónica, del *website*, portal o página y su URL, páginas consultadas (pp. #) o páginas totales (# p.); fecha de consulta. Ejemplo: Gutiérrez, M. 2007. Siembra de olivos en el desierto palestino. En: Agricultura Tropical, <http://agrotropical.edunet.es>. 25 p.; consulta: noviembre 2006 (tomado de la Revista Colombiana de Horticultura).

Corrección para la publicación

Las pruebas de imprenta se enviarán por vía electrónica a los autores para su corrección, y deberán ser devueltas dentro del plazo que se indique.

ORGANIZACIÓN DEL TRABAJO

1. Título. El título debe incluir el tema y los objetivos del estudio, o bien resultados o conclusiones relevantes que se hayan obtenido.

2. Autor(es). De acuerdo con normas de ética, el autor es la persona que participa intelectualmente en el diseño, ejecución, análisis de los experimentos y/o redacción del artículo. Las personas que han contribuido en la donación de material biológico, trabajos de campo, análisis de laboratorio, etc., pueden ser reconocidas en la sección Agradecimientos.

3. Resumen, *Summary*. Debe contener la hipótesis del trabajo y la metodología empleada indicando la importancia del trabajo, los objetivos o preguntas a responder, y los resultados cuantificados, no solo descritos. Debe quedar clara la importancia del trabajo, así como las principales conclusiones.

4. Palabras clave, *key words*. Las palabras clave al final del resumen se usan para elaborar bases de datos, por lo que es recomendable evitar repetir palabras que figuren en el título, aunque esto no es excluyente.

5. Introducción. Esta sección contiene la hipótesis del trabajo y presenta las razones que fundamentan el fenómeno sujeto de la experimentación. Se debe presentar la información conocida y disponible que justifica la hipótesis, la cual deberá ser comprobable. Al final se deberían incluir los objetivos de la investigación. El análisis detallado de la literatura más relevante debe hacerse en Discusión y no en Introducción.

6. Materiales y métodos. Deben incluir la información precisa o la referencia que permita a otros investigadores repetir los experimentos. Es necesario establecer claramente el diseño experimental y los procedimientos estadísticos usados. Los experimentos de campo sensibles a interacciones con el ambiente deben ser repetidos las veces necesarias para asegurar la representatividad de los resultados.

7. Resultados y discusión. Estas secciones pueden presentarse juntas o separadas. Los resultados están directamente relacionados con la/s hipótesis de trabajo y la descripción y análisis se apoyarán en cuadros y figuras, con sus respectivos análisis estadísticos. En la discusión se deben interpretar los resultados obtenidos en la experimentación de modo claro y preciso, y relacionarlos con trabajos de otros investigadores, para proporcionar al lector diversas fuentes de información a efectos de aceptar o no la interpretación dada por los autores. Los argumentos presentados deben guiar hacia las conclusiones del trabajo donde se establecerán los principales hallazgos de la investigación.

8. Agradecimientos. En caso necesario, se expresará el reconocimiento a personas o instituciones, especialista/s por las contribuciones al trabajo, colaboradores de campo o laboratorio, a organismos financiadores, entidades oficiales o privadas, etc. que hayan facilitado o hecho posible la realización del trabajo.

9. Bibliografía. Evidencia el grado de actualización y pertinencia con el que se manejan los autores sobre la temática en cuestión.

10. Cuadros y figuras. Son el soporte de los resultados que, junto con el encabezado o el pie respectivamente, permiten al lector comprender lo presentado sin recurrir al texto. Las figuras (gráficas, fotos, esquemas, etc.) deben apoyar datos importantes que no hayan sido presentados en los cuadros. La revista se imprime en blanco y negro, por lo que la impresión en colores estará a cargo del autor.