



HAL
open science

Detection de QTL influençant des caractères d'importance économique présente ou à venir en ovins laitiers en France et en Italie

Francis F. Barillet, A. Carta, Daniel D. Allain, Yves Amigues, Loys L. Bodin, Sara Casu, Edmond E. Cribiu, Bertrand B. Bed'Hom, Didier Boichard, Marie Yvonne M. Y. Boscher, et al.

► To cite this version:

Francis F. Barillet, A. Carta, Daniel D. Allain, Yves Amigues, Loys L. Bodin, et al.. Detection de QTL influençant des caractères d'importance économique présente ou à venir en ovins laitiers en France et en Italie. 10. Rencontres Recherches Ruminants, Dec 2003, Paris, France. <hal-02763897>

HAL Id: hal-02763897

<https://hal.inrae.fr/hal-02763897v1>

Submitted on 4 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Détection de QTL influençant des caractères d'importance économique présente ou à venir en ovins laitiers en France et en Italie

F. BARILLET (1), A. CARTA (2), D. ALLAIN (1), Y. AMIGUES (3), L. BODIN (1), Sara CASU (2), E.P. CRIBIU (4), B. BED'HOM (3), D. BOICHARD (5), M.Y. BOSCHER (3), J.M. ELSSEN (1), A. FRAGHI (2), L. GRUNER (6), P. JACQUIET (7), S. LIGIOS (2), C. MARIE-ETANCELIN (1), L. MURA (2), G. PIREDDA (2), A. ROIG (4), R. RUPP (1), S.R. SANNA (2), A. SCALA (8), L. SCHIBLER (4), T. SECHI (2), S. CASU (2).

(1) INRA Station d'Amélioration Génétique des Animaux, BP 27, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

(2) Istituto Zootecnico e Caseario per la Sardegna (IZCS), 07040 Olmedo, Italy

(3) GIE LABOGENA, 78352 Jouy-en-Josas, cedex, France.

(4) INRA Laboratoire de génétique biochimique et de cytogénétique, 78252 Jouy-en-Josas, France

(5) INRA Station de Génétique quantitative et appliquée, 78352 Jouy-en-Josas, cedex, France.

(6) INRA Laboratoire

(7) UMR INRA-ENVT

(8) Université de Sassari

RESUME - Un programme de primo-détection de QTL en ovins laitiers a été conçu en 1997 par l'INRA et l'IZCS. Depuis 1999, sa mise en œuvre est fondée pour l'instant sur deux populations ressources : d'une part pour les primo-détections de QTL, 980 brebis back-cross Sarde x Lacaune, réparties en 10 familles de béliers F1 Lacaune x Sarde; d'autre part pour les vérifications de QTL (à partir des résultats ovins précédents ou bovins laitiers), 22 familles de "petites-filles", constituées de 783 béliers d'IA, résultant des noyaux de sélection en races pures françaises Basco-Béarnaise, Lacaune et Manech. La première population ressource, élevée en domaine expérimental de IZCS à Monastir, fait l'objet d'un grand nombre de mesures phénotypiques, pour des caractères d'importance économique présente ou à venir en ovins laitiers : croissance, format et note d'état corporel, reproduction, production laitière, production de laine, aptitude à la traite mécanique, résistance à des maladies (mammites, parasites gastro-intestinaux et oestres) et acides conjugués du lait, considérés comme protecteurs des maladies cardio-vasculaires et de certains cancers. Nous disposons actuellement (i) de premiers résultats de vérifications de QTL connus en bovins laitiers (sur la production laitière et les CCS), à partir des familles ovines françaises (ii) de premiers résultats de primo-détection pour les caractères laitiers, les acides conjugués du lait, la résistance aux nématodes et aux oestres, à partir des brebis back-cross Sarde x Lacaune. Ces premières détections ou vérifications de QTL, à partir des deux populations ressources françaises et italiennes, fournissent à la fois des résultats originaux pour tous les caractères analysés et des résultats déjà connus en bovins laitiers (pour les caractères laitiers sur BTA 14, BTA 16, BTA 20 et BTA 23) et ovins allaitants (pour les nématodes gastro-intestinaux sur OAR 3). La démarche en cours est donc prometteuse et elle va donc se poursuivre.

Detection of QTL influencing present and future economic traits in dairy sheep in France and Italy

F. BARILLET (1), A. CARTA (2), D. ALLAIN (1), Y. AMIGUES (3), L. BODIN (1), Sara CASU (2), E.P. CRIBIU (4), B. BED'HOM (3), D. BOICHARD (5), M.Y. BOSCHER (3), J.M. ELSSEN (1), A. FRAGHI (2), L. GRUNER (6), P. JACQUIET (7), S. LIGIOS (2), C. MARIE-ETANCELIN (1), L. MURA (2), G. PIREDDA (2), A. ROIG (4), R. RUPP (1), S.R. SANNA (2), A. SCALA (8), L. SCHIBLER (4), T. SECHI (2), S. CASU (2).

(1) INRA Station d'Amélioration Génétique des Animaux, BP 27, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

SUMMARY - A project of QTL detection in dairy sheep has been conceived in 1997 by INRA and IZCS. Since 1999, the on-going project is presently based on the management of two resource populations: on the one hand for primo-detections of QTL in dairy sheep, 980 backcross Sarde x Lacaune ewes, distributed in 10 families of F1 rams; on the other hand for QTL verifications (of the results from the previous dairy sheep resource population or from dairy cattle designs), 22 "granddaughter" families, composed of 783 AI rams, provided by the purebred French nucleus flocks in Basco-Bearnaise, Lacaune and Manec breeds. The first resource population has been bred in an experimental farm of IZCS called Monastir and has been recorded on numerous traits, presently or for the futur economically importants: growth rate as lamb, body weight and body condition score as adult ewe, reproduction, milk production, wool production, milkability, resistance to diseases (mastitis, nematode parasites, oestrus ovis), and conjugated linoleic acid (CLA) in milk, because of its possible effect on human health. We have got presently (i) first results of QTL verifications (for QTL known in dairy cattle for milk traits and SCS) from French families (ii) first results of primo-detection of QTL for milk traits, CLA in milk, nematode parasites and oestrus ovis resistances, from backcross ewes. These first detections or verifications of QTL in the French and Italian resource populations give us both original results for all the analysed traits and known results in dairy cattle (for milk traits on BTA 14, BTA 16, BTA 20 et BTA 23) and in meat sheep (for nematode parasites resistance on OAR 3). The on-going approach is thus promising.

INTRODUCTION

Dans des pays comme la France, l'Italie et l'Espagne, les ovins laitiers ont été sélectionnés efficacement pour les caractères laitiers. Dans la dernière décennie, les efforts de recherche et de sélection ont concerné des nouveaux caractères d'aptitudes fonctionnelles et de résistance aux maladies, impliqués dans la réduction des coûts de production, l'amélioration de la productivité du travail (de traite), les conditions de production et de bien-être des animaux, et la qualité et sécurité alimentaire des produits. Pour répondre à ces nouveaux objectifs, les recherches en cours combinent approches classiques de génétique quantitative et détection de QTL. En effet, la connaissance et valorisation de QTL seraient particulièrement adaptées pour des caractères difficiles ou coûteux à mesurer, deux caractéristiques souvent rencontrées pour ces nouveaux caractères visés en brebis laitières. C'est pourquoi, un programme de primo-détection de QTL en ovins laitiers a été conçu en 1997 par le département de génétique animale de l'INRA et l'Istituto Zootechnico e Caseario per la Sardegna (IZCS). Ce programme a débuté conjointement en 1999 en France et Sardaigne. Il est fondé sur deux populations ressources.

1. LES DEUX POPULATIONS RESSOURCES ET LA STRATEGIE DE DETECTION DE QTL

La première population ressource est composée de brebis back-cross Sarde x Lacaune, procréées spécifiquement dans un domaine expérimental de IZCS, en vue de primo-détection de QTL en ovins laitiers. Elle a donc fait l'objet d'un génome scan et de mesures phénotypiques portant sur un grand nombre de caractères.

La deuxième population correspond à un protocole dit "petites filles" (Weller *et al.*, 1990), issues de grands-pères et pères d'IA de races pures françaises (Basco-Béarnaise, Lacaune, Manech). Découlant des noyaux de sélection existants, cette deuxième population ressource est destinée à vérifier des QTL détectés sur les mêmes caractères, soit en bovins laitiers, soit en ovins laitiers à partir de la première population ressource (Barillet, 1999).

1.1. LA POPULATION RESSOURCE DE BREBIS BACK-CROSS SARDE X LACAUNE

Le recours au croisement entre races permet de créer des déséquilibres de liaison pour des gènes différenciant entre elles. Le choix des races Lacaune (France) et Sarde (Italie) était motivé, d'une part parce qu'il s'agit des principales races laitières des deux pays, d'autre part parce qu'elles se discriminent sur nombre de caractères (format, croissance, prolificité, morphologie mammaire, vitesse de traite, laine...), avec de plus des historiques de sélection laitière très différents (Barillet *et al.*, 2001 ; Carta *et al.*, 2002). La population ressource a été produite en 1999, par l'IZCS et l'INRA, à partir de 10 béliers F1 Lacaune x Sarde accouplés à 2900 brebis Sarde. Elle est constituée de 980 brebis back-cross Sarde x Lacaune, réparties en 10 familles de pères F1, élevées au domaine expérimental de Monastir de l'IZCS (sud de la Sardaigne). En 2003, ces brebis sont en quatrième lactation. Elles ont fait l'objet d'un grand nombre de mesures phénotypiques pratiquées par l'IZCS, l'INRA, l'Université de Sassari et l'ENVT de Toulouse (tableau 1): croissance, format, reproduction, production laitière, production de laine,

aptitude à la traite mécanique; résistance à des maladies (mammites, parasites gastro-intestinaux, oestres), et qualité des produits (acides conjugués du lait, synthétisés uniquement dans les produits animaux et considérés comme protecteurs des maladies cardiovasculaires et de certains cancers).

Tableau 1 : Description des principaux caractères mesurés

Caractères	Périodicité/outils de mesure
Production laitière Production journalière Taux butyreux et protéique	3 fois par mois éprouvettes électroniques INRA
Croissance (agnelles) Poids corporel et note d'état (brebis adultes)	pesées bi-mensuelles pesées et notations mensuelles
Production de laine Poids Qualité	pesée annuelle mesures objectives et scores
Facilité de traite cinétiques de traite morphologie mammaire	3 fois par mois (épr. INRA) pointages mensuels photos numériques (1 fois/an)
Résistance aux mammites	CCS 3 fois par mois détection mammites cliniques
Résistance aux nématodes gastro-intestinaux Résistance aux oestres	comptages œufs dans les fèces (OPG) 1 à 2 fois par an test ELISA antigène 1 fois par an et score infection
Reproduction Taux d'ovulation Fertilité (après synchronisation) prolificité désaisonnement mortalité embryonnaire	endoscopie 1 fois par an date d'agnelage sur cycle contrôlé taille de portée à l'agnelage dosage de progestérone dosage PSPB
Qualité du lait Acides conjugués du lait	chromatographie en phase gazeuse 1 fois par an

1.2. LA POPULATION RESSOURCE DE FAMILLES DE "PETITES-FILLES"

Les familles "petites-filles" impliquent 3 générations, les pères d'IA, leurs fils et leurs petites-filles. Seuls les pères et fils sont génotypés, tandis que les petites filles sont mesurées sur les caractères actuellement contrôlés dans les noyaux de sélection ovins laitiers français (tableau 2).

Tableau 2 : Description des principaux caractères mesurés dans les noyaux de sélection français

Caractères
Production laitière : quantité et composition (TB, TP) du lait
Résistance aux mammites : CCS du lait
Morphologie mammaire : pointages de mamelles
Reproduction : prolificité, fertilité femelle

Cette deuxième population ressource est composée de 22 familles (Basco-Béarnaise, ou Lacaune, ou Manech) de "petites-filles", constituées à partir de 783 béliers d'IA, organisée suite au stockage depuis 1996 à LABOGENA de l'ADN de tous les béliers d'IA des races pures françaises. Il existe une connexion entre les deux populations ressources, via 8 des 10 pères des 10 béliers F1 Sarde x Lacaune, qui sont aussi 8 grands-pères parmi les 22 familles de "petites-filles".

2. LE MARQUAGE MOLECULAIRE

Les marqueurs génétiques, qui ont été utilisés pour la détection des QTL, sont des marqueurs microsatellites : le panel de marqueurs a été constitué par le laboratoire INRA LGBC, dans l'optique de couvrir les 26 chromosomes ovins autosomaux (génom scan), avec, si possible, une distance maximum entre marqueurs d'environ 20 à 30 cM. Un réseau de près de 140 marqueurs a été choisi.

Conformément à la stratégie de détection de QTL décrite auparavant, seule la population back-cross a fait l'objet d'un génom scan, réalisé à 90 % par l'IZCS et 10 % par LABOGENA et LGBC (tableau 3). La population de "petites-filles" a fait l'objet de typages sélectifs par LGBC, dans 7 régions chromosomiques, pour 13 des 22 familles. Il est prévu pour les 22 familles un deuxième typage de 16 des 26 chromosomes, choisis au vu des résultats de QTL des back-cross Sarde x Lacaune et des bovins laitiers.

Tableau 3 : Description des typages par marqueurs microsatellites réalisés ou prévus dans les deux populations ressources

Population ressource	Stratégie de typages	Nombre de typages
"petites-filles"	Choix de 7 régions chromosomiques (*) et 2 à 4 marqueurs par région	13 des 22 familles 20 marqueurs 8380 typages
Back-cross	Génom scan Panel de 131 marqueurs	129 908 typages sur 26 chromosomes
"petites-filles"	Choix de 16 chromosomes (**)	22 familles <i>typages à faire</i>

(*) en fonction de résultats bovins laitiers

(**) en fonction de résultats bovins laitiers et des back-cross

Les résultats du génom scan des back-cross Sarde x Lacaune sont résumés au tableau 4. Le pourcentage moyen de méioses informatives est calculé comme le rapport du nombre de filles pour lesquelles il a été possible d'identifier l'allèle marqueur reçu du père sur le nombre total de filles. Le marquage des 26 chromosomes a été réalisé. La considération de la longueur du segment analysé par rapport à la longueur totale du chromosome ou du pourcentage de méioses informatives révèle les limites de marquage de certains chromosomes de cette population ressource, pour lesquels on prévoit le typage de quelques marqueurs supplémentaires.

3. ANALYSES STATISTIQUES

La détection de QTL a été réalisée selon la méthodologie proposée par Knott *et al.* (1996) et Elsen *et al.* (1999), chromosome par chromosome, à toutes les positions avec un pas de 1cM, à l'aide d'un modèle de régression multiple intra-père, en utilisant le logiciel INRA QTLMAP.

Les seuils de rejet ont été estimés par 10,000 permutations intra-famille (Churchill et Doerge, 1994), pour chaque caractère et chromosome.

Tableau 4 : Statistiques du génom scan des 10 familles back-cross Sarde x Lacaune

Chromosome Ovin (OAR)	Longueur totale du chromosome (cM Haldane)	Longueur du segment analysé (cM Haldane)	Nombre de marqueurs analysés	pourcentage moyen de méioses informatives
OAR 1	346	307	16	0,60
OAR 2	306	300	12	0,50
OAR 3	315	247	10	0,52
OAR 4	134	126	6	0,52
OAR 5	150	95	3	0,64
OAR 6	157	123	6	0,58
OAR 7	145	107	6	0,38
OAR 8	126	61	3	0,59
OAR 9	126	82	5	0,61
OAR 10	100	86	4	0,67
OAR 11	127	62	4	0,44
OAR 12	102	96	6	0,58
OAR 13	137	102	5	0,48
OAR 14	118	93	5	0,81
OAR 15	124	51	2	0,65
OAR 16	87	71	4	0,62
OAR 17	122	98	4	0,59
OAR 18	122	89	6	0,51
OAR 19	72	57	4	0,58
OAR 20	87	32	3	0,62
OAR 21	75	60	5	0,66
OAR 22	83	62	3	0,51
OAR 23	73	33	2	0,66
OAR 24	97	14	2	0,53
OAR 25	69		1	0,46
OAR 26	70	63	4	0,55

4. DETECTION DE QTL

La vérification de QTL, à partir de 13 familles de "petites-filles" Lacaune ou Manech, a concerné 7 régions chromosomiques identifiées en bovins laitiers comme présentant des QTL pour les caractères laitiers ou les CCS (mammites) du lait (Schibler *et al.*, 2002).

Le génom scan des back-cross Sarde x Lacaune étant disponible depuis 2003, les analyses de primo-détection de QTL sur l'ensemble des caractères décrits au tableau 1 sont actuellement en cours. Nous présentons ici les premiers résultats de détection intéressant la production laitière (3 premières lactations), la résistance aux nématodes gastro-intestinaux (2 séries à dominante *Haemonchus contortus*) et aux oestres (2 mesures en 2001 et 2002), et les acides conjugués du lait (2 mesures en 2001 et 2002).

Dans tous les cas, les résultats sont présentés par probabilités d'erreur de première espèce croissantes, avec un risque d'erreur de faux positifs inférieur à 0,1 %, compris entre 0,1 et 1 %, et entre 1 et 5 %, et par types de caractères et chromosomes (tableaux 5 et 6).

4.1. L'EXPLORATION DE 7 REGIONS CHROMOSOMIQUES DE 13 FAMILLES DE "PETITES-FILLES" LACAUNE OU MANECH

En accord avec des résultats homologues bovins laitiers (Bovenhuis et Schrooten, 2002 ; Boichard *et al.*, 2003), des QTL pour le taux butyreux (TB), le taux de protéine et la quantité de protéine ont été détectés sur les chromosomes ovins 9, 5 et 6 respectivement (tableau 5). Le QTL le plus significatif a été trouvé pour le TB sur OAR 9. Sur le chromosome homologue 14 bovins (BTA 14), ce QTL a été identifié comme étant le gène DGAT1 (Grisart *et al.*, 2002). Il importe de le vérifier en ovins. En revanche, pour les CCS du lait, les 2 QTL détectés sur OAR 6 et OAR 16 ne seraient pas homologues de QTL en bovins laitiers, au moins pour OAR 6 (BTA 6).

Tableau 5 : Liste de QTL détectés dans les 13 familles de "petites-filles" et 7 régions explorées

Caractère	Chromosome	Localisation la plus probable (cM)	Marqueur proche
Probabilité < 0,1 %			
Production laitière (*)			
Taux butyreux	OAR 9	12	CSSM66
0,1 % < Probabilité < 1 %			
Mammites			
CCS du lait	OAR 16	14	BM1225
1 % < Probabilité < 5 %			
Production laitière (*)			
Taux de protéine	OAR 5	106	BMS2258
Quantité de protéine	OAR 6	34	OARAE101
Mammites			
CCS du lait	OAR 6	20	OARAE101

4.2. LE GENOME SCAN DES 10 FAMILLES BACK-CROSS SARDE X LACAUNE

Pour la production laitière, les QTL les plus significatifs sont localisés sur OAR 3 (BTA 5 et BTA 11), OAR 4 (BTA 4), OAR 8 (BTA 9), OAR 12 (BTA 16), OAR 16 (BTA 20) et OAR 20 (BTA 23) (tableau 6). En première approche, il semble donc exister des homologues entre ovins et bovins laitiers, au moins pour BTA 16, BTA 20 et BTA 23 (Bovenhuis et Schrooten, 2002). Des vérifications détaillées s'imposent, d'autant que les QTL détectés en ovins laitiers concernent souvent au moins 3 des 5 caractères laitiers : la question de pléiotropie ou de l'existence de plusieurs QTL doit donc être abordée.

Pour les nématodes, les résultats avec les 2 séries de mesures à dominante *Haemonchus contortus* indiquent 2 QTL putatifs sur OAR3 (déjà cité dans la littérature en ovins allaitants) et sur OAR 21. **Pour les oestres**, on détecte un QTL sur OAR 2 (tableau 6).

Pour les acides conjugués du lait (ACL), le résultat original (toutes espèces laitières) le plus significatif concerne le QTL pour le rapport ACL/acide vaccénique sur OAR 22, où est localisé le gène SDC codant pour la delta 9-désaturase impliqué dans la synthèse de ACL (Carta *et al.*, 2003).

CONCLUSION

Dans un premier temps, il importe de terminer les analyses de primo-détection de QTL pour tous les caractères mesurés sur les brebis back-cross Sarde x Lacaune. Puis des vérifications de QTL seront entreprises à partir des 22 familles de "petites-filles" françaises.

Ensuite, les perspectives concernent (i) la procréation de familles 7/8 Sardes pour vérifications par IZCS des QTL en race Sarde (ii) le projet INRA, partagé avec IZCS pour le volet ovin, de cartographie fine de QTL de grandes régions

en partie communes aux bovins laitiers (programme SAM avec l'UNCEIA - Boichard *et al.*, 2002 -) et aux ovins laitiers, en vue d'une localisation très précise de plusieurs dizaines de QTL, voire la connaissance des gènes impliqués. L'objectif est d'arriver à une sélection fondée sur les haplotypes (SAM de deuxième génération), voire à une sélection assistée par gène (SAG), qui semblent seules réalistes au plan économique en ovins laitiers, par opposition à la SAM actuelle de première génération pratiquée en bovins laitiers en France.

Tableau 6 : Liste de QTL détectés dans les 10 familles de brebis back-cross Sarde x Lacaune

Caractère	Chromosome	Localisation la plus probable (cM)	Marqueur proche
Probabilité < 0,1 %			
Production laitière (*)			
Quantité de lait	OAR 3	166	BMC1009
Quantité de protéine	OAR 3	164	BMC1009
Taux butyreux	OAR 20	28	OARHH56
0,1 % < Probabilité < 1 %			
Production laitière (*)			
Taux de protéine	OAR 1	98	MCM058
Quantité mat. grasse	OAR 4	38	BMS1237
Quantité mat. grasse	OAR 8	30	BMS1290
Quantité de lait	OAR 16	34	MAF214
Quantité de lait	OAR 20	0	BM1258
Quantité mat. grasse	OAR 20	2	BM1258
Quantité de protéines	OAR 20	0	BM1258
Nématodes (**)			
OPG	OAR 3	242	BMS0772
OPG	OAR 21	4	ILSTS019
Acides conjugués lait			
ACL	OAR 14	56	BM7109
ACL	OAR 19	64	LSCV14
ACL/AVL	OAR 22	54	BM4505
1 % < Probabilité < 5 %			
Production laitière (*)			
Quantité mat. grasse	OAR 3	166	BMC1009
Taux butyreux	OAR 3	142	BMS2569
Quantité de lait	OAR 4	42	BMS1237
Quantité de protéines	OAR 4	42	BMS1237
Taux butyreux	OAR 7	20	BMS0861
Quantité de lait	OAR 8	26	BMS1290
Quantité de protéines	OAR 8	24	BMS1290
Quantité de protéines	OAR 12	70	LSCV38
Taux de protéine	OAR 12	66	LSCV38
Quantité mat. grasse	OAR 14	22	BMS2213
Quantité mat. grasse	OAR 16	34	MAF214
Quantité de protéines	OAR 16	34	MAF214
Oestres (***)			
Test ELISA	OAR 2	242	BM6444

(*) trois premières lactations

(**) 2 mesures d'OPG à dominante *Haemonchus contortus*

(***) 2 dosages ELISA en 2001 et 2002.

Ce programme a bénéficié du contrat Européenne QLRT-1999-30656.

- Barillet F, 1999.** QLRT-1999-30656, 5^{ème} PCRDT
Barillet F et al., 2001, Livest. Prod. Sci. 71 : 17-29
Boichard D et al., 2002, 7th WCGALP, N° 22-03
Boichard D et al., 2003. Genet. Sel. Evol. 35 (2003) 77-101
Bovenhuis H, Schrooten C, 2002. 7th WCGALP, N° 09-07
Carta A. et al., 2002. 7th WCGALP, N° 01-40.
Carta A. et al., 2003, 54th EAAP annual meeting, Genetics, S VI
Churchill, G.A et Doerge, R.W, 1994, Genetics 138: 963-971.
Elsen, J.M. et al., 1999, Genet. Sel. Evol. 31: 213-224.
Grisart, B et al., 2002, Genome Res. 12 : 222-231.
Schibler L et al., 2002. 7th WCGALP, N° 01-41.
Weller, J.I, et al., 1990, J. Dairy Sci. 73 : 2525-2537.