



**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC**

**ANÁLISIS DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS
DE LOS POLIMORFISMOS PRESENTES EN LOS GENES *BMP15* Y
GDF9 RELACIONADOS CON LA PROLIFICIDAD EN OVINOS DE
PELO (*Ovis aries*).**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

IB. RAQUEL ANAHI ESCOBAR CHAPARRO

ASESOR:

DR. JOSÉ ABAD ZA VALETA

CO-ASESOR:

DR. JULIÁN MARIO PEÑA CASTRO

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA, 2019

DEDICATORIAS

*Dedico este trabajo de culminación de estudios
en primera instancia a mi Madre por darme
la vida y hacer de mí una persona que lucha
por sus sueños a pesar de las adversidades.*

AGRADECIMIENTOS

A mi Madre

Por ser la luz y mi esperanza de cada uno de mis días, la persona más especial en mi vida, por todos sus sabios consejos y amor incondicional, por creer en mí y por enseñarme con su ejemplo a ser una persona luchadora con buenos valores éticos y morales.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE FIGURA	8
ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN	11
SUMMARY	13
INTRODUCCIÓN	14
ANTECEDENTES	16
2.1 Generalidades de los ovinos.....	16
2.2 Situación actual en la producción de ovinos en México.....	16
2.3 Producción mundial, nacional y estatal de ovinos.....	17
2.4 Razas más explotadas en la región del Papaloapan.....	19
2.4.1 Black Belly (BB)	20
2.4.2 Pelibuey (PB).....	20
2.4.3 Dorper (DP).....	21
2.4.4 Katahdin (KT)	21
2.6 Importancia del mejoramiento genético en el ganado ovino.	22
2.7 Genes importantes en la tasa de ovulación ovina.....	23
2.8 Gen Boorola: Mutación FecB (<i>BMPR-IB</i>).....	24
2.9 Gen Inverdale: Mutación FecX (<i>BMP15</i>).....	24
2.10 Gen de alta fertilidad: FecG ^H (<i>GDF9</i>)	26
2.11 Gen Receptor de la Hormona Folículo-Estimulante (FSHR)	28
2.12 Efectos de las mutaciones de genes mayores sobre la foliculogénesis y la tasa de ovulación.....	29
2.13 Función sinérgica de los genes BMP15 y GDF9 sobre la dinámica folicular.	30
2.14 Métodos moleculares para el diagnóstico de genes relacionados con la prolificidad ...	32
JUSTIFICACIÓN	36
HIPÓTESIS	37
OBJETIVOS.....	37
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	38
6.1 Búsqueda e identificación de animales con parto múltiple.....	38
6.2 Toma de muestras sanguíneas.	39

6.3 Extracción de ADN sanguíneo de ovinos.....	39
6.4 Diseño de secuencias sintéticas.....	39
6.5 Diseño de oligonucleótidos.....	41
6.6 Amplificación de las secuencias control.....	42
6.7 Amplificación de las muestras de ADN de ovino.....	42
6.8 Análisis HRM (High Resolution Melt Analysis).....	43
6.9 Análisis estadístico.....	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
7.1 Muestreo de la Población.....	44
7.2. Análisis HRM (High Resolution Melt Analysis) para la detección de polimorfismos en el gen <i>GDF9</i> y <i>BMP15</i>	48
7.2.1 Identificación del SNP G1 en el gen <i>GDF9</i>	48
7.2.2 Identificación del SNP G4 en el gen <i>GDF9</i>	49
7.2.3 Identificación del SNP G6 en el gen <i>GDF9</i>	50
7.2.4 Identificación del SNP G7 en el gen <i>GDF9</i>	50
7.2.5 Identificación del SNP B2 en el gen <i>BMP15</i>	51
7.2.6 Identificación del SNP B5 en el gen <i>BMP15</i>	52
7.3 Análisis estadístico de la población ovina.....	53
7.3.1 SNP G1 en el gen <i>GDF9</i>	53
7.3.2 SNP G4 en el gen <i>GDF9</i>	54
7.3.3 SNP G6 en el gen <i>GDF9</i>	54
7.3.4 SNP G7 en el gen <i>GDF9</i>	55
7.3.5 SNP B2 en el gen <i>BMP15</i>	56
7.3.6 SNP B5 en el gen <i>BMP15</i>	57
7.3.4 Combinaciones estadísticas de las frecuencias alélicas y genotípicas el gen <i>GDF9</i> y <i>BMP15</i>	58
7.4 Combinaciones alélicas de los polimorfismos encontrados en la población ovina.....	63
7.4.1 Combinaciones alélicas de los individuos con registro de parto múltiple.....	65
CONCLUSIONES.....	69
PERSPECTIVAS.....	70
REFERENCIAS.....	71
ANEXO A. SECUENCIA DEL GEN <i>GDF9</i> (AF078545.2).....	81
ANEXO B. SECUENCIA DEL GEN <i>BMP15</i> (AH009593.2).....	83
ANEXO C. SNP'S DEL GEN <i>GDF9</i> Y <i>BMP15</i> EN LA POBLACIÓN OVINA.....	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Polimorfismos del gen BMP15 que afectan la fecundidad en ganado ovino (Hanrahan <i>et al.</i> , 2004, Vacca <i>et al.</i> , 2010).....	26
Tabla 2. Polimorfismos del gen GDF9 que afectan la fecundidad en ganado ovino (Hanrahan <i>et al.</i> , 2004).....	28
Figura 6. Estrategia experimental. Se observa la ruta para la identificación de polimorfismos presentes en ovejas con características fenotípicas de las razas: Pelibuey (PB), Black Belly (BB), Katahdin (KT), Dorper (DP) y Cruzas.	38
Tabla 3. Secuencias control utilizadas para el análisis HRM del gen BMP15.....	40
Tabla 4. Secuencias control utilizadas para el análisis HRM del gen GDF9.....	40
Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en la amplificación del gen BMP15 y GDF9	41
Tabla 6. Protocolo de la mezcla de reacción Maxima SYBR Green qPCR.....	42
Tabla 7. Protocolo del termociclador Pikoreal96	43
Tabla 8. Número de hembras con incidencia de parto múltiple (doble) en las razas PB, BB, KT, DP y sus cruas.....	45
Tabla 9. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para el SNP G1	53
Tabla 10. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para el SNP G4	54
Tabla 11. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para el SNP G6.	55
Tabla 15. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para el SNP G1 en distintas razas.	60
Tabla 16. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para el SNP G4 en distintas razas.	60
Tabla 17. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para el SNP G6 en distintas razas.	61
Tabla 18. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para el SNP G7 en distintas razas.	61

Tabla 19. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para el SNP B2 en distintas razas.62

Tabla 20. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para el SNP B5 en distintas razas.62

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Producción y precio nacional de carne en canal de ovinos. Fuente: INEGI, FAO y OCDE. Estadísticas de Sacrificio de Ganado en Rastros Municipales y Consumo de Carne de ovino (2019).	18
.....	19
Figura 2. Producción y precio estatal (Oaxaca) de carne en canal de ovinos. Fuente: INEGI Estadísticas de Sacrificio de Ganado en Rastros Municipales (2019).....	19
Figura 3. Ovinos de pelo mayormente explotados en la cuenca del Papaloapan con características fenotípicas de: A) Black Belly, B) Pelibuey C) Dorper D) Katahdin y E) sus cruzas.....	20
Figura 4. Polimorfismos del gen <i>BMP15</i> ubicado en el cromosoma X.....	25
Figura 5. Polimorfismos del gen <i>BMP15</i> ubicado en el cromosoma 5.....	27
Figura 6. Representación esquemática de los efectos de una mutación en un gen de fecundidad (Fec) sobre la foliculogénesis y tasa de ovulación en ovinos (Fabre, 2006).....	30
Figura 7. Modelo de regulación en las células de la granulosa de ovocitos humanos y ovinos	32
Figura 8. Estrategia experimental.	38
Figura 9. Porcentajes de animales muestreados respecto a sus características fenotípicas y fertilidad.	46
Figura 10. Análisis HRM para el polimorfismo G1: A. Curvas de disociación que indican la desnaturalización de los productos de qPCR en controles sintéticos y muestras.	49
Figura 11. Análisis HRM para el polimorfismo G4: A. Curvas de disociación de los productos de qPCR en controles sintéticos y muestras.	49
Figura 12. Análisis HRM para el polimorfismo G6: A. Curvas de disociación de los productos de qPCR en controles sintéticos y muestras.	50
Figura 13. Análisis HRM para el polimorfismo G7: A. Curvas de disociación de los productos de qPCR en controles sintéticos y muestras. B. Diferencia de fluorescencia de los controles sintéticos GDF9PSG7, GDF9NSS7 y muestras.	51
Figura 14. Análisis HRM para el polimorfismo B2: A. Curvas de disociación de los productos de qPCR en controles sintéticos y muestras.	52
Figura 15. Análisis HRM para el polimorfismo B5: A. Curvas de disociación de los productos de qPCR en controles sintéticos y muestras.	52

Figura 16. Frecuencias genotípicas esperadas ($p^2 + 2pq + q^2$) para los polimorfismos G2, G4, G6 y G7 en el gen <i>GDF9</i>	56
Figura 18. Combinaciones alélicas de los polimorfismos G1,	64
Figura 19. Combinaciones alélicas de los individuos analizados con registro de parto doble..	66
Figura 20. Combinaciones alélicas de los individuos analizados en la raza Pellibuey.....	84
Figura 21. Combinaciones alélicas de los individuos analizados en la raza Black Belly.....	84
Figura 22. Combinaciones alélicas de los individuos analizados en la raza Katahdin.	85
Figura 23. Combinaciones alélicas de los individuos analizados en la raza Dorper.	85
Figura 24. Combinaciones alélicas de los individuos analizados en cruas de ovino.	85

ABREVIATURAS

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

GDF9: Growth/differentiation factor 9

BMP15: Bone Morphogenetic Protein 15

qPCR: Quantitative polymerase chain reaction

HRM: High Resolution Melting

TO: Tasa de ovulación.

Black Belly: BB

Pelibuey: PB

Dorper: DP

Katahdin: KT

QTL (Quantitative Trait Locus)

TGF- β : transforming growth factor β

GDFs: Growth/differentiation factors

BMP's: Bones Morphogenetics Proteins

BMPR-1B: Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1B

FSHR: Follicle Stimulating Hormone Receptor

Fec: Fecundidad

FSH: Follicle Stimulating Hormone

LH: Luteinizing Hormone

UPO: Unidades de Producción Ovinas

RESUMEN

La prolificidad, es una característica importante en el mejoramiento genético de ovinos, siendo una alternativa que promete una mayor producción con el aumento de partos múltiples usando continuamente los animales portadores, para aumentar la frecuencia del gen en los rebaños. Este carácter es el resultado de un proceso fisiológico complejo que se encuentra modulado por factores ambientales, factores neuroendocrinos y factores genéticos que constantemente interactúan en el animal. Los genes con efecto sobre la reproducción son analizados desde hace varios años para poder utilizarlos en el mejoramiento animal. En este estudio se reporta la detección de los SNP's (Single Nucleotide Polymorphism) G1, G4, G6 y G7 presentes en el gen *GDF9* (Growth/differentiation factor 9), así como también B2 y B5 ubicados en el gen *BMP15* (Bone Morphogenetic Protein 15) en ovinos de pelo: Katahdin (KT), Pellibuey (PB), Black Belly (BB), Dorper (DP) y Cruzas.

Mediante la técnica de qPCR (Quantitative polymerase chain reaction) se realizó la amplificación de regiones específicas que presentan mutaciones ligadas a este carácter, se analizaron las diferencias alélicas mediante el análisis HRM (High Resolution Melting), utilizando como agente intercalante al fluoróforo SYBR Green, con un incremento de temperatura de 0.04°C dentro de un rango de 65°C a 95°C. Los polimorfismos encontrados en la población de la región del Papaloapan fueron G1 con una frecuencia genotípica del 0.35 (GG), 0.37 (AG) y 0.28 (AA), G4 con una frecuencia genotípica del 0.73 (GG), 0.19 (AG) y 0.08 (AA), G6 con una frecuencia genotípica del 0.53 (GG), 0.28 (AG) y 0.19 (AA) y G7 con una frecuencia genotípica del 0.99 (GG), 0.0 (AG) y 0.01 (AA) presentes en el gen *GDF9*. Por otra parte, los polimorfismos hallados en el gen *BMP15* fueron B2 con una frecuencia genotípica del 0.35 (CC), 0.37 (CT) y 0.28 (TT) y para B5, 0.35 (GG), 0.37 (AG) y 0.28 (AA). Estos resultados muestran que los ovinos de pelo en la región del Papaloapan presentaron la incidencia de genotipos de los SPN's relacionados con la prolificidad, lo cual podría ser un importante aporte como antecedente para posteriores estudios de las mutaciones del gen *GDF9* y *BMP15*. Los SNP's que han sido utilizado como marcadores son G1, G4, G7 y B5, los cuales ya han sido reportados como responsables de la prolificidad en ovinos de otras razas y pertenecientes a otras regiones, mientras que G6 y B2 han sido asociados a esterilidad, lo que permite usarlos como diagnóstico productivo y reproductivo. La importancia de la detección de estos polimorfismos radica en que aquellos individuos que son identificados con alguno de

estos polimorfismos antes mencionados permitirán aumentar la eficiencia de producción de un rebaño, ya sea incrementando la incidencia del gen en los rebaños o creando estrategias reproductivas que permitan alcanzar mayor productividad.

Palabras clave: Genes de fecundidad, polimorfismos, HRM, mejoramiento genético, ovinos.

SUMMARY

Prolificity is an important characteristic in the genetic improvement of sheep, being an alternative that promises a greater production with the increase of multiple parts continuously using carrier animals, to increase the frequency of the gene in the herds. This character is the result of a complex physiological process that is modulated by environmental factors, neuroendocrine factors and genetic factors that constantly interact in the animal. The major genes with effect on reproduction will be analyzed for several years to be able to use them in animal breeding. In this study the detection of SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) G1, G4, G6 and G7 is reported in the GDF9 gene (Growth / differentiation factor 9), as well as B2 and B5 in the BMP15 gene (Bone Morphogenetic Protein 15) in hair sheep: Katahdin (KT), Pellibuey (PB), Black Belly (BB), Dorper (DP) and admixed individuals.

Using the qPCR technique (quantitative polymerase chain reaction) the amplification of specific regions with mutations linked to this character was performed, allelic differences were analyzed by HRM analysis (high resolution fusion), using as intercalating agent a SYBR Green, with a temperature increase of 0.04 ° C within a range of 65 ° C to 95 ° C. The polymorphisms found in the population of the Papaloapan region were G1 with a genotypic frequency of 0.35 (GG), 0.37 (AG) and 0.28 (AA), G4 with a genotypic frequency of 0.73 (GG), 0.19 (AG) and 0.08 (AA), G6 with a genotypic frequency of 0.53 (GG), 0.28 (AG) and 0.19 (AA) and G7 with a genotypic frequency of 0.99 (GG), 0.0 (AG) and 0.01 (AA) present in the GDF9 gene. On the other hand, the polymorphisms found in the BMP15 gene were B2 with a genotypic frequency of 0.35 (CC), 0.37 (CT) and 0.28 (TT) and for B5, 0.35 (GG), 0.37 (AG) and 0.28 (AA). These results show that hair sheep in the Papaloapan region have the incidence of SNP's genotypes related to prolificacy, which could be important information as background for subsequent studies of GDF9 and BMP15 gene mutations. Taking into account that SNPs have been used as markers are G1, G4, G7 and B5, which have already been reported as responsible for prolificity in sheep of other races and belonging to other regions, while G6 and B2 have been associated to sterility, which provides a productive and reproductive diagnosis. The importance of the detection of these radical polymorphisms in those individuals who are identified with some of these polymorphisms before the increase in the production efficiency of a herd occurs, either the sea increasing the incidence of the gene in the herds or creating Reproductive strategies that can achieve mayor productivity.

Keywords: BMP15, GDF9, HRM, polymorphisms, prolificity, sheep.

INTRODUCCIÓN

En México, la producción de carne de ovino se desarrolla bajo diferentes condiciones, usando nuevas tecnologías o utilizando los sistemas de pastoreo. Las razas que se explotan en forma intensa son Dorset, Pelibuey, Black Belly, Katahdin, Dorper, Rambouillet, Suffolk y Hampshire, que componen el total del inventario ovino mexicano (Arteaga, 2012). En la región del Papaloapan se encuentran las razas Pelibuey, Black Belly, Katahdin, Dorper y sus cruza.

La ovinocultura es una práctica ganadera intensiva que a nivel global produjo en 2016 según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) 9 millones 310 mil 532 ton de carne y que, en México hasta noviembre del 2018, 56 mil 683 ton, casi 2% más que en 2017. De acuerdo con previsiones de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) y la FAO, para el año 2026 el consumo mundial de este tipo de carne llegará a 2.1 kilogramos per cápita de forma anual.

En un registro que contempla un periodo de 13 años, del 2000 al 2013, los países que contabilizaron un mayor crecimiento en su hato ganadero fueron Arabia Saudita y Argelia, con aumentos cercanos a los 5 millones de cabezas; en contraste, las naciones que presentaron un menor censo son Australia, Nueva Zelanda y la Unión Europea; en México el censo alcanza 8 millones 902 mil 451 ovinos.

La producción de carne de ovino en México creció 23% en un periodo de 10 años, de 2008 a la fecha y la población lo hizo en 14.7% en igual período, este tipo de cárnico apenas representa 0.5% de la producción global, siendo México (14.1%), Hidalgo (10.9%) y Veracruz (8.2%), las entidades que más aportaron al total nacional (AgroMeat, 2019).

En cuanto a la demanda, el Sistema Productivo Ovino (SPO), el consumo total del cárnico es de 76 mil ton (700 gramos per cápita aproximadamente) de los cuales 70% pertenecen a la producción local, mientras que el 30% restante corresponden a las importaciones.

En febrero del presente año (2019), se reportó que la producción de carne registrada, obtenida de sacrificios de ganado en rastros municipales por entidad federativa fue de 2,661 ton, principalmente por la producción en canal obtenida en Aguascalientes, Estado de México, Jalisco, Querétaro, Guanajuato, Sinaloa, Michoacán, Puebla, Oaxaca y Zacatecas, presentando

una disminución de producción en comparación con lo registrado en el año 2011 al 2013. Por otro lado, tuvo un impacto en la economía, con un precio medio 11% más que el año 2013 en la carne en canal del ganado ovino, al situarse en 43 mil 334 pesos por ton (INEGI 2014). Desde el año 2011, la producción sólo ha cubierto el 70% del consumo nacional aparente. El 30% restante es importado, principalmente de Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos, lo que ocasiona aumento en los precios. De acuerdo con esto, la producción de ovinos no logra satisfacer la creciente demanda de consumo nacional (SAGARPA, 2011; INEGI, 2012).

Las causas de una baja producción de carne ovina en México, se deben principalmente a las condiciones de pastoreo tradicionales que se establecen, con escaso uso de tecnología. La forma en que se maneja la reproducción de hatos en el 64.5% de la población es rudimentaria y sólo el 35.5% maneja programas de empadre controlado y técnicas reproductivas. Estas son medidas importantes que impactan la productividad puesto que influyen en la calidad genética, la consanguinidad y la tasa de producción (FUPPUE, 2002).

Por lo anterior, las cruces asistidas con hembras y sementales de razas con una aptitud cárnica marcada y cualidades maternas lácteas o prolificidad, son una de las opciones para mejorar la producción de ovinos, así como su alto valor genético. No obstante, la aplicación de técnicas reproductivas; la inseminación artificial y la transferencia de embriones relacionadas con la biotecnología en la producción de ganado ovino, son indispensables en programas de mejora genética para optimizar la obtención de leche y carne (De La Cruz, 2010). Es importante remarcar que una de las opciones que promete aumentar el potencial genético de los ovinos para obtener una mayor producción a mediano plazo es el estudio de los polimorfismos de los genes que intervienen en la prolificidad del ganado ovino; *BMP15* y *GDF9*, así como su expresión que está relacionada con el incremento sobre la dinámica folicular aumentando la tasa de ovulación (TO) en aproximadamente 1.5 óvulos y obteniendo fenotípicamente con las condiciones adecuadas como la alimentación y el ambiente, hasta dos crías por parto.

Esto proporciona una mejora en la reproducción animal con el fin de obtener camadas más grandes de las normales a nivel de rebaño. Lo anterior será importante para diversificar los mercados y maximizar el aprovechamiento de productividad de carne ovina considerando un mercado de volumen a nivel nacional e implementando sistemas de producción rentables para bajar el costo de producción.

ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de los ovinos.

Los ovinos (*Ovis aries*) fueron introducidos a México por primera vez por los españoles en el siglo XV conocidos como animales criollos (Matesanz, 1965) con el fin de aprovechar su carne y leche para el consumo. Son mamíferos ungulados con extremidades revestidas en pezuñas, su tiempo de longevidad aproximado es de 20 años (Cruz, 1995). Su periodo de gestación oscila entre los 145-150 días, tienen ciclos estrales múltiples de aproximadamente 17 días, que varían de acuerdo con el ambiente climático en el que se encuentre, así como también de la alimentación (Alba, 1964), factor importante que influye aumentando el número de óvulos liberados en el momento del celo y, por ende, el porcentaje de crías por parto (Buratovich, 2010). No obstante, también depende de su genotipo-fenotipo-ambiente; características que identifican a los animales como potenciales para ser explotados en la ovinocultura, puesto que la productividad es una respuesta a la influencia de dicha combinación (Moreno *et al.*, 2017). La ovinocultura es una de las principales actividades que se desarrollan en zonas tropicales del sureste mexicano, aunque no en todas las regiones es aprovechada de manera rentable para la producción de ovinos (Chay-Canul *et al.*, 2019).

2.2 Situación actual en la producción de ovinos en México.

En México, la ovinocultura se encuentra a cargo de productores que están ubicados en las zonas más marginadas, de bajos recursos y acceso limitado al uso de nuevas tecnologías, lo que provoca que aún no se logre satisfacer la demanda de carne de esa especie, siendo esta actividad una acción prometedora que cuenta con potencial de productividad y distribución. El producto más relevante en la ovinocultura es la producción de carne destinada al consumo humano. La carne ovina constituye una muy importante proporción de la dieta cárnica en México (Zervas *et al.*, 2011). La falta de inversión en el sector se debe a que, se invierte de manera preferente en sistemas con mayor productividad (avícolas, bovinos y porcinos) en términos de infraestructura, servicios tecnológicos, investigación, procesos de comercialización, mercadeo y legislación (Lebbie, 2004). A pesar de ello, se ha buscado desde hace muchos años impulsar este sector que ofrece muchos beneficios para las familias que se dedican a dicha actividad.

La producción de ovinos se ha adaptado a las áreas tropicales mexicanas debido a las fuentes disponibles de agua y tierra para el pasto y el cultivo de plantas leguminosas adecuadas para alimentar a estos animales (Hernández *et al.*, 2016). Los ovinos de pelo son animales con un genotipo que tiene potencial para la producción de corderos en las regiones tropicales (Herrera *et al.*, 2008). Las razas de pelo se utilizan en el trópico por su rusticidad, fertilidad y adaptación al clima (Chay-Canul *et al.*, 2011). En los últimos años, en las regiones tropicales se ha visto reflejada la predominancia de las razas para la producción de carne como Pelibuey, Black Belly, Dorper y la Katahdin (Chay-Canul *et al.*, 2019). La cría de ovinos en las regiones tropicales es una alternativa ganadera con alto potencial de desarrollo (Morales *et al.*, 2004), originado por una aceptación creciente por parte de los consumidores, quienes gradualmente incluyen la carne ovina en su dieta, con un consumo per cápita de 1,1 kg de carne ovina (SIAP, 2014).

2.3 Producción mundial, nacional y estatal de ovinos.

La población de ovinos en el ámbito mundial se estima en 1,052 millones, de los cuales el 73.02% (768.1 millones de cabezas) se concentra principalmente en los países de Australia, China, Nueva Zelanda, Irán, India y Argentina entre otros. México aporta el 0.66%, situándose así en uno de los últimos lugares de contribución para la producción mundial de carne, afirmando con esto el potencial desperdiciado del sector pecuario. El resto de la producción mundial está distribuido en los demás países del mundo, teniendo un 26.98% de producción (283.9 millones de cabezas). De acuerdo a los últimos reportes, se registró un crecimiento anual del 2% en el inventario ovino (FAOSTAT, 2017).

Además, es importante resaltar que en México se han logrado reducir las importaciones en un 74%, al pasar de las 58 mil ton de carne en el año 2001, a 10 mil 379 en el año 2017 ocasionado por la demanda de consumo, posicionándose como actividad productiva y generadora tanto de ingresos como de empleos (SAGARPA, 2017).

A nivel nacional, los últimos 3 años se ha observado que la población ovina tiene un bajo o casi nulo incremento con tendencias variables en la producción de carne en canal, lo que provoca que el valor de la producción de carne en canal se mantenga en un mismo valor mientras que el consumo de la carne de ovino va en aumento, lo que conlleva nuevamente a importaciones, por tal motivo no existe un equilibrio que permita cubrir la demanda nacional

(Figura 1). De un inventario nacional de 163, 294 cabezas de ovinos en 2009 pasaron a 111,577 en 2018, de acuerdo a las principales características de la estadística de sacrificio de ganado ovino (INEGI, 2019). Mientras que otros reportes nacionales abarcando más datos estatales de la población indican que, en México, el número de ovinos ha aumentado aproximadamente un 20% durante los últimos diez años, sin embargo, no ha sido suficiente para satisfacer la demanda nacional de cordero (SIAP-SAGARPA, 2017).

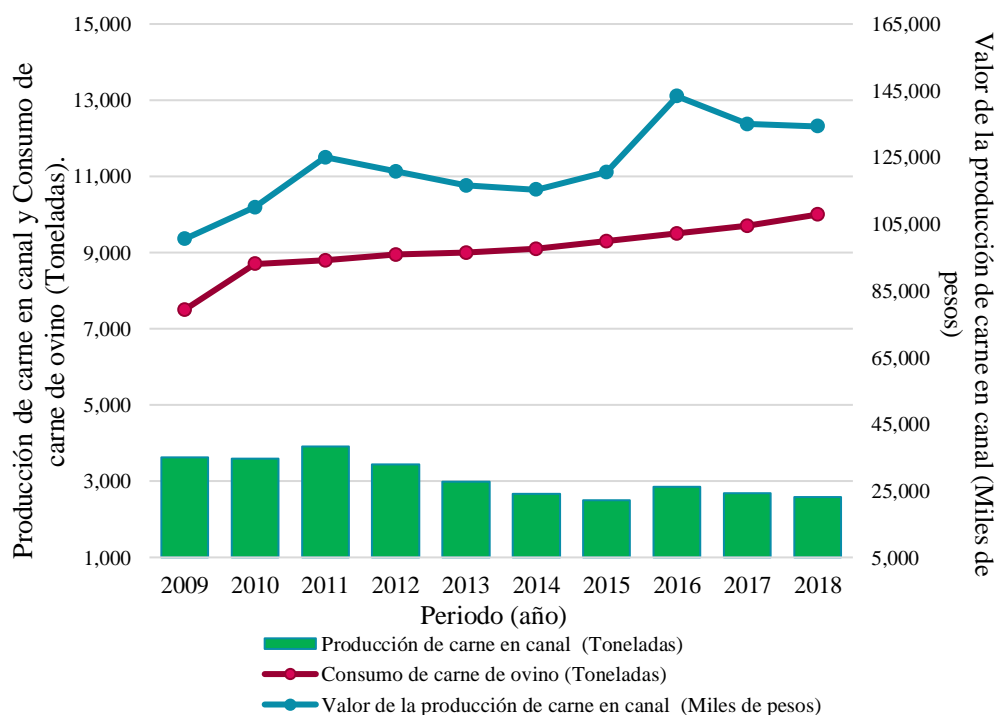


Figura 1. Producción y precio nacional de carne en canal de ovinos. Fuente: INEGI, FAO y OCDE. Estadísticas de Sacrificio de Ganado en Rastros Municipales y Consumo de Carne de ovino (2019).

En Oaxaca, es necesario impulsar el desarrollo de la ovinocultura; para ello, es fundamental estudiar a las unidades de producción ovinas (UPO) que integran el eslabón primario de la cadena. Tan sólo de las principales características de la estadística de sacrificio de ganado ovino, se registró una disminución del 67% en el abasto en la producción de carne en canal a partir del 2016 a la fecha, cifra que demostró ser alarmante en los últimos 2 años (Figura 2), lo cual ocasiono una caída en el valor de la producción de carne en, estos datos reflejan una baja eficiencia reproductiva y productiva, así como la limitada adopción de innovaciones que

permiten una mejora en los sistemas de explotación de ovinos de carne en la región, por tal motivo la ovinocultura es una preocupación de impacto mayor, que evidencia el incremento en la demanda y el decremento en la población de ovinos en la última década.

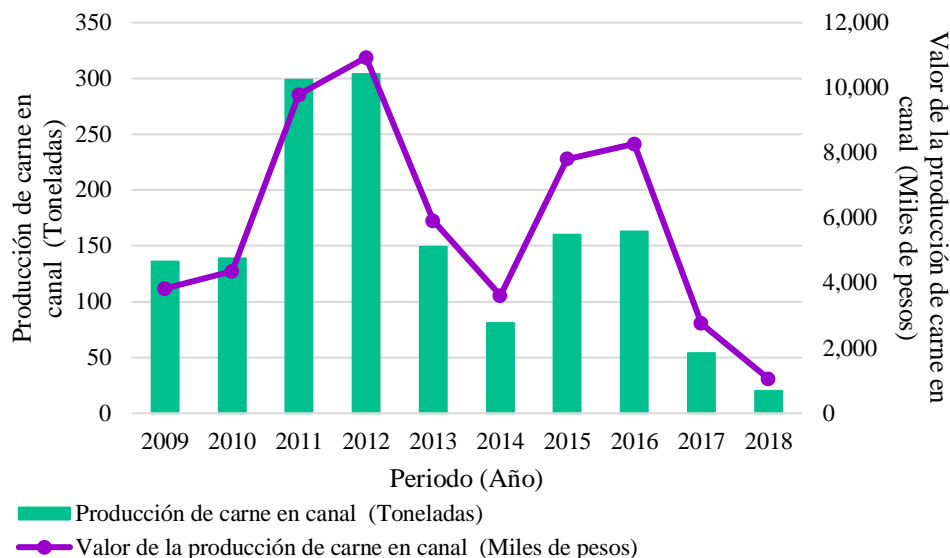


Figura 2. Producción y precio estatal (Oaxaca) de carne en canal de ovinos. Fuente: INEGI Estadísticas de Sacrificio de Ganado en Rastros Municipales (2019).

2.4 Razas más explotadas en la región del Papaloapan.

Los ovinos mayormente explotados en la cuenca del Papaloapan son animales con características fenotípicas de las razas: Black Belly, Pellibuey, Dorper, Katahdin y sus cruza, tales razas son explotadas para la producción de carne en regiones tropicales (Figura 3). Sin embargo, es importante destacar que se desconoce la pureza de estas razas, debido a que hay un descontrol en su reproducción, se ha observado que existe una alta incidencia de cruza indiscriminadas.

La explotación de estas especies menores es una actividad económica muy productiva y rentable, que requiere de profesionales pecuarios y los ganaderos, que tengan elementos técnicos y tecnológicos que les facilite un manejo óptimo de los animales.

La mejora genética es un punto clave en la ovinocultura que permite aumentar la productividad mediante cruza asistidas, que en muchas ocasiones se realiza entre animales especializados con animales criollos en aspectos reproductivos, mayor calidad y rendimiento en canal, incentivando a productores a aumentar su sistema productivo (Mendoza, 2011).



Figura 3. Ovinos de pelo mayormente explotados en la cuenca del Papaloapan con características fenotípicas de: A) Black Belly, B) Pelibuey C) Dorper D) Katahdin y E) sus cruza. Fuente: Equipo de Biotecnología animal de la Universidad del Papaloapan.

2.4.1 Black Belly (BB)

También llamada Panza Negra, es originaria de la Isla de Barbados, Antillas. No posee cuernos. El color del pelo puede ir desde el negro, pasando por todos los tonos de café, hasta el blanco con amarillo, excepto la panza, la parte interna de las extremidades y el cuello son negros. La fertilidad es alta con 2 a 2.1 corderos por parto; y partos múltiples son frecuentes. Es una raza de pelo adaptada a diversos ambientes. Posee una alta eficiencia reproductiva, ya que la oveja pare en promedio de dos crías cada ocho o nueve meses. Las ovejas pesan 45 kg y los machos, de 47 a 57 kg. Su canal es de excelente calidad (Rattray *et al.*, 1974; Cantón *et al.*, 1992).

2.4.2 Pelibuey (PB)

Es un ovino originario de Cuba, denominado también como borrego Tabasco. Es una raza de pelo que tiene el cuerpo pequeño y una estructura ósea fina. Su coloración puede ser blanca,

café o pinta. Su talla es muy variable, las ovejas pesan entre 35 y 50 kg y los carneros entre 60 y 80 kg (Lara *et al.*, 1983). Es una raza que tolera las condiciones climáticas del trópico sub-húmedo, pero se adapta prácticamente a cualquier ecosistema. Se ha visto que es resistente a diversas enfermedades (Perón *et al.*, 1991). Es un animal sexualmente precoz, prolífico y con una amplia estación de cría. Es una de las razas más empleadas en sistemas de pastoreo y mixtos por su alta prolificidad, buena rusticidad, resistencia a las parasitosis y gran capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales (Nuncio-Ochoa *et al.*, 2001). El ovino Pelibuey es la raza de mayor distribución en el trópico de México, sin embargo, reporta menores registros en peso (kg) al nacimiento y desarrollo comparado con otras razas de pelo (Macías-Cruz *et al.*, 2010; Hinojosa-Cuéllar *et al.*, 2015).

2.4.3 Dorper (DP)

Es una raza de pelo desarrollada en Sudáfrica resultado de Dorset Horned y Persa Cabeza Negra. Hay dos variantes, la que tiene cabeza negra y el que es blanco (Dorper Blanco). Es un animal que se adapta bien a climas áridos, es muy rústica y se reproduce con facilidad. Tienen buenos pesos al destete y sus corderos llegan a los 36 kg entre los tres y cuatro meses de edad. Las hembras pueden parir hasta tres veces en el lapso de dos años, lo cual significa 2.25 crías por año. Además de la carne, la piel tiene un amplio mercado y un gran prestigio, lo que puede significar hasta el 20% de las ganancias (Elias *et al.*, 1985; Milne *et al.*, 2000).

2.4.4 Katahdin (KT)

Es una raza de los EUA, presenta color rojo o blanco con algunas tonalidades entre éstos. Producto del cruce de Ovejas Virgins Islands con carneros de la raza Suffolk y Wiltshire Horn. Es una raza de pelo, de patas largas, nariz romana y orejas grandes y caídas, fuerte y de fácil adaptación a condiciones difíciles con bajos costos de mantenimiento, es ideal para el pastoreo. Los pesos adultos son: 70 kg para machos y 55 kg para hembras, es prolífica y tiene una excelente habilidad materna, sus corderos nacen muy vigorosos. Presenta las características de eliminar la cubierta pilífera (especie de muda), quedando una piel fina. Esta raza produce animales con canales carnosas y libres de grasa. La raza Katahdin presenta capacidad reproductiva y habilidad materna similar a la oveja Pelibuey, pero tiene mayores pesos al nacimiento y tasa de crecimiento pre y post-destete en sus corderos que el Pelibuey (Notter, 2008; De Wal *et al.*, 2000).

2.6 Importancia del mejoramiento genético en el ganado ovino.

En la actualidad, el ganado ovino se sigue estudiando por ser una fuente prometedora respecto a su finalidad para ser explotada en las que destacan: producción de carne, leche o doble propósito que permite la mejora de competitividad en la Ovinocultura. Estas características sobresalen gracias al potencial genético del animal respecto la capacidad y facilidad de los ovinos para procrear, la capacidad de tener más crías por parto y la habilidad que tienen de adaptación al ambiente (Bodin, 2006). Una alternativa para aumentar la producción anual de animales es el incremento de los partos múltiples que depende del índice de herencia del dicho carácter, el cual es bajo (Turner *et al.*, 1962, Bradford *et al.*, 1985; Notter *et al.*, 2005). La heredabilidad mide el grado de transmitir una característica particular a la progenie, los valores de heredabilidad pueden variar de 0 a 1, si es cero o cercano a cero hay variación ambiental, no existe relación genética y la selección será totalmente inefectiva, mientras que valores cercanos a 1 una elevada influencia genética y una baja variación ambiental. La heredabilidad es una medida específica de la población y sólo es válida para el ambiente donde se ha determinado. (Falconer & Mackay, 1996). Por ello, los genes mayores también llamados genes prolíficos conocidos hasta ahora, se han utilizado de varias formas para aumentar la productividad en los rebaños comerciales, usando continuamente los animales portadores, para aumentar la frecuencia del gen en los rebaños (Fahmy *et al.*, 1998; Muñoz *et al.*, 2012).

Los principales genes relacionados con la prolificidad, tomando en cuenta la tasa de ovulación y tamaño de camada se han convertido en una nueva opción para los ovinocultores con el objetivo de aumentar en forma significativa los porcentajes de crías por parto. La incorporación de un gen importante con actividad prolífica usando selección asistida por marcadores conducen a una mayor ganancia genética (Davis *et al.*, 2005).

Los avances en genética molecular han permitido la identificación de marcadores genéticos asociados con regiones génicas que afectan características de interés en animales de producción, incluyendo características monogénicas y QTL (Quantitative Trait Locus) que afectan características cuantitativas haciendo uso de herramientas que evalúan la mejora genética en las poblaciones mediante el cálculo de las tendencias genéticas y fenotípicas a través del tiempo los cuales han permitido el incremento de la respuesta a la selección, en

particular para características que son difíciles de mejorar con la selección convencional o características cuya medición fenotípica es difícil y costosa (López-Zavala, 2010).

2.7 Genes importantes en la tasa de ovulación ovina

Diversas razas de ovinos poseen gran variabilidad genética, son portadoras de muchas variantes de genes relacionados con el aumento en la prolificidad. La fertilidad en las hembras se ve afectada por estos genes que influyen en gran medida en la tasa de ovulación, es decir, el número de ovocitos liberados durante un ciclo reproductivo; estos responden a un complejo de intercambio de señales endocrinas entre la glándula pituitaria y el ovario (Matzuk *et al.*, 2002), asociadas a señales paracrinas y autocrinas, así como a factores de señalización en las células foliculares (Davis *et al.*, 1991; McNatty *et al.*, 2005). En ovinos con alta TO se han identificado genotipos asociados a mutaciones en genes de fecundidad (Fec) relacionados con la superfamilia del TGF- β (Transforming growth factor β) (Lahoz *et al.*, 2011). Los TGF β son un grupo muy grande de proteínas multifuncionales que afectan procesos celulares como la regulación de la diferenciación y proliferación celular hasta procesos fisiológicos como la inflamación y la cicatrización de tejidos, incluyendo también la formación del hueso (Zi *et al.*, 2012). Los miembros de la superfamilia TGF β inician con la señalización a través de un complejo receptor que comprende dos tipos (tipo I y II) de proteínas quinasa Serina/Treonina. Están constituidas por una sola cadena polipeptídica que presenta un dominio extracelular de unión al ligando y un dominio intracelular con actividad catalítica, unidos mediante un dominio transmembranal. Los cuales fosforilan las proteínas sustrato en los residuos de tirosina. Tienen un papel importante en el control de procesos celulares como la proliferación, así como la regulación de la comunicación intercelular durante el proceso de desarrollo (Chang *et al.*, 2002, Roh *et al.*, 2003). La superfamilia TGF β se subdivide en las activinas e inhibinas, que intervienen en la formación del folículo, las proteínas formadoras de hueso (BMPs), los factores de crecimiento y diferenciación (*GDFs*).

Las mutaciones que incrementan la tasa de ovulación y afectan en la fecundidad de las ovejas se han encontrado en los genes *GDF9* (Growth/Differentiation Factor 9), *BMP15* (Bone Morphogenetic Protein 15), *BMPR-1B* (Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1B) y *FSHR* (Follicle Stimulating Hormone Receptor).

BMPRII se identificó como un receptor de tipo II involucrado en la señalización de BMP15 y GDF9 (Vitt *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2003). Además, se demostró que BMP15 señala a través del receptor tipo I de BMPRII o también conocido como ALK6 (Moore *et al.*, 2003). La señalización de GDF9 es a través de un receptor tipo I, TGF β RI o conocido como ALK5 (Mazerbourg *et al.*, 2004; Kaivo-Oja *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2003;). Las células de la granulosa de muchas especies producen folistatina, que se caracterizó por primera vez como una proteína de unión a la activina, miembro de la superfamilia del TGF β (Lin *et al.*, 2003). Datos recientes indican que la folistatina también puede unirse a BMP15 y, por lo tanto, bloquear su bioactividad (Otsuka *et al.*, 2001b).

2.8 Gen Boorola: Mutación FecB (*BMPI-IB*)

El fenotipo Boorola fue el primer alelo FecB o también llamado gen de Fecundidad Boorola, detectado en el ganado ovino de raza Merino Australiano, localizado en el cromosoma 6, que proporciona un aumento en el tamaño de camada, debido al número de ovulaciones por ciclo estral. Este efecto es por una mutación en el gen *BMPI-IB* (Piper *et al.*, 1983). La existencia del gen de prolificidad en ovinos tiene efectos agregados tal que, las ovejas que heredan una copia de la mutación Boorola de cualquiera de los progenitores, presentan aproximadamente 1.5 ovocitos extra lo que significa que tienen una o dos crías más por parto, siendo el fenotipo normal de 1 ovocito (Wilson *et al.*, 2001). Las ovejas Boorola en Nueva Zelanda que portan el gen Boorola tienen una mutación en el receptor *BMPI-IB* expresado en el ovario (Agresearch, 2001), provocando una sustitución del aminoácido glutamina por arginina (Mulsant *et al.*, 2001).

2.9 Gen Inverdale: Mutación FecX (*BMP15*)

El gen *BMP15*, localizado en el cromosoma X: 50970938- 50977454, miembro de la superfamilia TGF β con secuencia de codificación de longitud completa de 1179 pb, está contenida en dos exones, separados por un intrón de alrededor de 5.4 kb y codifica un prepeptido de 393 residuos de aminoácidos. El péptido maduro activo es de 125 aa de longitud (Galloway *et al.*, 2002).

Este gen de fecundidad o también llamado alelo FecX (Davis *et al.*, 2001; Hanrahan *et al.*, 2004), se expresa específicamente en los ovocitos, es esencial para la fertilidad y las mutaciones pueden causar tanto el aumento de la tasa de ovulación y fenotipos de infertilidad

(Galloway *et al.*, 2000). Cabe mencionar que también existen variantes del gen *BMP15* reportadas en la raza Romney, donde se ha observado en un rebaño, un patrón de herencia que transmitían el gen únicamente a las hembras (Davis *et al.*, 1992), con una mutación de inactivación en *BMP15*; jugando un papel importante en la fertilidad de los mamíferos (Galloway *et al.*, 1999). También se ha descrito que ovejas Inverdale presentan una transversión de una timina (T) por adenina (A), en la posición 92 que provoca un aumento en la tasa de ovulación cuando se presenta el genotipo heterocigoto ($FecX^I/FecX^+$), mientras que animales homocigotos presentan insuficiencia ovárica ($FecX^I/FecX^I$) en el gen *BMP15* (Davis *et al.*, 1995). El alelo Hanna ($FecX^H$), es otro polimorfismo correspondiente a la sustitución de un nucleótido, una transición de una citosina (C) por una T en el nucleótido 67, que introduce un codón de paro prematuro que se relaciona con el incremento de crías, obteniendo alrededor de 1.6 corderos. Sin embargo, las ovejas homocigotas que heredan alelos de ambos padres tienen ovarios pequeños poco desarrollados y son infértiles (Galloway *et al.*, 2000; Liao *et al.*, 2003).

Se conocen más mutaciones relacionadas con la prolificidad en el gen *BMP15* reportadas, tal es el caso que un estudio identificó 4 mutaciones nombradas B1, B2, B3, B4, presentes en el gen *BMP15* (Tabla 1).

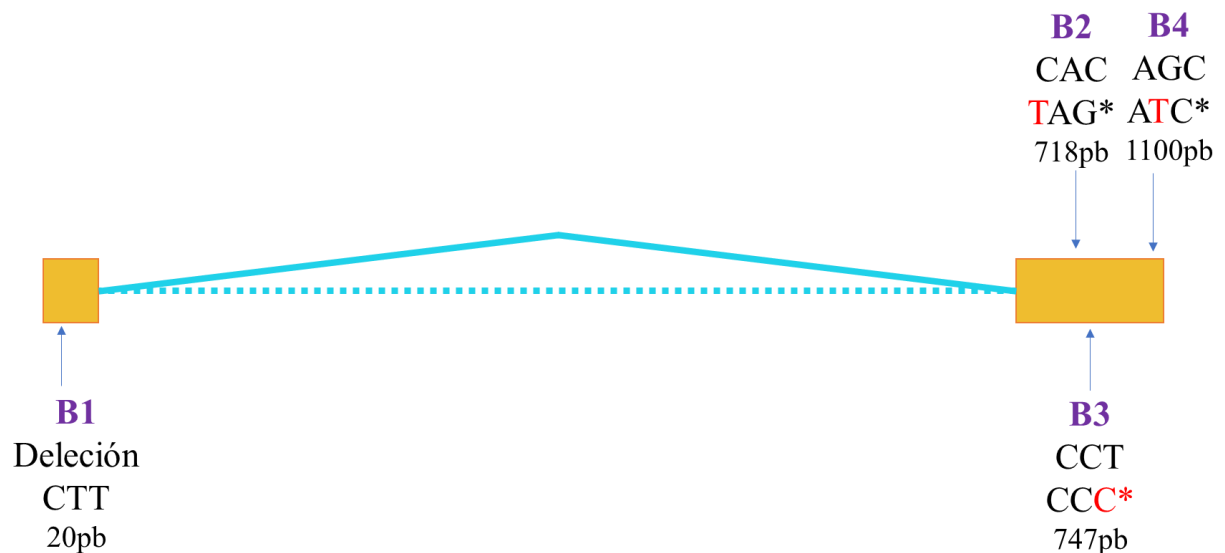


Figura 4. Polimorfismos del gen *BMP15* ubicado en el cromosoma X.

Siendo las mutaciones B1-B3, las que tienen un rol importante en el control del crecimiento folicular, afectando la fecundidad en las ovejas Cambridge y Belclare mientras que a la mutación B2-B4 se le atribuye una relación con la esterilidad (Hanrahan *et al.*, 2004).

Tabla 1. Polimorfismos del gen *BMP15* que afectan la fecundidad en ganado ovino (Hanrahan *et al.*, 2004; Vacca *et al.*, 2010).

Gen	Variante	Cambio de base	Bases codificadas	Cambio de Aminoácido y posición	
<i>BMP15</i>	B1	CTT delección	20-30	Delección de Leucina	10
	B2	C-T sustitución	718	Gln (Q)-Stop	239
	B3	T-C sustitución	747	Sin cambio Leu (L)	L249L
	B4	G-T sustitución	1100	Ser (E)-Ile (I)	S367I

2.10 Gen de alta fertilidad: FecG^H (*GDF9*)

El gen *GDF9* situado en el cromosoma 5: 41841034- 41843517 tiene aproximadamente 2.5 kb y contiene 2 exones que codifican un prepropéptido de 453 aa, siendo el péptido maduro activo 135 aa y separados por un intrón 1126 pb (Bodensteiner *et al.*, 1999; Ghaderi *et al.*, 2010). *GDF9*, es un regulador intraovárico eficaz; que desempeña un importante papel a principios de la foliculogénesis en hembras mamíferos (Wang *et al.*, 2019), donde el inicio de la señalización es en la superficie celular a través de complejos de receptores de tipo I y tipo II serina/treonina (Laitinen *et al.*, 1998; Elvin *et al.*, 2000), controla las funciones fisiológicas en las células de la granulosa, teca y ovocitos, provocando cambios en la expresión génica para el adecuado proceso de formación de folículos (Matzuk *et al.*, 2000). El ARN mensajero de *GDF9* se sintetiza solo en el ovocito desde la etapa primaria del folículo de una sola capa hasta después de la ovulación (McPherron *et al.*, 1993; Mcgrath *et al.*, 1995). Cuando especies de mamíferos son deficientes en *GDF9* se ha demostrado que se pueden formar folículos primarios de una sola capa, pero hay un bloqueo en el desarrollo folicular más allá del estadio primario de folículos de una sola capa que conduce a la infertilidad completa. El crecimiento de los ovocitos y la formación de la zona pelúcida avanzan normalmente, pero otros aspectos de la diferenciación de los ovocitos están comprometidos (Dong, 1996).

Diversos polimorfismos ubicados en el gen *GDF9* en la raza Booroola Merino (Hanrahan & Piper, 1982), han demostrado un efecto aditivo sobre la fertilidad de ovinos y han sido relacionados con la prolificidad (Hanrahan *et al.*, 2004) en distintas razas de ovinos, tales como; ovejas Belclare, Cambridge, Santa Inés, Araucanos y Pellibuey (Chu *et al.*, 2012), provocando cambios en la secuencia de ADN lo que conlleva a una transición en los aminoácidos que pueden influir en la conformación y plegamiento de la proteína, lo cual determina su función (Palmer *et al.*, 2006).

Estudios señalan que mutaciones en el gen *GDF9* (FecG^H) inciden en el aumento de la tasa de ovulación en ovejas heterocigotas, mientras que los portadores homocigotos tienen infertilidad debido a la hipoplasia de ovario que refleja un fallo de los folículos ováricos que progresa más allá de la etapa primaria del desarrollo del folículo. En estado heterocigoto, el alelo aumenta en 1.4 veces la tasa de ovulación (Hanrahan *et al.*, 2004).

Hay 8 mutaciones nombradas G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7 y G8, presentes en el gen *GDF9* (Tabla 2) relacionadas con la prolificidad en el gen *GDF9* reportadas en ovejas de razas Romney, Cambridge, Belclare y Aragonesa, tal como se muestra en Figura 4 (Bodin, 2006).

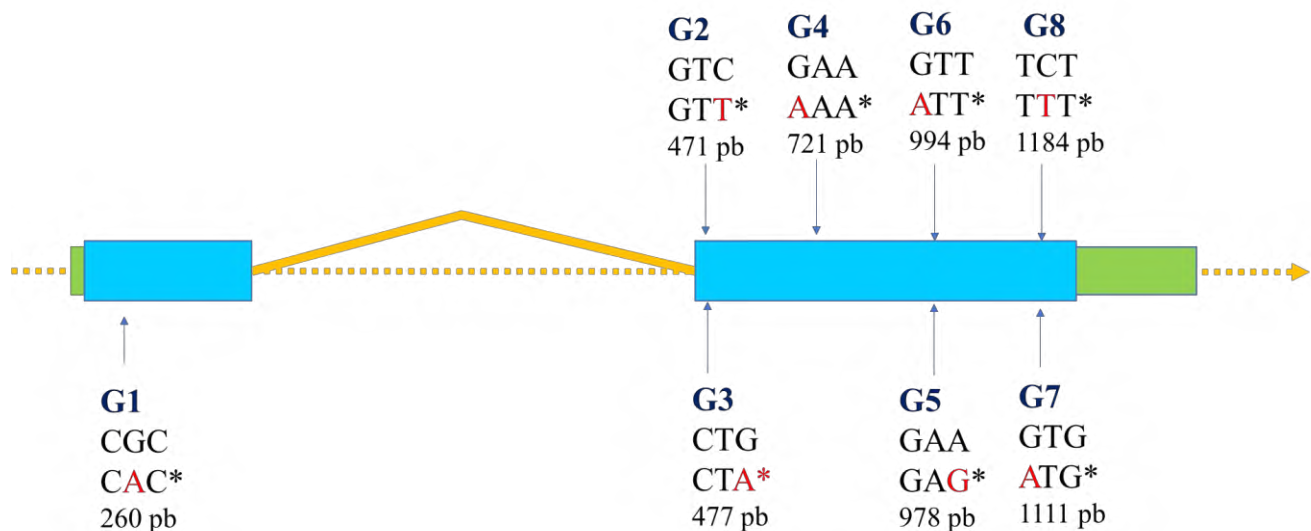


Figura 5. Polimorfismos del gen *GDF9* ubicado en el cromosoma 5.

Las mutaciones G1-G7 tienen un rol importante en el control del crecimiento folicular, afectando la fecundidad en las ovejas Cambridge y Belclare mientras que a la mutación G8 se le atribuye una relación con la esterilidad (Hanrahan *et al.*, 2004).

Tabla 2. Polimorfismos del gen *GDF9* que afectan la fecundidad en ganado ovino (Hanrahan *et al.*, 2004).

Gen	Variante	Cambio de base	Bases codificadas	Cambio de Aminoácido y posición
<i>GDF9</i>	G1	G-A sustitución	260	Arg (R)-His (H) R87H
	G2	C-T sustitución	471	Sin cambio Val (V) V157V
	G3	G-A sustitución	477	Sin cambio Leu (L) L159L
	G4	G-A sustitución	721	Glu (E)-Lys (K) E241K
	G5	A-G sustitución	978	Sin cambio Glu (E) E326E
	G6	G-A sustitución	994	Val (V)-Ile (I) V332I
	G7	G-A sustitución	1111	Val (V)-Met (M) V371M
	G8	C-T sustitución	1184	Ser (S)-Phe (F) S395F

2.11 Gen Receptor de la Hormona Folículo-Estimulante (FSHR)

El gen *FSHR* también juega un papel importante en el desarrollo folicular de mamíferos (Heckert *et al.*, 1992). Este receptor transmite la información biológica para el crecimiento del folículo-estimulante a las crías. Mientras que *FSH* (Follicle Stimulating Hormone) es regulada a través de *FSHR*, estimulando el desarrollo folicular y las funciones de las células de la granulosa (Griswold *et al.*, 1995). Por otra parte, se ha observado que los niveles de ARNm de *FSHR* y la capacidad de respuesta de las CG (Células de la granulosa) a *FSH* son más altos en ovejas Romanov politocas (varios folículos dominantes) que en monotocas (un folículo dominante) (Abdennebi *et al.*, 1999).

Estudios han mostrado la existencia de polimorfismos de nucleótido simple en la región 5' del gen *FSHR*, en ovejas con alta y baja prolificidad, siendo las heterocigotas, aquellas con probabilidad más alta a tener más crías (Chu *et al.*, 2012).

De igual manera se han encontrado mutaciones en el gen *FSHR* que actúan directamente sobre los niveles de *FSH* y que en consecuencia afectan la fase folicular teniendo efectos significativos en el tamaño de camada (Pan *et al.*, 2014).

Otros estudios han sugerido que polimorfismos en *GDF9*, *BMPR-IB*, *BMP15* y *FSHR* funcionan conjuntamente y están asociados con el aumento de crías por parto en ovejas Han y Hu, lo que apunta a ser evaluados como marcadores genéticos (Mottershead *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015).

2.12 Efectos de las mutaciones de genes mayores sobre la foliculogénesis y la tasa de ovulación.

La tasa ovulatoria es el factor que determina la eficiencia reproductiva. La foliculogénesis es un proceso sensible a la nutrición del que depende la tasa ovulatoria en los ovinos (Fabre *et al.*, 2006), sin embargo, los mecanismos que controlan el número de folículos se siguen investigando, así como nuevas alteraciones en el gen *GDF9* y su relación con lo descrito anteriormente. A pesar de que se han reportado polimorfismos existentes en diversos genes que se han involucrado con relación a un aumento en la prolificidad. Los principales genes que han manifestado tener mayor relación a este carácter han sido *GDF9* y *BMP15*. Las mutaciones presentes en estos genes, se asocian a un aumento en la tasa de ovulación, así como también una disminución en el sistema BMP (Figura 6). Los polimorfismos en los genes de fecundidad interfieren en la acción proliferativa desde los primeros estadios de la foliculogénesis. Las ovejas portadoras de mutaciones presentan folículos con un menor número de células de la granulosa en los ovarios y se produce un aumento en la expresión de *FSH* dependientes, como activina/inhibina y receptores de *LH* (Luteinizing Hormone) en las células de la granulosa de folículos antrales (Montgomery *et al.*, 1992).

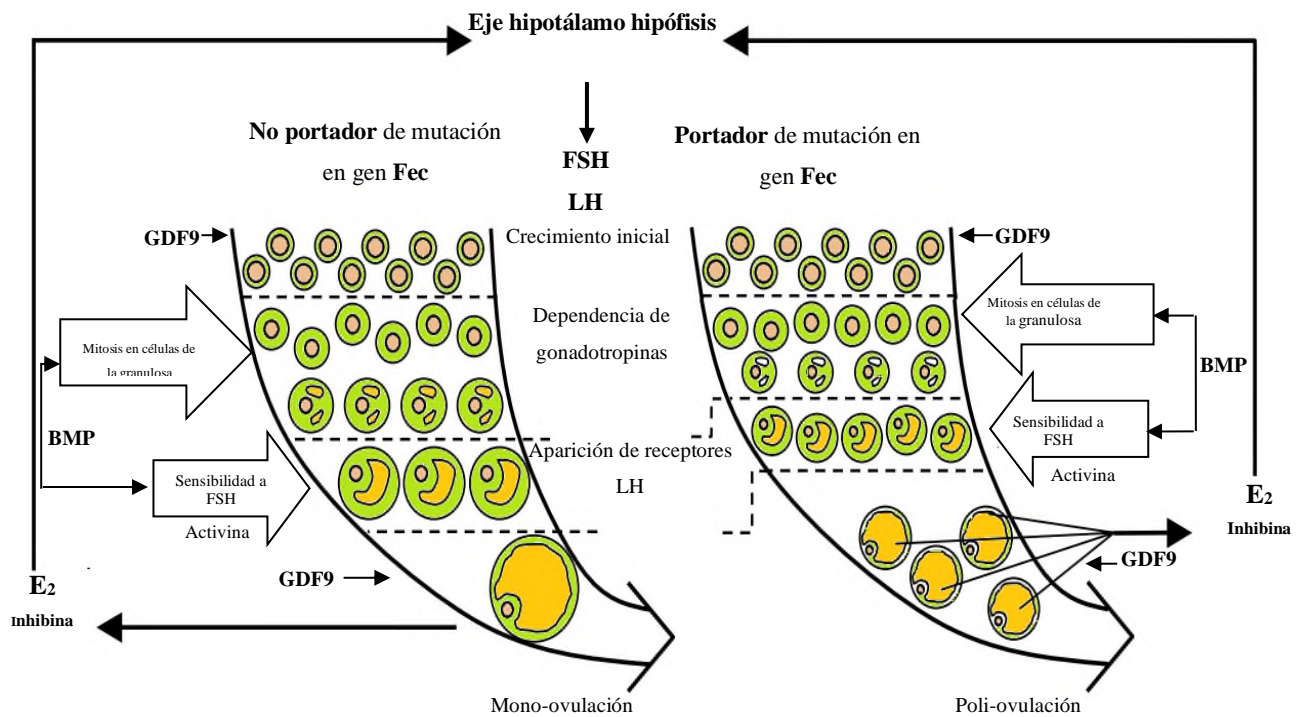


Figura 6. Representación esquemática de los efectos de una mutación en un gen de fecundidad (Fec) sobre la foliculogénesis y tasa de ovulación en ovinos (Fabre, 2006).

2.13 Función sinérgica de los genes BMP15 y GDF9 sobre la dinámica folicular.

La proteína morfogenética ósea 15 y el factor de crecimiento y diferenciación 9 son factores que intervienen en el crecimiento de los ovocitos, específicamente actúan en el desarrollo de las células de la granulosa y la diferenciación de las células del cúmulo que permiten la ovulación del ovocito maduro (Su *et al.*, 2004). Se expresan en los ovocitos y juegan un papel importante sobre la fertilidad (Yan *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que una supresión de GDF9 por recombinación homóloga detiene el desarrollo folicular (Dong *et al.*, 1996) mientras que la supresión de BMP15 ocasiona una reducción en el número de ovocitos en ratones (Yan *et al.*, 2001). También se han descrito efectos de mutaciones en GDF9 y BMP15 que en conjunto afectan directamente en las células de la granulosa, lo que apoya la hipótesis de que ambos se complementan y actúan de forma sinérgica (Su *et al.*, 2004). Sin embargo, en seres humanos, mutaciones en GDF9 y BMP15 se relacionan con insuficiencia ovárica (Liao *et al.*, 2003). De acuerdo con la especie, las alteraciones en BMP15 y GDF9 ocasionan fenotipos que varían desde un aumento de la

prolificidad a la esterilidad en ovejas, baja fertilidad hasta esterilidad en ratones e insuficiencia ovárica en mujeres (Persani *et al.*, 2014).

Los trabajos más recientes han abordado el estudio de la bioactividad de GDF9:BMP15 recombinante con base en hallazgos genéticos y fisiológicos previos del comportamiento en ratones, ovejas y humanos para la comprensión de sus funciones que aún están en debate (Mottershead *et al.*, 2013). Sugieren que heterodímeros BMP15:GDF9 recombinantes expresados en modelos animales son factores de crecimientos más potentes y bioactivos que los homodímeros (Peng *et al.*, 2013), actuando en la regulación de genes para la expansión de células del cúmulo (Elvin *et al.*, 2000) en respuesta a un aumento ovulatorio de LH que conlleva a producir una matriz extracelular compleja que requiere de factores paracrinos (Matzuk *et al.*, 2002).

Se ha propuesto un modelo para los homodímeros y heterodímeros de GDF9 (color verde) y BMP15 (color rojo) sobre la regulación de las células de la granulosa en humanos y ovejas puesto que presentan homología como se observa en la Figura 7 ; los homodímeros GDF9 tienen una baja actividad en ovocitos mientras que en homodímeros BMP15 a través de un complejo BMPR2 y ALK6 fosforila a proteínas SMAD para regular la expresión de genes relacionados con la expansión de las células del cúmulo de la granulosa (Ptx3, Has2 y Ptgs2). Por otra parte el heterodímero GDF9:BMP15 actúa de manera similar con el complejo receptor BMPR2:ALK6:ALK4 para transmitir una señal a través de la fosforilación de SMAD; proteínas que transducen señales extracelulares (Peng *et al.*, 2013).

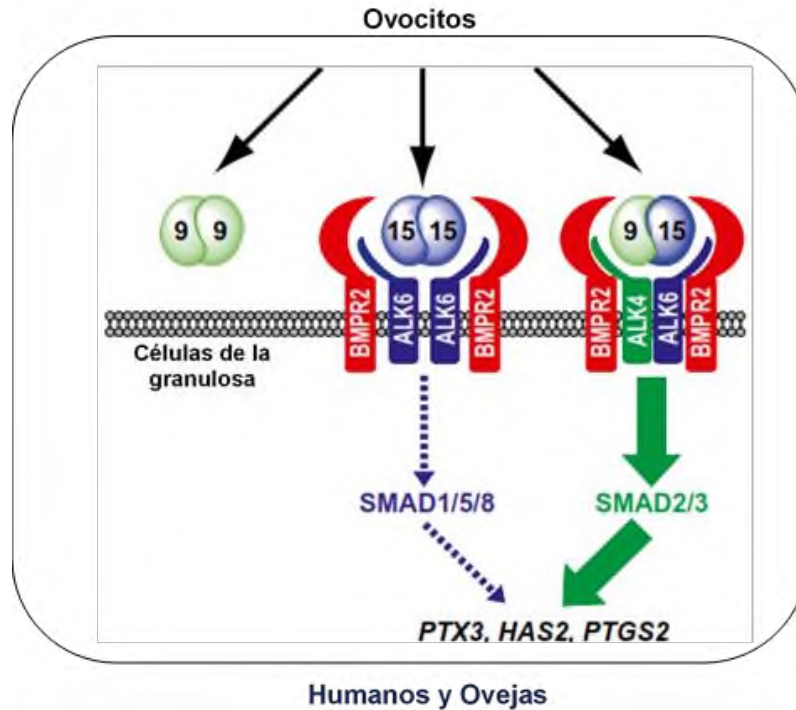


Figura 7. Modelo de regulación en las células de la granulosa de ovocitos humanos y ovinos (Peng et al., 2013).

Estructuralmente, la falta de una cisteína en GDF9 y BMP15 en el péptido maduro es requerida para la formación de dímeros covalentes (McPherron y Lee, 1993), es decir; forman un enlace intermolecular disulfuro en otros miembros de la superfamilia TGF (Galloway et al. 2000). No obstante, también se pueden formar homodímeros no covalentes biológicamente activos cuando se expresan de manera individual (Liao et al., 2003).

Además, otros estudios han observado el efecto que tienen dosis de proteína GDF9 y BMP15 purificada (12.5ng/ml) de manera individual y en combinación sobre las células del cúmulo de ratón, demostrando que existe una respuesta sinérgica máxima sobre las células de la granulosa teniendo así la activación de la señalización de proteínas SMAD (Mottershead et al., 2012).

2.14 Métodos moleculares para el diagnóstico de genes relacionados con la prolificidad

Los fenotipos con mayor tasa de ovulación y prolificidad en ganado ovino, han sido productos de gran interés, tanto desde el punto de vista productivo como desde el área científica, por su contribución al conocimiento de los factores que influyen en la regulación de la tasa de

ovulación. La prolificidad es uno de los objetivos prioritarios para los ovinocultores de carne, pues la heredabilidad de la prolificidad es muy baja y los progresos genéticos muy lentos y difíciles de adquirir en el caso de una herencia totalmente poligénica. El tamaño de camada es un carácter muy fácil de medir y de registrar y las observaciones de valores extremos son llamativas (Bodin, 2006). Actualmente se siguen identificando genes que estén relacionados a este carácter. Existen muchas técnicas para la identificación de genes, una de las más utilizadas es la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) (Fahmy, 1998), una técnica molecular que permite el análisis del ADN mediante la amplificación de una región de ADN de interés, frecuentemente seguida por secuenciación del ADN para identificar directamente la secuencia de ADN de una muestra que está involucrada con algún carácter específico (Persing *et al.*, 1993).

Cabe mencionar que también se han utilizado otras técnicas como la PCR en tiempo real (qPCR), una técnica sensible realizada en 3 etapas (desnaturalización, alineación y extensión) o en algunos casos 2 etapas. La PCR es utilizada para detectar y cuantificar secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción. La qPCR puede cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, siendo el ciclo umbral el criterio de valoración cuantitativo que asegura la fase exponencial de la amplificación (Schmittge y livak, 2008), mientras que la PCR punto final lo hace de manera cualitativa (Herschhorn, 2010).

Seguido de la qPCR, existen métodos para monitorear los productos amplificados e identificar mutaciones de nucleótido simple. Uno de ellos es el análisis HRM. Este análisis ya ha sido utilizado por el grupo de trabajo de biotecnología animal de la universidad del Papaloapan (2016) usando el fluoróforo reportero SYBR Green, una molécula intercalante que tienen afinidad por el ADN de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal fluorescente (Livak *et al.*, 1995).

El ensayo HRM (High Resolution Melt), es una técnica post qPCR que se detecta por fluorescencia, comienza con la amplificación del gen de interés mediante qPCR añadiendo fluoróforos como; SYBR Green, Eva Green, LC green, entre otros, que se intercalan en la doble hebra. Después de la amplificación, el producto se somete a rangos de temperatura que van desde los 65°C hasta los 95°C con un incremento de temperatura de ~0.04°C/seg, lo que

ocasiona la desnaturalización del producto de qPCR, permitiendo con esto la detección de cambios de bases de alelos homocigotos o heterocigotos localizadas en un punto de inflexión donde hay una disminución drástica de fluorescencia (Reed *et al.*, 2007).

Las diferencias de RFU (Relative Fluorescence Units) de los productos de qPCR de fragmentos de ADN de interés se hacen en comparación a una muestra conocida o de referencia para detectar las variaciones de temperatura de desnaturalización en las secuencias de ADN ubicadas en el punto de inflexión, permitiendo comparar las curvas de disociación de las cadenas de ADN para la detección de polimorfismos o alteraciones epigenéticas. El análisis HRM depende de la habilidad para detectar los cambios en las curvas de disociación mediante el fluoróforo intercalante sobre el ADN (Wilhelm *et al.*, 2003).

2.15. Estimación de frecuencia alélicas y fenotípicas de polimorfismos presentes en genes de fecundidad.

La genética de poblaciones ha explicado por muchos años en términos cuantitativos y predictivos, el proceso de adaptación, estudiando la herencia y la variación biológica en los organismos, los rasgos particulares que heredados de padres a hijos, existen pequeñas variaciones en el ADN que hacen la diferencia entre individuos, las diferentes formas de un mismo gen o marcador es llamado alelo y se define como las múltiples variaciones de un gen o secuencia de ADN en la población, donde cada par de alelos conformará un genotipo, encontrándose dentro de la población con determinada frecuencia, siendo la frecuencia génica ó alélica, la medida de la proporción relativa de alelos de una población dada, expresándose en porcentaje y estimándose contando el número de veces que es observado el alelo de un locus y dividiéndolo entre el número total de alelos estudiados. Sin embargo, existen cuatro condiciones: la selección, deriva génica, mutación y migración; que determinan la frecuencia de los mismos (Rodríguez *et al.*, 2014), por ello analiza el comportamiento de genes con importancia productiva y reproductiva no en individuos si no en poblaciones (Eguiarte, 1999).

La mayor parte de los organismos son diploides, por lo que tienen información genética proveniente del padre y de la madre. Cada gen tiene dos versiones, a lo que llamamos alelos y a la ubicación en el gen en particular, locus. De dichos alelos surge el genotipo homocigoto recesivo, dominante y el heterocigoto, datos que son utilizados para genética de poblaciones y que mediante el equilibrio Hardy Weinberg se plantea si existe o no una relación que se

mantenga en generaciones posteriores. En genética, la prueba de si las frecuencias de genotipos observadas en una muestra de población son consistentes con la predicción ($p^2 + 2pq + q^2$) ofrece una prueba fundamental de determinación biológica de los genotipos (Rodríguez *et al.*, 2009). Cuando el resultado es un locus en equilibrio, las frecuencias alélicas no cambian de generación en generación, las frecuencias genotípicas se mantienen constantes, la suma de las frecuencias genotípicas de un locus y de los alelos siempre debe ser uno, con lo anterior, una prueba de Chi-Cuadrado en cualquier experimento genético es necesario para decidir si los datos están en relación con las proporciones Mendelianas (Rodríguez *et al.*, 2014), tal como se ha realizado en estudios de identificación de polimorfismos localizados en el gen GDF9 y BMP15 (Hanrahan *et al.*, 2004; Liandri *et al.*, 2012; Khodabakhshzadeh *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019).

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, los ovinos siguen siendo un potencial productivo en el sector ganadero, que se desarrolla a partir de sistemas de pastoreo, aprovechando así la vegetación de las tierras, lo que proporciona ventajas económicas para el productor, por el ahorro de producción. Sin embargo, México no logra abastecer la demanda nacional que se requiere, sólo se genera un 70% de carne ovina que es consumida, lo que hace necesario recurrir a importaciones, principalmente de Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos, provocando un incremento de los precios del cordero. Los métodos tradicionales para la producción de ovinos están lejos de satisfacer la demanda nacional. De acuerdo con la unión nacional de ovinocultores (UNO, 2011) que se dedican a la comercialización han enfrentado problemáticas con la producción de carne, por ejemplo: déficit de producción, elevados costos de inversión en sistemas intensivos, no hay planeaciones estratégicas para aumentar la producción, el incremento en el precio de insumos, bajo uso de la tecnología, deficiente organización de productores. Bajo estas circunstancias, un aspecto importante a considerar es la prolificidad, es decir, la capacidad de las hembras para tener partos múltiples, lo que a mediano plazo permitirá incrementar la eficiencia de producción de un rebaño, logrando calidad, productividad y competitividad en el mercado nacional como internacional. Por ello, se pretende crear alternativas de producción, haciendo uso de las herramientas biotecnológicas aplicadas a la producción animal que permitan identificar los genes *BMP15* y *GDF9*, los cuales se han reportado que tienen una relación y que intervienen en la prolificidad, logrando con esto, establecer a futuro centros de reproducción que a su vez se constituyan como bancos de germoplasma que garanticen una distribución controlada y preserven los genes de importancia.

HIPÓTESIS

Los polimorfismos B2 y B5 ubicados en el gen *BMP15*, y los polimorfismos G1, G4, G6 y G7 ubicados en el gen *GDF9* estarán presentes en los ovinos de pelo de la región del Papaloapan.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos B2 y B5 en el gen *BMP15* y G1, G4, G6 y G7 en el gen *GDF9* de ovinos de pelo con características fenotípicas de las razas BB, PB, DP, KT y sus cruzas.

Objetivos específicos

- Identificar los polimorfismos B2 y B5 en el gen *BMP15* y G1, G4, G6 y G7 en el gen *GDF9* ligados a la prolificidad mediante HRM en ovinos de pelo con características fenotípicas de las razas BB, PB, DP, KT y sus cruzas.
- Estimar y comparar la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos, así como la relación que existe con respecto a la prolificidad en ovinos.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

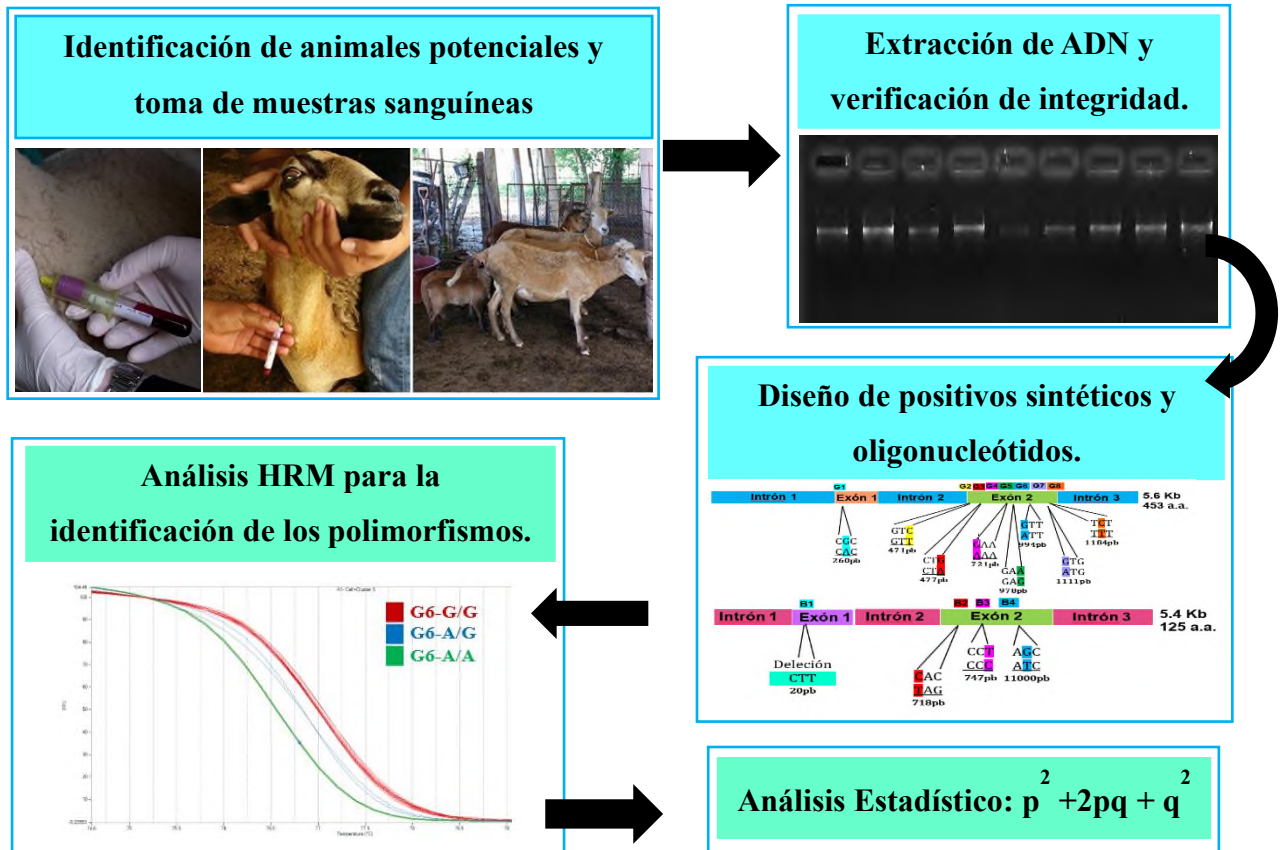


Figura 8. Estrategia experimental. Se observa la ruta para la identificación de polimorfismos presentes en ovejas con características fenotípicas de las razas: Pelibuey (PB), Black Belly (BB), Katahdin (KT), Dorper (DP) y Cruzas.

6.1 Búsqueda e identificación de animales con parto múltiple.

Con base a la disponibilidad de animales se seleccionaron tres ranchos para llevar a cabo el muestreo de sangre, ubicados en las localidades: Santa María Jacatepec, San Bartolo y El Edén, pertenecientes al municipio de San Juan Bautista Tuxtepec, cuya finalidad de explotación va dirigida a la matanza para la conversión en alimentos típicos para el consumo local. Se realizaron los registros de antecedentes reproductivos de las explotaciones del productor. Se tomaron como criterio de selección, aquellas hembras que hayan tenido al menos un parto. Se extrajeron un total de 100 muestras de sangre de ovejas con características fenotípicas de las razas: Pelibuey (PB), Black Belly (BB), Katahdin (KT), Dorper (DP) y Cruzas con un promedio de edad de 24 a 48 meses. Se realizaron los registros reproductivos

indicando: ID animal, Raza, Edad, N° Partos, N° Corderos nacidos por parto, Enfermedades adquiridas y características particulares.

6.2 Toma de muestras sanguíneas.

Una vez identificados los animales con base a sus registros, se tomó una muestra de sangre vía yugular con un tubo Vacutainer de 10ml con anticoagulante EDTA, se etiquetó previamente y se almacenó a -20 °C hasta su análisis (Fonte *et al.*, 2008).

6.3 Extracción de ADN sanguíneo de ovinos.

Se utilizó el Kit de extracción de ADN sanguíneo Quick-gDNA™ (MiniPrep N° D3006), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Inicialmente, en un tubo para microcentrifuga, se agregaron 400 µl de buffer de lisis genómico, se adicionaron 100 µl de sangre de ovino (4:1) y se mezclaron por 10 seg en vórtex. Se dejó reposar a temperatura ambiente para la posterior ruptura celular, posteriormente, la mezcla se colocó en una columna ensamblada dentro de un tubo de colección, se centrifugó a 10,000 g por 1 min y se descartó el líquido filtrado.

La columna se colocó en un tubo nuevo, se adicionaron 200 µl de buffer de prelavado de ADN y se centrifugó a 10000 g por 1 min. Después, se adicionaron 500 µl de buffer de lavado de ADNg y se centrifugó a 10000 g por 1 min. Posteriormente se colocó en un nuevo tubo de microcentrifuga y se añadieron 50 µl de buffer de elución, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 15000 g por 30 seg. Finalmente, el líquido filtrado (ADN extraído) se guardó a una temperatura entre 4°C y -20°C.

El ADN extraído a partir de las muestras de sangre de ovino se verificó mediante electroforesis cargando 4µl de ADN más 1µl de buffer de carga en gel de agarosa al 0.8% con buffer TAE 1X por 35min a 100 Volts. Las bandas que se generaron se revelaron en un sistema de fotodocumentación.

6.4 Diseño de secuencias sintéticas.

Se realizó una búsqueda en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) para localizar el genoma de ovinos, posteriormente se buscaron los genes de interés y se diseñaron 4 secuencias control de nucleótidos de ~50 pb ubicadas en el exón 1 del gen *BMP15* donde presentan mutaciones por sustitución de bases así como también se utilizaron 8 secuencias control de nucleótidos de 50-100 pb ubicadas en el exón 1 y 2 del gen

GDF9 donde presentan cambios de nucleótidos de acuerdo a lo reportado por Hanrahan *et al.*, (2004) y Vacca *et al.*, (2010).

Las secuencias control de nucleótidos se utilizaron por pares (control mutante y control sin cambio) como referencia en el análisis HRM para la detección de los polimorfismos B2 y B5 en el gen *BMP15* y G1, G4, G6 y G7 en el gen *GDF9* de ovinos, permitiendo comparar las curvas de disociación de las cadenas de ADN. La tabla 3 y 4 muestran las secuencias sintéticas del gen *BMP15* y *GDF9* respectivamente, donde el color verde representa la región que hibrida el oligonucleótido directo, la zona sombreada en color azul indica el polimorfismo, mientras que la región en color morado la región sin cambio y el color amarillo la región que hibrida el oligonucleótido reverso.

Tabla 3. Secuencias control utilizadas para el análisis HRM del gen *BMP15*.

Nombre de la secuencia control	Secuencia control sintético	Tamaño	Mutación
BMP15PSB2	GTTCCTCCACCCTTTTCAAGTCAGCTTCCAGCAGCT GGGCTGGGATC	48pb	B2 (Q239Stop)
BMP15NSS2	GTTCCTCCACCCTTTTAAAGTCAGCTTCCAGCAGCT GGGCTGGGATC	48pb	Sin cambio
BMP15PSB5	CATCTCTATACC CCAA ACTACTGT AAGGGAGTATGT CCTCGGGTAC	46pb	B5 (C53Y)
BMP15NSS5	CATCTCTATACC CCAA ACTACTATA AAGGGAGTATGT CCTCGGGTAC	46pb	Sin cambio

Tabla 4. Secuencias control utilizadas para el análisis HRM del gen *GDF9*.

Nombre de la secuencia control	Secuencia control sintético	Tamaño	Mutación
GDF9PSG1	TGATGGGCACGGGGAACCCCCCAGGCTGCAGCCAG ATGACAGAGCTTTGCAC TACATGAAGA GGCTCTAT AA	72pb	G1 (R87H)
GDF9NSS1	TGATGGGCACGGGGAACCCCCCAGGCTGCAGCCAG ATGACAGAGCTTTGCG TACATGAAGA GGCTCTAT AA	72pb	Sin cambio
GDF9PSG4	GAGGAATATTCAC ATGTCGTAAATTTTACATGTGCGAAA GACCAGCT GCAGCATCCTTCAGCGCG GGACAGCCTGT	77pb	G2 (E241K)
GDF9NSS4	GAGGAATATTCAC ATGTCGTAAATTTTACATGTGCGGAA GACCAGCT GCAGCATCCTTCAGCGCG GGACAGCCTGT	77pb	Sin cambio
GDF9PSG6	GAGAGT	76pb	G6 (V332I)

	GCCAGCTCTGAATTGAAGAAGCCTCTGATTCCAGC TTCAGTCAATCTGAGTGAATACTTCAAACAGTTTC		
GDF9NSS6	GAGAGT GCCAGCTCTGAATTGAAGAAGCCTCTGGTTCCAGC TTCAGTCAATCTGAGTGAATACTTCAAACAGTTTC	76pb	Sin cambio
GDF9PSG7	TTAGACTTAGCTTTAGTCAGCTGAAGTGGGACAAC TGGATTATGGCCCCACACAAATACAACCCTCGATA CTGTA	75pb	G7(V371M)
GDF9NSS7	TTAGACTTAGCTTTAGTCAGCTGAAGTGGGACAAC TGGATTGTGGCCCCACACAAATACAACCCTCGATA CTGTA	75pb	Sin cambio

6.5 Diseño de oligonucleótidos

Las condiciones que se tomaron en cuenta para el diseño de oligonucleótidos para los genes *GDF9* y *BMP15* fueron el porcentaje de Guanina-Citosina (% GC=40-60), el tamaño de los oligonucleótidos (20-25 pb), una temperatura de 50-65 °C y con un tamaño de amplificación no mayor a 150 pb, utilizando el software OligoCal. Posteriormente se mandaron a sintetizar en la empresa Macrogen y OligoT4.

Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en la amplificación del gen *BMP15* y *GDF9*

Nombre	Secuencia de oligonucleótidos	Tamaño (mer)	%GC	Tm (°C)
BMP15B2F	GTA ACC AGT GTT CCC TCC ACC	21	57	63.2
BMP15B2R	AAT GAT CCA GTG ATC CCA GCC	21	52	61.2
BMP15B5F	CAT TGC TCC CCA TCT CTA TAC C	22	50	62.1
BMP15B5R	ACC ATA GTG TAG TAC CCG AGG	21	52	61.2
GDF9G1FS	AGG TTC TGT ATG ATG GGC ACG	21	52	61.2
GDF9G1RS	GTA GCG TAT GCC TTA TAG AGC C	22	50	62.1
GDF9G4FS	CTC CCA CAA GAG GAA TAT TCA C	22	45	60.1
GDF9G4RS	AGT CAT GTT AAA CAG GCT GTC C	22	45	60.1
GDF9G6FS	AGA GAC CAG GAG AGT GCC AG	20	60	62.5
GDF9G6RS	CTG GGG AAA AAG AAA CTG TTT GAA G	25	40	62.5
GDF9G7FS	AGC TCC ATG ACT TTA GAC TTA GC	23	43	60.9
GDF9G7RS	GAC AGT CCC CTT TAC AGT ATC G	20	50	62.1

6.6 Amplificación de las secuencias control

Se realizaron diluciones (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000) por duplicado de las secuencias control, partiendo de una concentración de 10 μ M para determinar la concentración estándar a utilizar. Para la dilución 1:10, se agregaron en un tubo, 10 μ l del control (10 μ M) y se adicionaron 90 μ l de H₂O. Para la dilución 1:100, se agregaron en un tubo, 10 μ l de la dilución 1:10 y 90 μ l de H₂O y así sucesivamente.

Las diluciones control estándar de las secuencias mutantes y sin cambio se amplificaron mediante qPCR utilizando los oligonucleótidos previamente diseñados para los genes *GDF9* y *BMP15*.

6.7 Amplificación de las muestras de ADN de ovino

A partir del ADN genómico extraído de sangre, se amplificaron los genes; *BMP15* y *GDF9* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) utilizando los oligonucleótidos previamente diseñados y sintetizados en el punto 6.5. La amplificación de los fragmentos de interés se llevó a cabo mediante el protocolo de reacción Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 2X (Thermo Scientific #K0252) como se muestra en la tabla 6 y como control negativo se realizó una reacción que contenía sólo ddH₂O.

Se estandarizó la concentración de los controles sintéticos y de las muestras, requeridas para obtener una señal significativa de fluorescencia en el mismo ciclo de qPCR.

Tabla 6. Protocolo de la mezcla de reacción Maxima SYBR Green qPCR.

Maxima SYBR Green qPCR Master Mix	
Reactivos	Cantidad
Master Mix (2X)	7.5 μ l
Oligonucleotido F (Forward)	1 μ l(10 μ M)
Oligonucleotido R (Reverse)	1 μ l(10 μ M)
ADN genómico	1 μ l (18 ng)
Agua libre de nucleasas	4.5 μ l
Volumen final	15 μ l

El protocolo del termociclador se muestra a continuación.

Tabla 7. Protocolo del termociclador Pikoreal96

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	10 min	1
Desnaturalización	95°C	15 seg	40
Alineación/Extensión	60°C	30 seg	

El tamaño obtenido de los productos de qPCR se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 3% TAE IX, cargando 4µl de ADN más 1µl de buffer de carga.

6.8 Análisis HRM (High Resolution Melt Analysis)

El análisis HRM se realizó utilizando el fluoróforo SYBR Green, generando curvas de fusión (Melting curve) con un incremento de temperatura de 0.04 °C dentro de un rango de 65°C a 95°C. Se analizaron las diferencias alélicas mediante el software HRM y se compararon las curvas de disociación o también llamadas “curvas melting”, detectando los cambios de fluorescencia entre cada muestra.

6.9 Análisis estadístico de frecuencias alélicas y genotípicas.

Para la evaluación de los polimorfismos B2 y B5 en el gen BMP15 y G1, G4, G6 y G7 en el gen GDF9 de ovinos, se estimaron las frecuencias alélicas y fenotípicas (Hanrahan *et al.*, 2004) mediante la prueba de ajuste del equilibrio de Hardy Weinberg. Se asignó el genotipo a cada animal de acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de las curvas de fusión, se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas.

Para el cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *GDF9* se utilizó la prueba de X^2 (ji cuadrada), partiendo de la ecuación:

$$p^2 + 2pq + q^2 \quad \text{donde:}$$

p^2 : alelos en individuos homocigotos con un polimorfismo n

$2pq$: frecuencia predicha para heterocigotos.

q^2 : alelos en individuos homocigotos con un polimorfismo m

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Muestreo de la Población.

De la población estudiada, es importante mencionar que las ovejas se encontraban en un estado de desnutrición y descontrol en su manejo sanitario, cuyo aspecto es importante también considerar pues si bien, son factores que no modifican la información genética, pero determinan la expresión de los genes y el potencial genético para producir ovinos (Chay-Canul *et al.*, 2011), al igual que el medio ambiente en el que se encuentran (Muñoz *et al.*, 2001; Mueller *et al.*, 2015).

La raza fue asignada con base a características fenotípicas (color y tamaño) que presentaba cada animal. Sin embargo, estudios validan que, para asignar una raza pura con un porcentaje de confiabilidad, es necesario, que los ovinos cumplan con los estándares de sus respectivas razas, así como; las mediciones de la longitud de cabeza y la anchura de la base y de la punta de la cola, las cuales son las variables precisas para identificar y clasificar las razas de ovinos (Macedo *et al.*, 2017). Otras técnicas que son altamente confiables para asignar razas puras son los estudios moleculares que se basan en identificar a nivel molecular conjunto de marcadores o regiones conservadas en los animales pertenecientes a rebaños de una sola especie para hallar diferencias específicas y patrones que permitan observar relaciones mediante análisis filogenético (Reina *et al.*, 2006; Feitosa *et al.*, 2010; Chávez-García *et al.*, 2015).

Las distintas razas ovinas y sus diferentes características morfológicas son aspectos importantes para definir sus potenciales, estos aspectos se han convertido en un interés rentable para ganaderos y técnicos (Leymaster *et al.*, 2002), por lo anterior se estableció que las muestras de sangre son de ovejas únicamente con características fenotípicas de las razas: PB, BB, KT, DP y sus Cruzas.

De las 100 muestras extraídas se cuantifico el número de animales con incidencia de parto doble tal como se indica en la tabla 8, observando que la raza PB (27%) fue la que presentó más crías por parto, haciendo hincapié en que también se tuvo un caso de parto triple, seguido de la raza BB (26%), teniendo como antecedente que la raza PB tiene una prolificidad de 1.23 (Segura *et al.*, 1996, Rodríguez *et al.*, 1998) mientras que la BB una prolificidad de 1.67 (Segura *et al.*, 1996, Rodríguez *et al.*, 1998). Es importante resaltar que las razas ovinas en regiones tropicales están conformadas por animales de pelo cuya productividad es distinta a

otras regiones templadas (Hinojosa *et al.*, 2015) y que, además, la condición corporal de los animales es un factor importante que afecta la prolificidad.

Por otra parte, las hembras KT tuvieron un 10% de incidencia de partos múltiples, cuya prolificidad ha sido descrita con un valor de 1.36 (González-Godínez *et al.*, 2014,) mientras que las cruzas de las razas antes mencionadas sólo tuvieron un 3% de incidencia de partos dobles de la población total estudiada, cuya prolificidad ha sido antes descrita como 1.2 ± 0.39 corderos/parto (Hanrahan *et al.*, 2003; Dickson *et al.*, 2004). Las ovejas de la raza DP mostraron 2 animales con partos múltiples de 3, lo cual no establece un porcentaje significativo de incidencia de partos múltiples de la muestra población, otros estudios han mencionado que esta raza tiene una prolificidad de 1.15 (González-Godínez *et al.*, 2014).

Tabla 8. Número de hembras con incidencia de parto múltiple (doble) en las razas PB, BB, KT, DP y sus cruzas.

Raza	N° de animales	N° de Hembras c/ PD (Parto doble)
PB	33	9
BB	17	4
KT	19	2
DP	3	2
Cruzas	28	1
	100	18

La importancia de estudiar el potencial prolífico que poseen los ovinos radica en la alta demanda de productos cárnicos en México, lo cual ha conllevado a que uno de los objetivos de los productores de ovinos sea encaminada a aumentar la producción de corderos para el abasto (Acero, 2002).

Del muestreo total (n =100) se cuantifico la cantidad de animales de acuerdo con la raza (características fenotípicas) y su fertilidad, obteniendo un 80% (59% Hembras con PS más 21% Hembras con registro de un solo parto) de hembras con parto simple (PS), un 18% con hembras con parto doble (PD) y 2% hembras hijas (DSC =Descendencia).

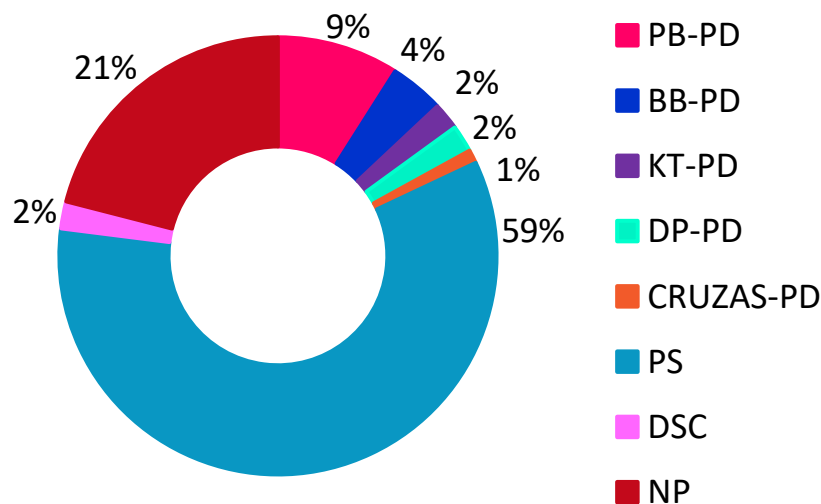


Figura 9. Porcentajes de animales muestreados respecto a sus características fenotípicas y fertilidad.

El primer muestreo nos acercó al gran potencial prolífico (número de corderos nacidos por parto) en la especie ovina, uno de los factores de mayor interés, cuyo objetivo en muchas investigaciones se centra en aumentar la fertilidad y conocer la heredabilidad de la fertilidad en ovejas lo que conlleva a un aumento en la productividad numérica anual por oveja en sistemas intensivos de explotación. (Hanrahan, 1977; Sierra, 1978).

Es importante mencionar que a pesar de la cruce indiscriminada que existe en la cuenca del Papaloapan, los animales en los que se observaron mayor incidencia de parto doble fueron los animales con características fenotípicas Pelibuey; una de las razas más empleadas en sistemas de pastoreo y mixtos por su alta prolificidad, buena rusticidad, resistencia a las parasitosis y gran capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales (Macías-Cruz *et al.*, 2010).

Seguido de los animales con características fenotípicas Black Belly; animales que han sido catalogados como razas prolíficas y con facilidad de adaptación descrito con una capacidad natural de tolerar ambientes cálidos y húmedos. Además, ha demostrado una importante capacidad para tolerar infecciones parasitarias gastrointestinales y es considerado una alternativa importante para mejorar producción ovina en regiones tropicales húmedas de todo el mundo (De Almeida *et al.*, 2018).

El mejoramiento genético, mediante la identificación de los polimorfismos en los genes *GDF9* y *BMP15* y posterior selección de dicho carácter se ha llevado a cabo desde 1966. Dada su

baja heredabilidad y control fenotípico es un proceso lento y complejo (Turner, 1966; Sierra, 1976a).

Estas variantes involucradas con la tasa de ovulación presentes en los genes *BMP15* y *GDF9* ya han sido identificadas mediante herramientas moleculares como PCR- RFLP y secuenciación directa sobre la región específica de ADN (Silva *et al.*, 2011). Así como también se han identificado polimorfismos en el gen *GDF9* en ovinos de pelo mediante el análisis HRM (Escobar-Chaparro *et al.*, 2017). Se ha mencionado que para lograr el máximo rendimiento de los corderos es necesario conocer su potencial genético y los factores ambientales que influyen sobre su crecimiento (González-Garduño *et al.*, 2002) y que individuos con polimorfismos en ambos genes *GDF9* y *BMP15* han sido reportados con una mayor tasa de ovulación de ovejas que con cualquiera de las mutaciones por separado (Hanrahan *et al.*, 2004), también se han descrito efectos de mutaciones en *GDF9* y *BMP15* que en conjunto afectan directamente en las células de la granulosa, lo que apoya la hipótesis de que ambos se complementan y actúan de forma sinérgica (Su *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2013).

En este estudio se identificaron las mutaciones B2 y B5 localizadas en el gen *BMP15* y G1, G4, G6 y G7 ubicadas en el gen *GDF9* en ovinos de pelo con características fenotípicas: Katahdin, Pellibuey, Balck Belly, Dorper y cruza.

Se extrajo el ADN genómico mediante el kit Quick-gDNATM. Posteriormente se verificó la integridad del ADN mediante un gel de agarosa al 0.8% (w/v) con buffer de corrida TAE 1X. Subsecuente a la extracción de ADN, se realizó la amplificación de los productos de interés mediante qPCR y el posterior análisis HRM.

Cabe recalcar que del total de las 100 muestras extraídas de ADN no todas se lograron identificar debido a que no presentaron las mismas condiciones de amplificación mediante qPCR, es decir, el producto amplificado no generó las suficientes copias de ADN detectables por fluorescencia para ser comparable con los controles estándar, pudiendo haber sido la muestra o error de pipeteo. Al realizar la prueba más de 3 veces, se optó por descartarlas, por lo que se obtuvo un nuevo número total de muestras analizadas (n = 89).

7.2. Análisis HRM (High Resolution Melt Analysis) para la detección de polimorfismos en el gen *GDF9* y *BMP15*.

Mediante la técnica HRM, se lograron identificar los polimorfismos en el gen *GDF9* y *BMP15*, en donde se analizaron muestras de ADN de ovinos de pelo, observando diferenciaciones por medio de las gráficas de temperatura de fusión (Melting Temperature). El análisis HRM ha demostrado ser más rápido, con una resolución más alta y un método alternativo más rentable para autenticar polimorfismos (Reed *et al.*, 2007; Erali *et al.*, 2008; Escobar-Chaparro *et al.*, 2017) así como para autenticar productos lácteos, alimentos, cárnicos y enfermedades humanas (Ganopoulos *et al.*, 2013; Sakaridis *et al.*, 2013; Druml *et al.*, 2014; Enache *et al.*, 2015).

7.2.1 Identificación del SNP G1 en el gen *GDF9*.

La identificación del polimorfismo G1 (R87H) localizado en el exón 1 del gen *GDF9*, mediante el análisis HRM realizado con controles sintéticos, en donde hay una transición de una A (adenina) por una G (guanina) en la posición 261 a partir del codón de inicio, se obtuvieron tres diferentes temperaturas y curvas de fusión correspondientes a los tres genotipos posibles. Con respecto al análisis de las muestras se identificaron los genotipos A/A, G/G y A/G, teniendo como referencias los controles sintéticos. En comparación con resultados que han sido reportados en un estudio anterior (Escobar-Chaparro *et al.*, 2017), no se encontró el genotipo AA ni AG del polimorfismo G1 en la población que se analizó de la región del Papaloapan. El ensayo realizado en las muestras de ovinos permitió identificar los genotipos A/A, G/G y A/G (Figura 10).

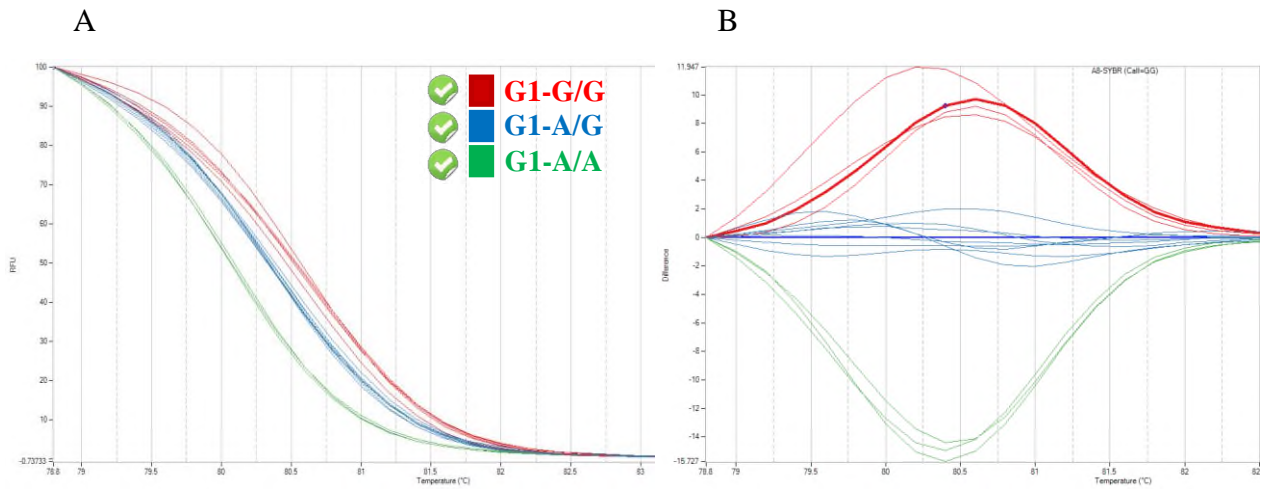


Figura 10. **Análisis HRM para el polimorfismo G1:** **A.** Curvas de disociación que indican la desnaturalización de los productos de qPCR en controles sintéticos y muestras. **B.** Diferencia de fluorescencia de los controles sintéticos GDF9PSG1, GDF9NSS1 y muestras a partir de las curvas de disociación para diferenciar genotipos.

7.2.2 Identificación del SNP G4 en el gen *GDF9*.

Para la identificación del polimorfismo G4 (E241K) localizado en el exón 2 del gen *GDF9*, en donde ocurre un cambio de base nitrogenada de una A por una G en la posición 723 a partir del codón de inicio, se obtuvieron tres curvas de fusión con una temperatura específica correspondientes a los tres genotipos posibles. El ensayo realizado en las muestras de ovinos permitió identificar los genotipos A/A, G/G y A/G (Figura 11).

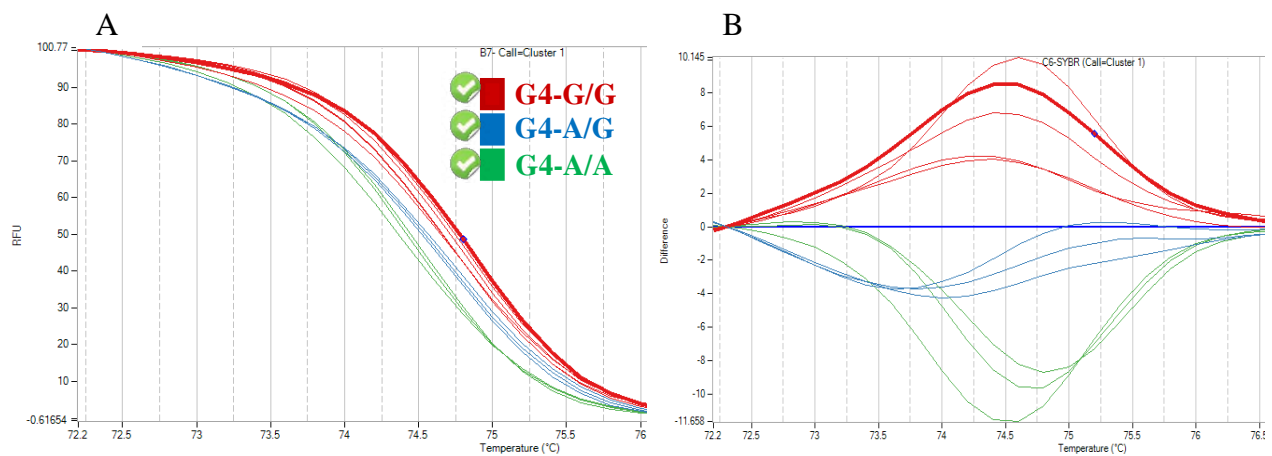


Figura 11. **Análisis HRM para el polimorfismo G4:** **A.** Curvas de disociación de los productos de qPCR en controles sintéticos y muestras. **B.** Diferencia de fluorescencia de los controles sintéticos GDF9PSG4, GDF9NSS4 y muestras.

En contraste con estudios anteriores (Escobar-Chaparro *et al.*, 2017), se puede mencionar que en este estudio hubo presencia de los tres genotipos, mientras en otras poblaciones de ovinos de la región del Papaloapan sólo se había reportado el genotipo AG y GG, esto se pudiese atribuir a las variantes en las razas y cruza ovinas comparadas.

7.2.3 Identificación del SNP G6 en el gen *GDF9*.

El polimorfismo G6 localizado en el exón 2 del gen *GDF9*, una transición de A/G en la posición 996 partir del codón de inicio, se identificó mediante HRM, se obtuvieron tres diferentes temperaturas y curvas de fusión correspondientes a los tres genotipos posibles. A partir de dicho análisis se obtuvo la siguiente distribución de los genotipos A/A, G/G y A/G. Cabe mencionar que Escobar *et al.*, 2017 reportó la presencia de los tres genotipos (AA, AG y GG). El ensayo realizado en las muestras de ovinos permitió identificar los genotipos A/A, G/G y A/G (Figura 12).

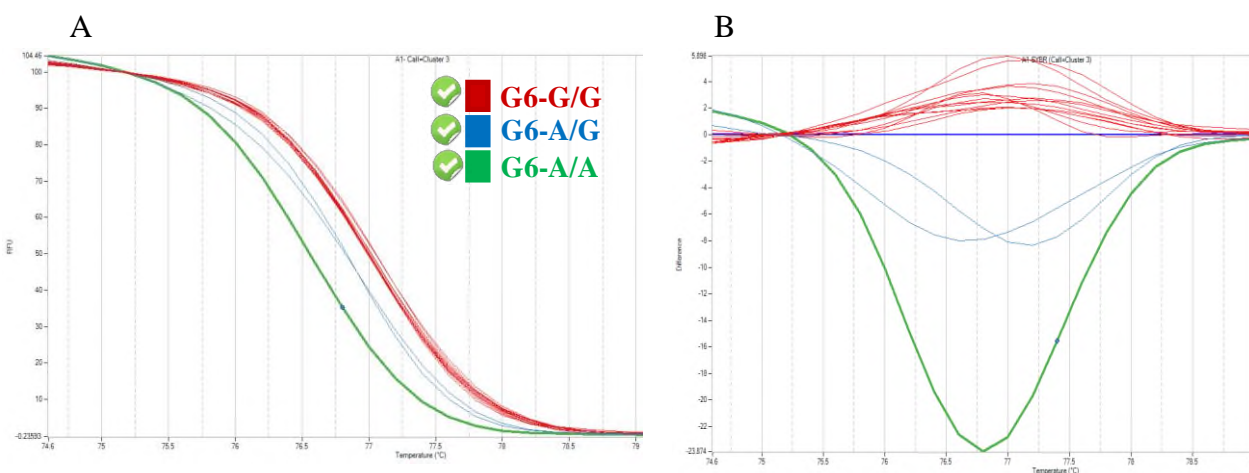


Figura 12. **Análisis HRM para el polimorfismo G6:** **A.** Curvas de disociación de los productos de qPCR en controles sintéticos y muestras. **B.** Diferencia de fluorescencia de los controles sintéticos GDF9PSG6, GDF9NSS6 y muestras.

7.2.4 Identificación del SNP G7 en el gen *GDF9*.

El ensayo HRM para el polimorfismo G7 mostró la diferenciación de los genotipos en los controles sintéticos, sin embargo, al analizar las muestras de ADN de ovinos, únicamente se identificó el genotipo A/G y G/G localizado en el exón 2 del gen *GDF9* en el análisis HRM (Figura 13.), donde se obtuvieron tres diferentes temperaturas y curvas de fusión correspondientes a los tres genotipos posibles respecto a los controles.

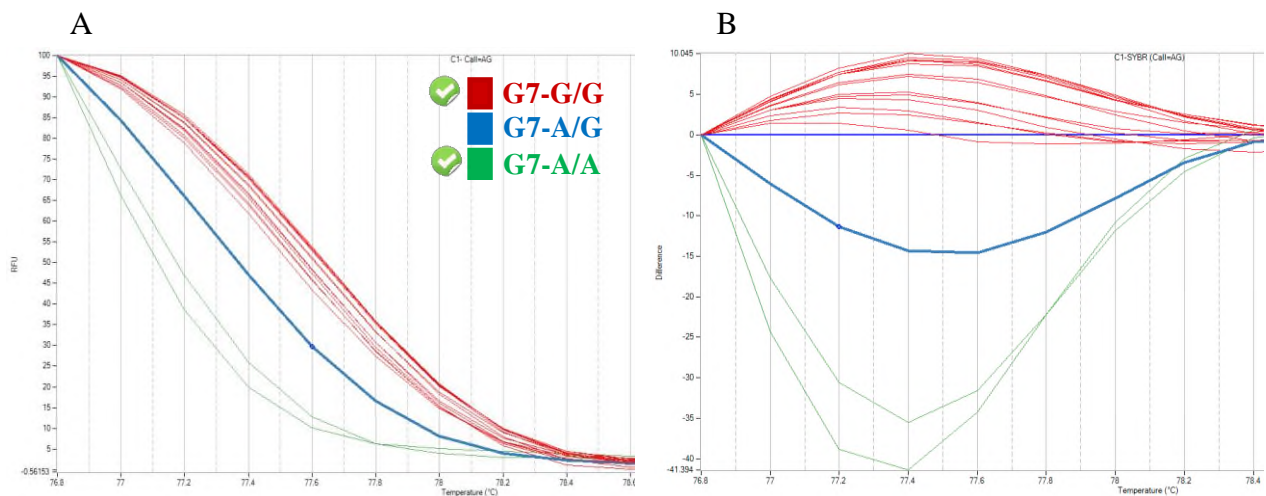


Figura 13. Análisis HRM para el polimorfismo G7: **A.** Curvas de disociación de los productos de qPCR en controles sintéticos y muestras. **B.** Diferencia de fluorescencia de los controles sintéticos GDF9PSG7, GDF9NSS7 y muestras.

7.2.5 Identificación del SNP B2 en el gen *BMP15*.

Estudios han reportado que el descubrimiento de los polimorfismos presentes en el gen *BMP15* en ovejas facilita el uso de alelos para mejorar la prolificidad de las razas ovinas no prolíficas (Kumar *et al.*, 2008), lo cual acredita la importancia de estudiar e identificar dichos genes.

Mediante la técnica HRM se realizó la identificación del polimorfismo B2 en el gen *BMP15*, una transición de C/T mediante el análisis HRM mostró la diferenciación de los tres genotipos respecto a los controles sintéticos. Por otro lado, en las muestras de ADN de ovino se identificaron los genotipos C/C y C/T (Figura 14). El cambio de C a T (B2) en el nucleótido 718 introduce un codón de paro prematuro en el lugar de ácido glutámico en el residuo de aminoácido 239 de la proteína no procesada, que presumiblemente como resultado la pérdida completa de la función *BMP15* (Hanrahan *et al.*, 2004). La posición de B2 (FecX G) es una mutación asociada con la esterilidad.

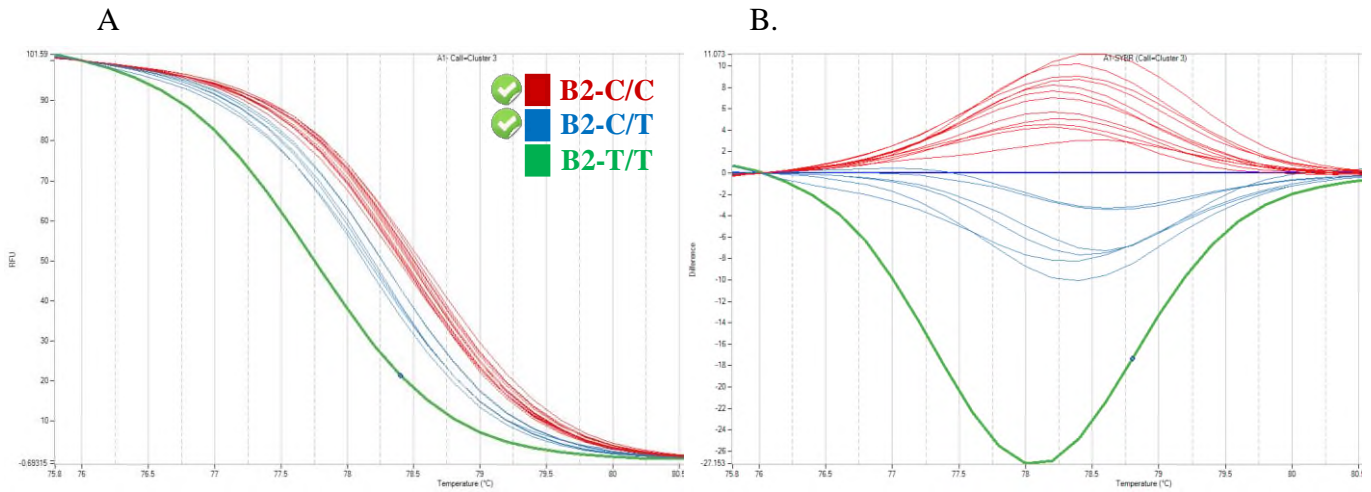


Figura 14. Análisis HRM para el polimorfismo B2: **A.** Curvas de disociación de los productos de qPCR en controles sintéticos y muestras. **B.** Diferencia de fluorescencia de los controles sintéticos BMP15PSB2, BMP15NSS2 y muestras.

7.2.6 Identificación del SNP B5 en el gen *BMP15*.

El análisis HRM para la identificación del polimorfismo B5 en el gen *BMP15*, una transición de G/A, mostró la diferenciación de los genotipos en los controles sintéticos, sin embargo, al analizar las muestras de ADN de ovinos, se observaron los genotipos G/G y A/A presentes en las muestras de ADN ovino (Figura 15). Los dos cambios de nucleótidos en el gen *BMP15* dan lugar a cambios más importantes en la proteína.

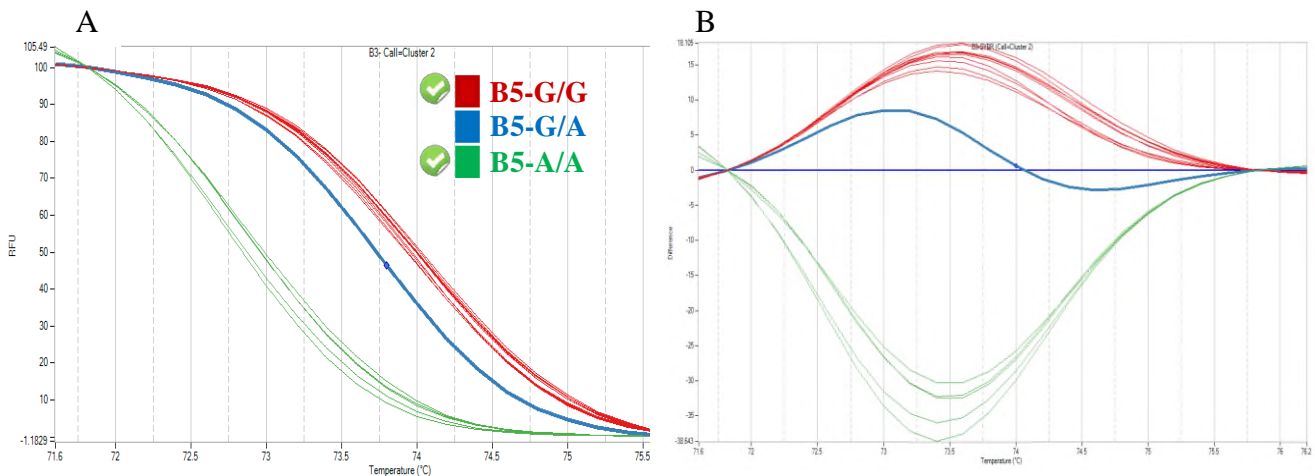


Figura 15. Análisis HRM para el polimorfismo B5: **A.** Curvas de disociación de los productos de qPCR en controles sintéticos y muestras. **B.** Diferencia de fluorescencia de los controles sintéticos BMP15PSB5, BMP15NSS5 y muestras.

7.3 Análisis estadístico de frecuencias alélicas y genotípicas de la población ovina.

7.3.1 SNP G1 en el gen *GDF9*.

El polimorfismo G1(R87H), presentó en la población de 89 individuos una frecuencia alélica para G de 0.53 (53%). El alelo dominante fue G (alelo mayor). De la misma forma, el polimorfismo G4 (E241K), presentó una forma genotípica (GG) Homocigoto, en la población se observó una frecuencia alélica para G de 0.82 (82%). El alelo dominante fue G (alelo mayor). Por otra parte, el polimorfismo G6 (V332I) presentó en la población de 89 individuos una frecuencia alélica para G de 0.66 (66%). El alelo dominante fue G (alelo mayor). De la misma forma, el polimorfismo G7 (V371M), presentó una forma genotípica (GG) Homocigoto, en la población se observó una frecuencia alélica para G de 0.98 (98%). El alelo dominante fue G (alelo mayor). En la tabla 9, se observa que la frecuencia del genotipo para el homocigoto AA fue de 0.28, para el heterocigoto AG de 0.37 y para el homocigoto GG de 0.35 en el ganado ovino respecto a la identificación de la mutación G1 (E241K) mientras que la frecuencia de los alelos A y G fueron de 47% y 53% respectivamente, siendo el alelo GG el predominante. Se obtuvo un valor de $X^2_{obs}=9.10$ que se comparó con el valor obtenido de tablas que fue igual a $X^2_{teorica}=5.99$ con 2 grados de libertad y un grado de confianza igual a 0.05. Como $X^2_{obs}>X^2_{teorica}$, la diferencia es significativa, lo que indica que p^2-q^2 es diferente de lo observado y que en la población no se cumple con el equilibrio Hardy Weinberg.

La cual establece que, en una población suficientemente grande, en la que los apareamientos se producen al azar y que no se encuentra sometida a mutación, selección o migración, las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de una generación a otra, una vez alcanzado un estado de equilibrio que en loci autosómicos se alcanza tras una generación (Iniesta *et al.*, 2005).

Tabla 9. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para el SNP G1

	Genotipos				Frecuencia alélica	
	AA	AG	GG	Total	A	G
Número de individuos observados	25	33	31	89	0.47	0.53
Frecuencia genotípica observada	0.28	0.37	0.35	1		
Frecuencia genotípica esperada $p^2 + 2pq + q^2$	0.17	0.48	0.35	1		
Número de individuos esperados	15	43	31	89		

Se ha observado en otros estudios que el polimorfismo G1 (260 pb, G/A, R87H), conduce un aumento en el tamaño de camada en animales heterocigotos G/A (1.386 ± 0.050) en comparación con el genotipo silvestre G/G (1.238 ± 0.032) y ovejas portadoras homocigotas A/A (1.032 ± 0.094) en ovinos Baluchi. (Moradband *et al.*, 2011; Barzegari *et al.*, 2010).

7.3.2 SNP G4 en el gen *GDF9*.

En la tabla 10, se observa que la frecuencia del genotipo para el homocigoto AA fue de 0.08, para el heterocigoto AG de 0.19 y para el homocigoto GG de 0.73 en el ganado ovino respecto a la identificación de la mutación G4 (E241K) mientras que la frecuencia de los alelos A y G fueron de 17% y 83% respectivamente, siendo el alelo GG el predominante.

Otros estudios reportan que el polimorfismo G4 (721 pb, G/A, E241K) en animales homocigotos A/A o G/G son fértiles, no conducen a esterilidad (Hanrahan *et al.*, 2004).

Se obtuvo un valor de $X^2_{obs}=15.10$ que se comparó con el valor obtenido de tablas que fue igual a $X^2_{teorica}=5.99$ con 2 grados de libertad y un grado de confianza igual a 0.05. Como $X^2_{obs} > X^2_{teorica}$, la diferencia es significativa, lo que indica que p^2-q^2 es diferente de lo observado y que en la población no se cumple con el equilibrio Hardy Weinberg.

Tabla 10. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para el SNP G4

	Genotipos			Total	Frecuencia alélica	
	AA	AG	GG		A	G
Número de individuos observados	7	17	65	89	0.17	0.83
Frecuencia genotípica observada	0.08	0.19	0.73	1		
Frecuencia genotípica esperada $p^2 + 2pq + q^2$	0.02	0.25	0.73	1		
Número de individuos esperados	2	22	65	89		

7.3.3 SNP G6 en el gen *GDF9*.

En la tabla 11, se observa que la frecuencia del genotipo para el homocigoto AA fue de 0.019 para el heterocigoto AG de 0.28 y para el homocigoto GG de 0.53 en el ganado ovino respecto a la identificación de la mutación G6 (V332I) mientras que la frecuencia de los alelos A y G fueron de 33% y 67% respectivamente, siendo el alelo GG el predominante. Se obtuvo un valor de $X^2_{obs}=19.15$ que se comparó con el valor obtenido de tablas que fue igual a

$X^2_{teorica}=5.99$ con 2 grados de libertad y un grado de confianza igual a 0.05. Como $X^2_{obs}>X^2_{teorica}$, la diferencia es significativa, lo que indica que p^2-q^2 es diferente de lo observado y que en la población no se cumple con el equilibrio Hardy Weinberg.

El polimorfismo G6 (994 pb, G/A, V332I) aún no ha sido reportado como una mutación que causa de un incremento en la tasa de ovulación (Hanrahan *et al.*, 2004), sin embargo, se ha encontrado en muchas poblaciones, esto podría indicar o bien una relación con otros polimorfismos o aún falta más información que pueda indicar una posible conexión con la prolificidad.

Tabla 11. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para el SNP G6.

	Genotipos				Frecuencia alélica	
	AA	AG	GG	Total	A	G
Número de individuos observados	17	25	47	89	0.33	0.67
Frecuencia genotípica observada	0.19	0.28	0.53	1		
Frecuencia genotípica esperada $p^2 + 2pq + q^2$	0.07	0.4	0.53	1		
Número de individuos esperados	7	35	47	89		

7.3.4 SNP G7 en el gen *GDF9*.

En la tabla 12, se observa que la frecuencia del genotipo para el homocigoto AA fue de 0.01, para el heterocigoto AG de 0.0 y para el homocigoto GG de 0.99 en el ganado ovino respecto a la identificación de la mutación G7 (V371M), mientras que la frecuencia de los alelos A y G fueron de 17% y 83% respectivamente, siendo el alelo GG el predominante. Se obtuvo un valor de $X^2_{obs}=15.10$ que se comparó con el valor obtenido de tablas que fue igual a $X^2_{teorica}=5.99$ con 2 grados de libertad y un grado de confianza igual a 0.05. Como $X^2_{obs}>X^2_{teorica}$, la diferencia es significativa, lo que indica que p^2-q^2 es diferente de lo observado y que en la población no se cumple con el equilibrio Hardy Weinberg.

Tabla 12. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para el SNP G7.

	Genotipos			Total	Frecuencia alélica	
	AA	AG	GG		A	G
Número de individuos observados	1	0	88	89	0.01	0.99
Frecuencia genotípica observada	0.01	0	0.99	1		
Frecuencia genotípica esperada $p^2 + 2pq + q^2$	0.00004	0.019	0.98	1		
Número de individuos esperados	0.01	0.99	88	89		

En otros estudios, el polimorfismo G7 (1111 pb, G/A, V371M) en animales homocigotos A/A o G/G son fértiles, no conducen a esterilidad. Ovejas Finnsheep que son portadores del alelo heterocigoto G/A tienen un aumento en la tasa de ovulación (+0.17) (Mullen and Hanrahan *et al.*, 2016)

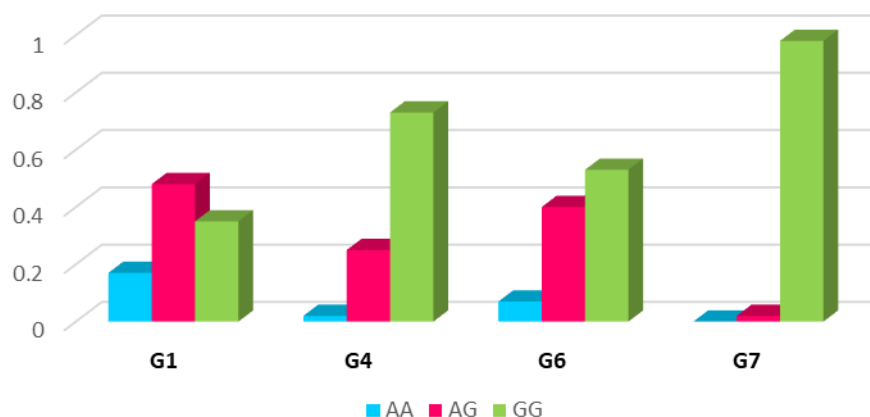


Figura 16. Frecuencias genotípicas esperadas ($p^2 + 2pq + q^2$) para los polimorfismos G2, G4, G6 y G7 en el gen *GDF9*.

7.3.5 SNP B2 en el gen *BMP15*.

El polimorfismo B2 (Q239Stop), presentó en la población de 89 individuos una frecuencia alélica para T de 0.79 (79%). El alelo dominante fue C (alelo mayor). De la misma forma, el polimorfismo B5 (C53Y), presentó una forma genotípica (GG) Homocigoto, en la población se observó una frecuencia alélica para G de 0.96 (96%). El alelo dominante fue G (alelo mayor).

En la tabla 13, se observa que la frecuencia del genotipo para el homocigoto CC fue de 0.0, para el heterocigoto AG de 0.11 y para el homocigoto GG de 0.89 en el ganado ovino respeto

a la identificación de la mutación B2 (Q239Stop), mientras que la frecuencia de los alelos A y G fueron de 0.06% y 0.94% respectivamente, siendo el alelo GG el predominante. Se obtuvo un valor de $X^2_{obs}=0.30$ que se comparó con el valor obtenido de tablas que fue igual a $X^2_{teorica}=5.99$ con 2 grados de libertad y un grado de confianza igual a 0.05. Como $X^2_{obs}<X^2_{teorica}$, la diferencia es significativa, lo que indica que p^2-q^2 es diferente de lo observado y que en la población si cumple con el equilibrio Hardy Weinberg.

Tabla 13. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para el SNP B2

	Genotipos			Total	Frecuencia alélica	
	CC	CT	TT		A	G
Número de individuos observados	0	10	79	89	0.06	0.94
Frecuencia genotípica observada	0	0.11	0.89	1		
Frecuencia genotípica esperada $p^2 + 2pq + q^2$	0.003	0.10	0.88	1		
Número de individuos esperados	0.3	9.7	79	89		

7.3.6 SNP B5 en el gen *BMP15*.

En la tabla 14, se observa que la frecuencia del genotipo para el homocigoto AA fue de 0.04, para el heterocigoto AG de 0.0 y para el homocigoto GG de 0.96 en el ganado ovino respecto a la identificación de la mutación B5 (C53Y), mientras que la frecuencia de los alelos A y G fueron de 0.04% y 0.96% respectivamente, siendo el alelo GG el predominante. Se obtuvo un valor de $X^2_{obs}=343$ que se comparó con el valor obtenido de tablas que fue igual a $X^2_{teorica}=5.99$ con 2 grados de libertad y un grado de confianza igual a 0.05. Como $X^2_{obs}>X^2_{teorica}$, la diferencia es significativa, lo que indica que p^2-q^2 es diferente de lo observado y que en la población no cumple con el equilibrio Hardy Weinberg.

Este polimorfismo sustituye a un grupo hidrofóbico no polar (Ala) por un grupo polar no cargado (Thr) en el resto 119 del péptido maduro, lo que sugiere que afecte la actividad de la proteína madura (Vacca *et al.*, 2010).

Tabla 14. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para el SNP B5

	Genotipos			Total	Frecuencia alélica	
	GG	GA	AA		A	G
Número de individuos observados	4	0	85	89	0.04	0.96
Frecuencia genotípica observada	0.04	0	0.96	1		
Frecuencia genotípica esperada $p^2 + 2pq + q^2$	0.0005	0.04	0.95	1		
Número de individuos esperados	0.05	3.95	85	89		

7.3.4 Combinaciones estadísticas de las frecuencias alélicas y genotípicas el gen *GDF9* y *BMP15*.

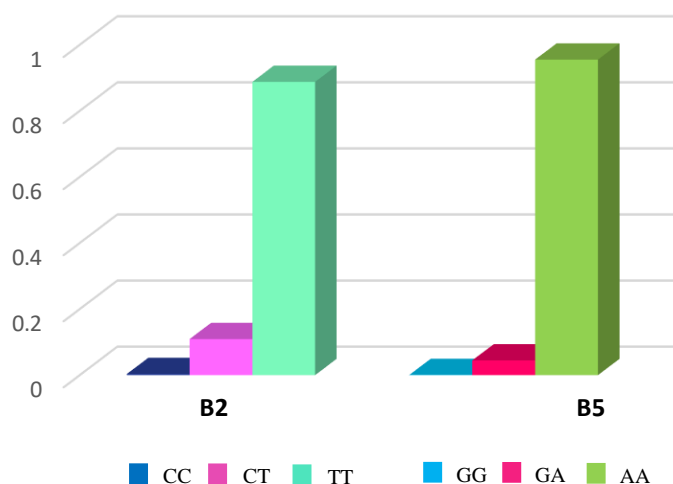


Figura 17. Frecuencia genotípica esperadas ($p^2 + 2pq + q^2$) para los polimorfismos B2 y B5 en el gen *BMP15*.

En la tabla 15 se observa la comparación de frecuencias alélicas y genotípicas de las razas estudiadas de manera individual para la identificación de la mutación G1. Obteniendo como resultado general que la frecuencia genotípica observada predominante fue el homocigoto GG representado con letras en color rojo mientras que el homocigoto AA no se ve expresado. Aunado a esto, la frecuencia de alelos G indicado en color azul en las razas estudiadas también mostró mayor dominancia respecto al alelo A.

En la tabla 15 se observa la comparación de frecuencias alélicas y genotípicas de las razas estudiadas de manera individual para la identificación de la mutación G1. Obteniendo como resultado general que la frecuencia genotípica observada predominante fue el homocigoto GG representado con letras en color rojo mientras que el homocigoto AA no se ve expresado. Aunado a esto, la frecuencia de alelos G indicado en color azul en las razas estudiadas también mostró mayor dominancia respecto al alelo A. Por otra parte, en la tabla 16-20 se observa la comparación de frecuencias alélicas y genotípicas de las razas estudiadas de manera individual para la identificación de la mutación G4, G6, G7, B2 y B5, donde se muestra que la frecuencia genotípica observada más sobresaliente fue el homocigoto silvestre, en algunos casos el alelo GG, en otros casos el alelo TT, representado con letras en color rojo mientras que el otro alelo homocigoto y heterocigoto se mantienen variable, dependiendo la raza. Incorporado a esto, la frecuencia de alelos G indicado en color azul en las razas estudiadas también mostró mayor dominancia respecto al alelo A.

Tabla 15. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para el SNP G1 en distintas razas.

Razas	BB				DP				PB				KT				Cruzas			
	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total
Número de individuos observados	2	9	3	14	2	0	0	2	10	11	11	32	2	7	7	16	9	6	10	25
Frecuencia genotípica observada	0.143	0.642857	0.21428571	1	1	0	0	1	0.313	0.344	0.344	1	0.125	0.438	0.438	1	0.36	0.24	0.4	1
Frecuencia genotípica esperada $p^2 + 2pq + q^2$	0.768	0.216824	0.01530612	1	1	0	0	1	0.803	0.186	0.011	1	0.697	0.276	0.027	1	0.763	0.221	0.016	1
Número de individuos esperados	10.75	3.03553	0.21428571	14	2	0	0	2	25.71	5.946	0.344	32	11.15	4.417	0.438	16	19.08	5.525	0.4	25
Frecuencias alélicas	A		G		A		G		A		G		A		G		A		G	
	0.464285714		0.535714286		1		0		0.484375		0.515625		0.34375		0.65625		0.48		0.52	

Tabla 16. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para el SNP G4 en distintas razas.

Razas	BB				DP				PB				KT				Cruzas			
	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total
Número de individuos observados	0	1	13	14	0	0	2	2	5	4	23	32	0	5	11	16	2	7	16	25
Frecuencia genotípica observada	0	0.071429	0.9285714	1	0	0	1	1	0.15625	0.125	0.71875	1	0	0.3125	0.6875	1	0.08	0.28	0.64	1
Frecuencia genotípica esperada $p^2 + 2pq + q^2$	0.551429	0.382857	0.0663265	1	0.09	0.4	0.5	1	0.72	0.25	0.02	1	0.62	0.32	0.04	1	0.70	0.26	0.026	1
Número de individuos esperados	7.71714	5.35357	0.9285714	14	0.171429	0.8	1	2	23.1	8.15	0.71	32	10.0	5.25	0.68	16	17.6	6.72	0.64	25
Frecuencias alélicas	A		G		A		G		A		G		A		G		A		G	
	0.035714286		0.964285714		0		1		0.21875		0.78125		0.15625		0.84375		0.22		0.78	

Tabla 17. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para el SNP G6 en distintas razas.

Razas	BB				DP				PB				KT				Cruzas			
	AA	AG	GG	Tota 1	A A	A G	G G	Tota 1	AA	AG	GG	Tota 1	AA	AG	GG	Tota 1	AA	AG	GG	
Número de individuos observados	4	2	8	14	2	0	0	2	3	7	22	32	4	8	4	16	4	9	12	25
Frecuencia genotípica observada	0.286	0.142857	0.5714285	1	1	0	0	1	0.094	0.214	0.688	1	0.25	0.5	0.25	1	0.16	0.36	0.48	1
Frecuencia genotípica esperada $p^2 + 2pq + q^2$	0.637	0.322428	0.0408163	1	1	0	0	1	0.728	0.25	0.021	1	0.766	0.219	0.016	1	0.742	0.239	0.019	1
Número de individuos esperados	8.915	4.513997	0.57142857	14	2	0	0	2	23.31	8.006	0.688	32	12.25	3.5	0.25	16	18.55	5.968	0.48	25
Frecuencias alélicas	A		G		A		G		A		G		A		G		A		G	
	0.357142857		0.642857143		1		0		0.203125		0.796875		0.5		0.5		0.34		0.66	

Tabla 18. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para el SNP G7 en distintas razas.

Razas	BB				DP				PB				KT				Cruzas			
	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	
Número de individuos observados	1	0	13	14	0	0	2	2	0	0	32	32	0	0	16	16	0	0	25	25
Frecuencia genotípica observada	0.071	0	0.9285	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
Frecuencia genotípica esperada $p^2 + 2pq + q^2$	0.551	0.382426	0.0663	1	0.09	0.4142	0.5	1	0.678	0.291	0.031	1	0.563	0.375	0.063	1	0.64	0.32	0.04	1
Número de individuos esperados	7.717	5.35396	0.9285	14	0.17	0.8284	1	2	21.69	9.314	1	32	9	6	1	16	16	8	1	25
Frecuencias alélicas	A		G		A		G		A		G		A		G		A		G	
	0.071428571		0.928571429		0		1		0		1		0		1		0		1	

Tabla 19. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para el SNP B2 en distintas razas.

Razas	BB				DP				PB				KT				Cruzas			
	CC	CT	TT	Total	CC	CT	TT	Total	CC	CT	TT	Total	CC	CT	TT	Total	CC	CT	TT	Total
Número de individuos observados	0	1	13	14	0	1	1	2	0	3	29	32	0	3	13	16	0	2	23	25
Frecuencia genotípica observada	0	0.071429	0.92857143	1	0	0.5	0.5	1	0	0.094	0.906	1	0	0.188	0.813	1	0	0.08	0.92	1
Frecuencia genotípica esperada $p^2 + 2pq + q^2$	0.551	0.382426	0.06632653	1	0.25	0.5	0.25	1	0.692	0.28	0.028	1	0.6	0.349	0.051	1	0.653	0.31	0.037	1
Número de individuos esperados	7.717	5.35396	0.92857143	14	0.5	1	0.5	2	22.14	8.958	0.906	32	9.601	5.586	0.813	16	16.33	7.752	0.92	25
Frecuencias alélicas	A		G		A		G		A		G		A		G		A		G	
	0.035714286		0.964285714		0.25		0.75		0.046875		0.953125		0.09375		0.90625		0.04		0.96	

Tabla 20. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para el SNP B5 en distintas razas.

Razas	BB				DP				PB				KT				Cruzas			
	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total
Número de individuos observados	0	0	14	14	0	0	2	2	1	0	31	32	1	0	15	16	2	0	23	25
Frecuencia genotípica observada	0	0	1	1	0	0	1	1	0.03	0	0.96	1	0.06	0	0.93	1	0.08	0	0.92	1
Frecuencia genotípica esperada $p^2 + 2pq + q^2$	0.537	0.39166	0.071	1	0.09	0.414	0.5	1	0.68	0.28	0.03	1	0.57	0.36	0.05	1	0.65	0.31	0.03	1
Número de individuos esperados	7.517	5.48331	1	14	0.17	0.828	1	2	21.8	9.19	0.96	32	9.19	5.87	0.93	16	16.3	7.75	0.92	25
Frecuencias alélicas	A		G		A		G		A		G		A		G		A		G	
	0		1		0		1		0.03125		0.96875		0.0625		0.9375		0.08		0.92	

7.4 Combinaciones alélicas de los polimorfismos encontrados en la población ovina.

Del total de la población estudiada, el 51% tuvo al menos un polimorfismo relacionado con la prolificidad, mostrándose en la parte sombreada de color amarillo de la Figura 18. El 19.1% presentó el genotipo A/G del polimorfismo G1, descrito en estudios anteriores como un genotipo de fecundidad (Hanrahan *et al.*, 2004; Moradband *et al.*, 2011; Barzegari *et al.*, 2010, Paz *et al.*, 2014; Shokrollahi *et al.*, 2018), y respecto a los demás polimorfismos G4, G6, G7 ubicado en el gen *GDF9* y B2, B5 ubicados en el gen *BMP15*, se conservó el genotipo silvestre, es decir sin ninguna alteración en la secuencia de ADN. Aunado a esto, el 11.2% presentó el genotipo A/A, actuando muy similar al genotipo G/G del polimorfismo G1, respecto a la tasa de ovulación de acuerdo con estudios previos (Tang *et al.*, 2018; Arefnejad *et al.*, 2018), en cuanto a los demás polimorfismos se conservó también el genotipo silvestre. Además, el 11.2% de la población conservó el polimorfismo silvestre de los seis polimorfismos estudiados. La población restante tuvo una variabilidad en relación los seis polimorfismos identificados tal como se muestra en la Figura 17. Donde se puede observar que en la población existen los polimorfismos que han sido reportados en otras regiones y además otras razas (Wang *et al.*, 2018; Pineda *et al.*, 2018; Al-Mutar *et al.*, 2018).

Dicha población estudiada presentó características inconstantes genotípicamente, tanto animales con registro de parto doble, así como animales con registro de parto simple, presentaron polimorfismos que han sido adjudicados con relación a la prolificidad, lo cual muy probable se deba a que se tomó registro de una generación (F1) que no permitió observar la expresión fenotípicamente en un lapso de tiempo más prolongado. Adicionalmente, es importante tener en cuenta no solo la recomendación de recolectar los datos por periodos largos sino el registro del tipo de parto de las madres (sencillo, doble o triple), ya que hembras nacidas de partos múltiples tienen una mayor probabilidad de presentar partos múltiples en su vida reproductiva (Sierra, 1979).

Según lo reportado, aquellos animales que portan el gen de fecundidad con relación a la prolificidad, debido a que el índice de heredabilidad es de 0.10 para el tamaño de camada al nacer (Hanford *et al.*, 2003; Bromley *et al.*, 2000), valor muy bajo respecto a otras características de fertilidad (Turner *et al.*, 1966), lo que significa que este rasgo está vinculado fuertemente con la interacción de la variación ambiental y no con la genética. Siendo, la heredabilidad específica de la población y el ambiente donde se ha determinado (Falconer &

destete en bandadas de razas de doble propósito. El mantenimiento de altos niveles de fertilidad (definido como el porcentaje de hembras que paren) y altos niveles de fecundidad son críticos para una producción eficiente de ovinos (Notter, 2008), siendo los rasgos de fertilidad los que tienen el mayor impacto financiero en la producción de ovejas (Majd *et al.*, 2019). Lo anterior conlleva a decir que no hay datos precisos para confirmar una relación genotipo-fenotipo en el análisis poblacional de este estudio, por lo que, a nivel poblacional no se puede realizar una selección asistida debido a que se involucran diferentes razas que tienen una variación genética que no se conservan en toda la población (cruzas indiscriminadas).

La prolificidad y las características reproductivas se caracterizan por tener bajas heredabilidades y ser sensibles a efectos genéticos no aditivos, por lo que la aplicación de métodos tradicionales de mejoramiento, basados en datos fenotípicos es un proceso que consume mucho tiempo. Entonces, la genética molecular y la selección asistida por marcadores tienen una alta importancia en el mejoramiento genético (Abdoli *et al.*, 2013) para utilizarlos, en mejorar y aumentar la productividad (Talebi *et al.*, 2018).

7.4.1 Combinaciones alélicas de los individuos con registro de parto múltiple.

Los resultados obtenidos para la identificación de los seis polimorfismos, en donde 17 hembras presentaron un parto doble (PD) y una hembra con parto triple (ID: 8) se observan en la Figura 19, además, se puede observar que el 44% de este muestreo presentó el genotipo A/G del polimorfismo G1 del gen *GDF9* asociado a un aumento en el tamaño de camada (Barzegari *et al.*, 2010; Shokrollahi *et al.*, 2018, Gorlov *et al.*, 2018), rasgo cuantitativo importante (Tang *et al.*, 2018) mientras que el 56% restante se identificó con el genotipo G/G y A/G. En combinación con el SNP G4, que se identificó como polimórfico, de las cuales dos muestras tuvieron el genotipo A/A reportado como genotipo de fertilidad, teniendo ausente el genotipo A/G del SNP G1. También se observa que el SNP G6 fue polimórfico, tanto individuos homocigotos como heterocigotos presentaron dichos alelos, sin embargo, este polimorfismo sigue como incognito para establecer una relación con la prolificidad, debido a que no se observa un patrón definido, más bien se muestra variable en la población estudiada.

ID	Raza	G1			G4			G6			G7			B2			B5		
		AA	AG ^t	GG	AA ^t	AG	GG	AA	AG	GG	AA	AG ^t	GG	CC ^e	CT ^t	TT ^t	AA	AG ^t	GG
3	PB																		
8*	PB		t																
17	PB		t																
57	PB																		
58	PB		t																
78	PB																		
80	PB				t														
81	PB				t														
91	PB																		
25	BB		t																
28	BB		t											t					
70	BB		t																
72	BB																		
49	KT		t																
82	KT																		
23	DP																		
29	CR		x																
92	CR																		

Figura 19. Combinaciones alélicas de los individuos analizados con registro de parto doble.

^t Polimorfismo relacionado con el aumento en el tamaño de camada.

^e Polimorfismo relacionado con esterilidad.

* Oveja con registro de parto triple.

Por otra parte, solo una hembra mostró el genotipo A/G (G1) y C/T (B2), siendo estos dos, genotipos deseables en otros estudios, donde se ha demostrado que son potenciales para establecer cruza asistidas (Poley *et al.*, 2010, Roy *et al.*, 2011). De la población estudiada, sólo dos hembras no tuvieron ninguna variación en su secuencia de ADN, mientras que en las restantes tuvieron al menos una variante de los SNPs que ya habían sido identificados.

En diversos estudios, se ha afirmado que el aumento en el tamaño de camada de las ovejas Decaani no se asocia con la mutación FecX^G (B2), porque las hembras tienen registro de trillizos en dos paridades consecutivas y sin presencia de la mutación, mientras que los nacimientos múltiples en las ovejas Garole y Kendrapada se deben al efecto de la mutación FecB, polimorfismo ubicado en el gen BMPR-IB, que fue uno de los primeros que se identificó en la raza Boorola (Nimbkar *et al.*, 2003; Pardeshi *et al.*, 2005). Esto nos hace suponer que, la raza es un factor que influye para la expresión de estos polimorfismos, recalcando que sólo dos hembras con características fenotípicas Pelibuey fueron identificadas

con la variación genética A/A de G4 y una para C/T de B2 con características fenotípicas de Black Belly.

En todo el estudio, se destaca que las hembras con características fenotípicas Pelibuey, presentaron el mayor valor de partos múltiples, por lo que se recomienda su utilización para mejorar la prolificidad en los rebaños. Así mismo, en otros estudios se ha descrito que la raza Pelibuey es una buena opción para realizar cruza asistidas, resaltando la rusticidad de los animales, además de que tienen un depósito de grasa intramuscular más tardío que los corderos de otras razas (Sañudo *et al.*, 1998, Kosgey *et al.*, 2007), por lo que depositan menor cantidad de grasa en la canal que animales de tipo lanar (Lirette *et al.*, 1984). Una gran ventaja comparativa que presentan respecto a animales lanares es considerar emplear la raza Pelibuey como línea materna, ya que, a pesar de tener una menor reserva lipídica en la canal, la grasa almacenada es suficiente para dar sabor, jugosidad y textura a la carne (Palacios *et al.*, 2000).

De igual modo, los valores de prolificidad encontrados en la raza PB, denotan ser buenos y con adaptabilidad reproductiva seguido de la raza Black Belly. Lo anterior, hace necesario recalcar que estas dos razas fueron las que mayor número de partos múltiples aportaron al análisis de los SNPs.

Cabe destacar que, en la población analizada, se identificaron diferentes polimorfismos ligados a la prolificidad, los datos revelaron que existe una variabilidad genética que no conserva ningún patrón que pueda ayudarnos a relacionar de mejor manera un vínculo genotipo-fenotipo, puesto que los tipos de cruzamiento afectan la prolificidad (Pineda *et al.*, 2018). Por lo anterior, podemos establecer que se revela la situación actual de la manera indiscriminada en que se han manejado las cruza, por lo que es prudente realizar propuestas para evitar una degeneración, puesto que en la mayoría de los rebaños ovinos no se implementan estrategias de cruzamientos dirigidos y se desconoce el verdadero potencial de los recursos en el sector pecuario con los que se cuenta en cada región. Con lo anterior, podemos sugerir que la presencia de algunos polimorfismos en unos animales y en otros no, sea porque hay factores externos que intervienen para que se expresen como la alimentación, el medio ambiente, la procedencia. En el análisis se observó que algunos animales mostraron presencia de SNP que han sido reportados con relación a la prolificidad sin embargo no hubo un prueba fenotípica que también se relacionara en algunos casos mientras que en otros sí, por

tal motivo, se sugiere que es posible que existan más genes que estén involucrados con el aumento en el tamaño de camada como lo sugieren otros autores que han demostrado que hay más genes que están relacionados con la prolificidad (Paz *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018; Foroughinia *et al.*, 2018).

Poblaciones que no han sido seleccionadas corren peligro de sufrir erosión genética por la manera en que son cruzadas, lo que les coloca en riesgo para la implementación de programas de mejoramiento (Montes *et al.*, 2013), debido a que, el propósito del mejoramiento genético es seleccionar a individuos genéticamente superiores en cada población, con el fin de transmitir el potencial genético a sus descendientes (Hayes *et al.*, 2013). Considerando las características de adaptación y buscando la combinación óptima entre el genotipo y el ambiente (Hernandez-Hernandez *et al.*, 2016; Galeano & Manrique, 2010), se potencializa su valor genético de los rebaños ovinos.

Aunque se ha investigado durante muchos años la prolificidad y los genes involucrados en dicho proceso, se siguen estudiando los procesos fisiológicos y moleculares que regulan la prolificidad en las ovejas, sin embargo, siguen sin estar claros debido a la regulación y sinergia de muchos genes (Tang *et al.*, 2019). Se han reportado más asociaciones de genes con mutaciones en BMP2 que podrían estar involucrados en una mayor prolificidad ovina (Zhang *et al.*, 2019) así como también del gen KISS1R / GPR54 (Majd *et al.*, 2019). Dentro del gen *GDF9*, se han encontrado más polimorfismos como Q320P y V397I, que tienen un efecto significativo en el tamaño de la camada. Estos hallazgos pueden proporcionar marcadores de ADN útiles para seleccionar individuos superiores en la selección asistida por marcadores (MAS) (Wang *et al.*, 2019). Actualmente y en el futuro se seguirá investigando sobre los marcadores que están ligados a características reproductivas que permitan mejorar una de las actividades pecuarias que son muy importantes porque forman parte de la alimentación en la población humana: la ovinocultura.

Este es el primer estudio que reporta la identificación de los polimorfismos presentes en los genes *GDF9* y *BMP15* en la población ovina de la región del Papaloapan, y es un comienzo para poder utilizarlos a futuro en esquemas de selección asistida para mejorar la prolificidad en estas razas.

CONCLUSIONES

La población ovina analizada tuvo al menos un genotipo esperado con relación a un aumento de la prolificidad, cabe mencionar que, aunque tuvo la incidencia de un alelo de fecundidad, no queda demostrada fenotípicamente tal característica, puesto que los datos registrados de una sola generación demuestran que no existe una relación que afirme la condición prolífica que se pretendía demostrar, por lo anterior podemos sugerir que existe una alta incidencia de cruza indiscriminadas al no tener un control en el cruzamiento de estas razas, por lo que el potencial genético se va degenerando.

Los resultados sugieren estrategias de mejoramiento que permitirán la mejora de la prolificidad de las razas de ovinos no prolíficas mediante la implementación de programas de asistencia técnica, investigación y extensión, donde los productores desarrollen habilidades para la proyección de indicadores de gestión y mercado.

PERSPECTIVAS

Conocer la variación genética en el ganado ovino que existe en la cuenca del Papaloapan para seleccionar los animales portadores de los genes prolíficos, tomando en cuenta sus registros productivos y reproductivos con el fin de establecer cruzas asistidas que permitan la heredabilidad a futuro de la prolificidad.

Los resultados de este trabajo, aportan información de base para la gestión genética de esta población, puesto que podría ser elegida para demostrar el efecto de la existencia de las mutaciones de estos genes prolíficos, considerándolos candidatos para estudiar su vida reproductiva en al menos cuatro generaciones que demuestren la presencia de dicha característica de los genes ligados a la prolificidad.

Se recomienda estructurar un programa de mejoramiento genético en esta especie y se destaca la importancia de recolectar la información en registros productivos y genealógicos, que permitan estimar la heredabilidad en sentido estricto, tendencias y correlaciones genéticas que posibiliten una adecuada estrategia de apareamientos.

REFERENCIAS

- Abdoli R, Zamani P, Deljou A, Rezvan H (2013) Association of *BMPR-1B* and *GDF9* genes polymorphisms and secondary protein structure changes with reproduction traits in Mehraban ewes. *Gene* 524:296–303.
- Acero, C. H. M. (2002). Posicionamiento de la carne ovina en el mercado mundial. Memoria II Taller sobre sistemas de producción ovina del noreste y Golfo de México. Universidad Autónoma de Tamaulipas, 11, 26-29.
- Alba, J. D. (1964). Reproducción y genética animal: Selección de ovinos para la producción de carne. Turrialba: Editorial gonzásIC.419-421
- Al-Mutar, H., Younis, L., & Khawla, H. (2018). Effect of the Point Mutation in Growth Differentiation Factor 9 Gene in Awassi Sheep Oocytes on Sterility and Fertility. *J Pure Appl Microbiol*, 12(4), 2095-2102.
- Arefnejad, B., Mehdizadeh, Y., Javanmard, A., Zamiri, M. J., & Niazi, A. (2018). Novel Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Two Oogenesis Specific Genes (*BMP15*, *GDF9*) and Their Association with Litter Size in Markhoz Goat (Iranian Angora). *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 8(1).
- Arteaga CJD, (2012). Mensaje institucional en el acto Inaugural del VII. Foro Ovino del Estado de México. INIFAP. ICAMEX.
- Barzegari, A., Atashpaz, S., Ghabili, K., Nemati, Z., Rustaei, M., & Azarbaijani, R. (2010). Polymorphisms in *GDF9* and *BMP15* associated with fertility and ovulation rate in Moghani and Ghezel sheep in Iran. *Reproduction in domestic animals*, 45(4), 666-669.
- Bodensteiner, K. J., Clay, C. M., Moeller, C. L., & Sawyer, H. R. (1999). Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biology of reproduction*, 60(2), 381-386.
- Bodin L. (2006). Genes mayores en ganado ovino, implicaciones en la reproducción. *Revista Pequeños Rumiantes*. vol 7 (3): 38-45.
- Bradford, G. E. (1985). Selection for litter size. *Genetics of reproduction in sheep*, 3-18.
- Bromley, C. M., Snowden, G. D., & Van Vleck, L. D. (2000). Genetic parameters among weight, prolificacy, and wool traits of Columbia, Polypay, Rambouillet, and Targhee sheep. *Journal of Animal Science*, 78(4), 846-858.
- Buratovich, O. F. (2013). Eficiencia reproductiva en ovinos: factores que la afectan. Parte I: La alimentación. Estación Experimental Agroforestal INTA Esquel, Chubut. *Ficha ganadería* 34: 153-158.
- Cantón, J. G. C., Velázquez, A. M., & Castellanos, A. R. (1992). Body composition of pure and crossbred Blackbelly sheep. *Small Ruminant Research*, 7(1), 61-66.
- Chang, H., Brown, C. W., & Matzuk, M. M. (2002). Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily. *Endocrine reviews*, 23(6), 787-823.
- Chávez-García, A., Vázquez-Martínez, E. R., Murcia, C., Rodríguez, A., Cerbón, M., & Mejía, O. (2015). Phenotypic and molecular characterization of intrauterine fetal growth restriction in interspecies sheep pregnancy. *Journal of animal science*, 93(10), 4692-4701.
- Chay-Canul, A. J. (2019). Productividad de ovejas Pelibuey y Katahdin en el trópico húmedo. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 6(16), 159-165.
- Chay-Canul, A. J., Ayala-Burgos, A. J., Kú-Vera, J. C., Magaña-Monforte, J. G., & Tedeschi, L. O. (2011). The effects of metabolizable energy intake on body fat depots of adult

- Pelibuey ewes fed roughage diets under tropical conditions. *Tropical animal health and production*, 43(5), 929-936.
- Chu, M. X., Guo, X. H., Feng, C. J., Li, Y., Huang, D. W., Feng, T., ... & Ma, Y. H. (2012). Polymorphism of 5' regulatory region of ovine FSHR gene and its association with litter size in Small Tail Han sheep. *Molecular biology reports*, 39(4), 3721-3725.
- Cruz, L. C. (1995). Generalidades de ovinos de pelo: Origen, distribución, razas, características. Memoria de la Experiencia en la producción de ovinos de pelo en CEIEGT (1978-1994). FMVZ-UNAM. Martínez de la Torre, Veracruz, México.
- Davis, G. H. (2005). Major genes affecting ovulation rate in sheep. In *Genetics Selection Evolution* (Vol. 37, No. 1, p. S11). BioMed Central.
- Davis, G. H., Bruce, G. D., & Dodds, K. G. (2001). Ovulation rate and litter size of prolific Inverdale (FecXI) and Hanna (FecXH) sheep. In *Proc. Assoc. Adv. Anim. Breed. Genet* (Vol. 14, pp. 175-178).
- Davis, G. H., McEwan, J. C., Fennessy, P. F., Dodds, K. G., & Farquhar, P. A. (1991). Evidence for the presence of a major gene influencing ovulation rate on the X chromosome of sheep. *Biology of Reproduction*, 44(4), 620-624.
- Davis, G. H., McEwan, J. C., Fennessy, P. F., Dodds, K. G., & McNatty, K. P. (1992). Infertility due to bilateral ovarian hypoplasia in sheep homozygous (FecXI FecXI) for the Inverdale prolificacy gene located on the X chromosome. *Biology of Reproduction*, 46(4), 636-640.
- Davis, G.H., McEwan, J.C., Fennessy, P.F. & Dodds, K.G. (1995). Discovery of the Inverdale gene (FecX). *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 55, 289–290.
- De Almeida, A. M. (2018). Barbados Blackbelly: the Caribbean ovine genetic resource. *Tropical animal health and production*, 50(2), 239-250.
- De Waal H.O., y Combrinck, W.J. (2000). El desarrollo de Dorper, su nutrición y una perspectiva del rumiante de pastoreo en veld. *Investigación de pequeños rumiantes* 36(1), 103-117.
- Dickson, L., Torres, G., D'aubeterre, R., & García, O. (2004). Factores que influyen en el intervalo entre partos y la prolificidad de un hato de carneros Pelibuey en Venezuela. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 38(1), 13-17.
- Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N., & Matzuk, M. M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis.
- Druml, B., & Cichna-Markl, M. (2014). High resolution melting (HRM) analysis of DNA—Its role and potential in food analysis. *Food chemistry*, 158, 245-254.
- Eguiarte Fruns, L. E. (1999). Una guía para principiantes a la genética de poblaciones. *Ciencias*, (001).
- Elias, E., Cohen, D., & Dayenoff, P. (1985). Characteristics and indices of reproduction in Dorper sheep. *Journal of the South African Veterinary Association*, 56(3), 127-130.
- Elvin, J. A., Yan, C., & Matzuk, M. M. (2000). Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(18), 10288-10293.
- Enache, E., Sin, A., Bancu, L., Ramière, C., Diaz, O., André, P., & Enache, L. (2015). Duplex high-resolution melting assay for the simultaneous genotyping of IL28B rs12979860 and PNPLA3 rs738409 polymorphisms in chronic hepatitis C patients. *International journal of molecular sciences*, 16(9), 22223-22242.
- Erali, M., Voelkerding, K. V., & Wittwer, C. T. (2008). High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Experimental and molecular pathology*, 85 (1), 50-58.

- Escobar-Chaparro, R. A., Guillén, G., Espejo-Galicia, L. U., Meza-Villalvazo, V. M., Peña-Castro, J. M., & Abad-Zavaleta, J. (2017). qPCR and HRM-based diagnosis of SNPs on growth differentiation factor 9 (*GDF9*), a gene associated with sheep (*Ovis aries*) prolificacy. *3 Biotech*, 7(3), 204.
- Fabre, S., Pierre, A., Mulsant, P., Bodin, L., Di Pasquale, E., Persani, L., & Monniaux, D. (2006). Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reprod Biol Endocrinol*, 4(20), 20-31.
- Fahmy, M. H. (1998). Zootechnical aspects of major genes in sheep production. In 49th Annual Meeting of the European Association for Animal Production (EAAP), Warschau, Book of Abstract. S (Vol. 206).
- Falconer, D. S., & Mackay, T. F. C. (1996). *Introduction to quantitative genetics* (1996) Essex (UK).
- Feitosa, A. L. V. L., da Silva Teixeira, M. F., Pinheiro, R. R., da Cunha, R. M. S., Lima, J. P. M. S., Andrioli, A., ... & Pinheiro, D. C. S. N. (2010). Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Northern Brazil. *Small ruminant research*, 94(1-3), 205-209.
- Fonte, L. M. B., Ampudia, Y. A., Medina, N. F., Apaulaza, L. L., Pérez, J. C. A., & Frontela, I. G. (2008). Obtención de sangre total ovina con fines diagnósticos. *REDVET*.
- Foroughinia, G., Fazileh, A., & Eghbalsaied, S. (2017). Expression of genes involved in BMP and estrogen signaling and AMPK production can be important factors affecting total number of antral follicles in ewes. *Theriogenology*, 91, 36-43. Khodabakhshzadeh, R., Mohammadabadi, M. R., Esmailzadeh, A. K., Shahrehabak, H. M., Bordbar, F., & Namin, S. A. (2016). Identification of point mutations in exon 2 of *GDF9* gene in Kermani sheep. *Polish journal of veterinary sciences*, 19(2), 281-289.
- Galeano, A. P., & Manrique, C. (2010). Estimación de parámetros genéticos para características productivas y reproductivas en los sistemas doble propósito del trópico bajo colombiano. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 57(II), 119-131.
- Galloway S.M., Cambridge L.M., Henry H.M., van Stijn T.C., Davis G.H. (1999). A genetic test to identify carriers of the ovine Inverdale prolificacy gene (*fecxi*), *Proc. NZ Soc. Anim. Prod.* 59 114–116.
- Galloway, S. M., Gregan, S. M., Wilson, T., McNatty, K. P., Juengel, J. L., Ritvos, O., & Davis, G. H. (2002). *BMP15* mutations and ovarian function. *Molecular and cellular endocrinology*, 191(1), 15-18.
- Galloway, S. M., McNatty, K. P., Cambridge, L. M., Laitinen, M. P., Juengel, J. L., Jokiranta, T. S. & Beattie, A. E. (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (*BMP15*) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature genetics*, 25(3), 279-283.
- Ganopoulos, I., Sakaridis, I., Argiriou, A., Madesis, P., & Tsafaris, A. (2013). A novel closed-tube method based on high resolution melting (HRM) analysis for authenticity testing and quantitative detection in Greek PDO Feta cheese. *Food chemistry*, 141(2), 835-840.
- Ghaderi, A., Nasiri, M. B., Mirzadeh, K. H., Fayazi, J., & Sadr, A. S. (2010). Identification of the *GDF9* mutation in two sheep breeds by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique. *African Journal of Biotechnology*, 9(47), 8020-8022.
- Gigli, I., Maizon, D. O., & Murcia, M. G. (2018). Polimorfismo genómico en la población de ovejas pampinta. *Semiárida*, 25(2), 56-57.

- González-Garduño R, G Torres-Hernández, MA Castillo. (2002). Crecimiento de corderos Blackbelly entre el nacimiento y el peso final en el trópico húmedo de México. *Vet Méx* 33, 443-453
- González-Godínez, A., Urrutia-Morales, J., & Gámez-Vázquez, H. G. (2014). Comportamiento reproductivo de ovejas Dorper y Katahdin empadradas en primavera en el norte de México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17(1).
- Gorlov, I. F., Kolosov, Y. A., Shirokova, N. V., Getmantseva, L. V., Slozhenkina, M. I., Mosolova, N. I., ... & Zlobina, E. Y. (2018). *GDF9* gene polymorphism and its association with litter size in two Russian sheep breeds. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, 29(1), 61-66.
- Griswold, M. D., Heckert, L., & Linder, C. (1995). The molecular biology of the FSH receptor. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 53(1), 215-218.
- Hanford, K. J., Van Vleck, L. D., & Snowden, G. D. (2003). Estimates of genetic parameters and genetic change for reproduction, weight, and wool characteristics of Targhee sheep. *Journal of Animal Science*, 81(3), 630-640.
- Hanrahan J., Gregan S., Mulsant P., Mullen M., Davis G., Powell R., Galloway S. (2003). Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors *GDF9* and *BMP15* are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (*Ovis aries*). *Biology of reproduction*. vol 70: 900–909.
- Hanrahan, J. P. (1977). Repeatability of ovulation rate and its relationship with litter size in four sheep breeds. In *Annales de génétique et de sélection animale* (Vol. 9, No. 1, pp. 126-126). EDP Sciences.
- Hanrahan, J. P., & Piper, L. R. (1982). Nature of the genetic control of ovulation rate and its relationship with litter size. In *Annales de génétique et de sélection animale* (Vol. 14, No. 4, p. 578b). BioMed Central.
- Hanrahan, J. P., Gregan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R., & Galloway, S. M. (2004). Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors *GDF9* and *BMP15* are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of reproduction*, 70(4), 900-909.
- Hayes, B. J., Lewin, H. A., & Goddard, M. E. (2013). The future of livestock breeding: genomic selection for efficiency, reduced emissions intensity, and adaptation. *Trends in Genetics*, 29(4), 206-214.
- Heckert, L. L., Daley, I. J., & Griswold, M. D. (1992). Structural organization of the follicle-stimulating hormone receptor gene. *Molecular Endocrinology*, 6(1), 70-80.
- Hernández-Hernández, N., Martínez-González, J. C., Parra-Bracamonte, G. M., & Cienfuegos-Rivas, E. G. (2016). Importancia de la interacción genotipo x ambiente en rasgos de producción en ganado lechero. *CienciaUAT*, 10(2), 72-78.
- Herrera, J., Pulgarón, P., & Noda, A. C. (2008). Comportamiento productivo de ovinos Pelibuey en un sistema con bajos insumos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 42(1).
- Herschhorn, A., & Hizi, A. (2010). Retroviral reverse transcriptases. *Cellular and molecular life sciences*, 67(16), 2717-2747.
- Hinojosa-Cuéllar, J. A., Oliva-Hernández, J., Torres-Hernández, G., Segura-Correa, J. C., & González-Garduño, R. (2015). Productividad de ovejas F1 Pelibuey x Blackbelly y sus cruces con Dorper y Katahdin en un sistema de producción del trópico húmedo de Tabasco, México. *Archivos de medicina veterinaria*, 47(2), 167-174.
- Iniesta, R., Guinó, E., & Moreno, V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gaceta Sanitaria*, 19(4), 333-341.

- Kaivo-Oja, N., Bondestam, J., Kämäräinen, M., Koskimies, J., Vitt, U., Cranfield, M., ... & Moustakas, A. (2003). Growth differentiation factor-9 induces Smad2 activation and inhibin B production in cultured human granulosa-luteal cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(2), 755-762.
- Kosgey, I. S., Baker, R. L., Udo, H. M. J., & Van Arendonk, J. A. (2006). Successes and failures of small ruminant breeding programmes in the tropics: a review. *Small ruminant research*, 61(1), 13-28.
- Kumar, S., Mishra, A. K., Kolte, A. P., Dash, S. K., & Karim, S. A. (2008). Screening for Booroola (FecB) and Galway (FecXG) mutations in Indian sheep. *Small Ruminant Research*, 80(1-3), 57-61.
- Lahoz B., Alabart J.L., Folch J., Calvo J.H., Martínez-Royo A., Fantova E. y Equipo de Veterinarios de UPRA-Grupo Pastores. (2011). Unidad de Tecnología en Producción Animal del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón Carnes Oviaragón SCL.
- Laitinen, M., Vuojolainen, K., Jaatinen, R., Ketola, I., Aaltonen, J., Lehtonen, E., Ritvos, O. (1998). A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mechanisms of development*, 78(1), 135-140.
- Lara, E. & Rolón, L. (1983). Comportamiento productivo del borrego Pelibuey en la Huasteca potosina, México. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 18:136
- Lebbie, S. H. B. (2004). Goats under household conditions. *Small ruminant research*, 51(2), 131-136.
- Leymaster, K. A. (2002). Fundamental aspects of crossbreeding of sheep: Use of breed diversity to improve efficiency of meat production. *Sheep and Goat Research Journal*, 17(3), 50-59.
- Liandris, E., Kominakis, A., Andreadou, M., Kapeoldassi, K., Chadio, S., Tsiligianni, T., ... & Ikonomopoulos, I. (2012). Associations between single nucleotide polymorphisms of GDF9 and BMP15 genes and litter size in two dairy sheep breeds of Greece. *Small ruminant research*, 107(1), 16-21.
- Liao, W. X., Moore, R. K., Otsuka, F., & Shimasaki, S. (2003). Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth and differentiation factor-9 Implication of the aberrant ovarian phenotype of BMP-15 mutant sheep. *Journal of Biological Chemistry*, 278(6), 3713-3719.
- Lin, S. Y., Morrison, J. R., Phillips, D. J., & de Kretser, D. M. (2003). Regulation of ovarian function by the TGF- β superfamily and follistatin. *Reproduction*, 126(2), 133-148.
- Lirette, A., Seoane, J. R., Minvielle, F., & Froehlich, D. (1984). Effects of breed and castration on conformation, classification, tissue distribution, composition and quality of lamb carcasses. *Journal of Animal Science*, 58(6), 1343-1357.
- Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W., & Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Research*, 4(6), 357-362.
- López-Zavala, R. (2010). Marcadores Genéticos, su detección y utilización como herramienta de selección en el ganado bovino; ¿Qué es lo que se está haciendo en Tamaulipas?. *CienciaUAT*, 4(4), 44-49.
- Macedo Barragán, R. J., Arredondo Ruiz, V., & Cervantes Lechuga, A. (2017). Cephalic and caudal morphology of Pelibuey, Katahdin and Blackbelly rams in Colima, México. *Veterinaria México*, 3(3), 1-9.

- Macías-Cruz, U., Álvarez-Valenzuela, F. D., Correa-Calderón, A., Molina-Ramírez, L., González-Reyna, A., Soto-Navarro, S., & Avendaño-Reyes, L. (2009). Pelibuey ewe productivity and subsequent pre-weaning lamb performance using hair-sheep breeds under a confinement system. *Journal of Applied Animal Research*, 36(2), 255-260.
- Macías-Cruz, U., Álvarez-Valenzuela, F. D., Rodríguez-García, J., Correa-Calderón, A., Torrentera-Olivera, N. G., Molina-Ramírez, L., & Avendaño-Reyes, L. (2010). Crecimiento y características de canal en corderos Pelibuey puros y cruzados F1 con razas Dorper y Katahdin en confinamiento. *Archivos de medicina veterinaria*, 42(3), 147-154.
- Majd, S. A., Ahmadi, A., Talebi, R., Koohi, P. M., Fabre, S., & Qanbari, S. (2019). Polymorphism identification in ovine KISS1R/GPR54 gene among pure and crossbreeds of Iranian sheep. *Small Ruminant Research*, 173, 23-29.
- Matesanz, J. (1965). Introducción de la ganadería en Nueva España 1521-1535. *Historia mexicana*, 14(4), 533-566.
- Matzuk, M. M. (2000). Revelations of ovarian follicle biology from gene knockout mice. *Molecular and cellular endocrinology*, 163(1), 61-66.
- Matzuk, M. M., Burns, K. H., Viveiros, M. M., & Eppig, J. J. (2002). Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science*, 296(5576), 2178-2180.
- Mazerbourg, S., Klein, C., Roh, J., Kaivo-Oja, N., Mottershead, D. G., Korchynskyi, O., ... & Hsueh, A. J. (2004). Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5. *Molecular Endocrinology*, 18(3), 653-665.
- Abdennebi, L., Monget, P., Pisselet, C., Remy, J. J., Salesse, R., & Monniaux, D. (1999). Comparative expression of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in ovarian follicles from high and low prolific sheep breeds. *Biology of reproduction*, 60(4), 845-854.
- McGrath, S. A., Esquela, A. F., & Lee, S. J. (1995). Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Molecular Endocrinology*, 9(1), 131-136.
- McNatty, K. P., Smith, P., Moore, L. G., Reader, K., Lun, S., Hanrahan, J. P., Juengel, J. L. (2005). Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate. *Molecular and cellular endocrinology*, 234(1), 57-66.
- McPherron, A. C., & Lee, S. J. (1993). GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *Journal of Biological Chemistry*, 268(5), 3444-3449.
- Mendoza, D. F. G. (2011). Pequeños Rumiantes: Un Proyecto con Posibilidad de Rentabilidad. *Conexión agropecuaria JDC*, 1(1), 67-74.
- Milne, C. (2000). The history of the Dorper sheep. *Small Ruminant Research*, 36(2), 99-102.
- Montes, D., Moreno, J., Hurtado, L., & Ramirez, R. (2013). Caracterización faneróptica y morfológica de la hembra ovina de pelo criollo (camura) colombiana, en la sub región sabanas y golfo de morrosquillo departamento de sucre, 5(1), 104-115.
- Montgomery, G. W., McNatty, K. P., & Davis, G. H. (1992). Physiology and molecular genetics of mutations that increase ovulation rate in sheep. *Endocrine Reviews*, 13(2), 309-328.
- Moore, R. K., Otsuka, F., & Shimasaki, S. (2003). Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), 304-310.
- Moradband, F., Rahimi, G., & Gholizadeh, M. (2011). Association of polymorphisms in fecundity genes of *GDF9*, *BMP15* and *BMP15-1B* with litter size in Iranian Baluchi sheep. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(9), 1179-1183.

- Morales, M. M., Dávila, J. P. M., Hernández, G. T., & Velasco, J. E. P. (2004). Evaluación del potencial para la producción ovina con el enfoque de agroecosistemas en un ejido de Veracruz, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 42(3), 347-359.
- Moreno, D. C., & Grajales, H. A. (2017). Caracterización de los sistemas de producción ovinos de trópico alto en Colombia: manejo e indicadores productivos y reproductivos. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 64(3), 36-51.
- Mottershead, D. G., Harrison, C. A., Mueller, T. D., Stanton, P. G., Gilchrist, R. B., & McNatty, K. P. (2013). Growth differentiation factor 9: bone morphogenetic protein 15 (*GDF9: BMP15*) synergism and protein heterodimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(25), E2257-E2257.
- Mueller, J., Sacchero, D., & Duga, L. (2015). Interacción genotipo ambiente sobre la producción de ovinos de lana superfina en la Patagonia. 2. Calidad de lana. *Revista Argentina de Producción Animal*, 25(3-4), 143-152.
- Mullen, M. P., & Hanrahan, J. P. (2014). Direct evidence on the contribution of a missense mutation in *GDF9* to variation in ovulation rate of Finnsheep. *PloS one*, 9(4), e95251
- Mulsant, P., Lecerf, F., Fabre, S., Schibler, L., Monget, P., Lanneluc, I., Cribiu, E. (2001). Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(9), 5104-5109.
- Muñoz, M. C., Tonhati, H., Costa, C., & Benavides, F. (2001). Interacción genotipo-ambiente en ganado Holstein colombiano. *Asociación Latinoamericana de Producción Animal*, 2, 74-78.
- Nimbkar, C., Ghalsasi, P.M., Maddox, J.F., Pardeshi, V.C., Sainani, M.N., Gupta, V., Walkden-Brown, S.W., (2003). Expression of *FecB* gene in Garole and Crossbred ewes in Maharashtra, India. In: *Proceedings of the fifteenth Conference of Assoc. Adv. Anim. Breed. Genet. (AAABG)*, July 7–11, Melbourne, Australia, 15, 111–114.
- Notter, D. R. (2008). Genetic aspects of reproduction in sheep. *Reproduction in domestic animals*, 43, 122-128.
- Notter, D. R., & Cockett, N. E. (2005). Opportunities for detection and use of QTL influencing seasonal reproduction in sheep: a review. In *Genetics Selection Evolution* (Vol. 37, No. 1, p. S39). BioMed Central.
- Nuncio-Ochoa, G., Nahed Toral, J., Díaz Hernández, B., Escobedo Amezcua, F., & Salvatierra Izaba, E. B. (2001). Caracterización de los sistemas de producción ovina en el estado de Tabasco. *Agrociencia*, 35(4).
- Otsuka, F., Moore, R. K., Iemura, S. I., Ueno, N., & Shimasaki, S. (2001). Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochemical and biophysical research communications*, 289(5), 961-966.
- Palacios, M. G. L., Lozano, M. S. R., & Martínez, S. E. V. (2000). Efecto del cruzamiento, sexo y dieta en la composición química de la carne de ovinos Pelibuey con Rambouillet y Suffolk. *Veterinaria México*, 31(1), 11-19.
- Palmer, J. S., Zhao, Z. Z., Hoekstra, C., Hayward, N. K., Webb, P. M., Whiteman, D. C., ... & Montgomery, G. W. (2006). Novel variants in growth differentiation factor 9 in mothers of dizygotic twins. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(11), 4713-4716.
- Pan, X., Liu, S., Li, F., Wang, W., Li, C., Ma, Y., & Li, T. (2014). Molecular characterization, expression profiles of the ovine FSHR gene and its association with litter size. *Molecular biology reports*, 41(12), 7749-7754.

- Pardeshi, V.C., Sainani, M.N., Maddox, J.F., Ghalsasi, P.M., Nimbkar, C., Gupta, V.S., (2005). Assessing the role of FecB mutation in productivity of Indian sheep. *Curr. Sci.* 89, 887–890.
- Paz, E., Quiñones, J., Bravo, S., Rodero, E., Gonzalez, A., & Sepúlveda, N. (2014). Identificación de los polimorfismos G1 y G8 del gen *GDF9* en ovinos criollos Araucanos. *Archivos de medicina veterinaria*, 46(2), 327-331.
- Peng, J., Li, Q., Wigglesworth, K., Rangarajan, A., Kattamuri, C., Peterson, R. T., & Matzuk, M. M. (2013). Growth differentiation factor 9: bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(8), E776-E785.
- Perón, N., Limas, T., & Fuentes, J. L. (1991). El ovino Pelibuey de Cuba. Revisión bibliográfica de algunas características productiva. *Fuentes*, 3(43), 0-7.
- Persani, L., Rossetti, R., Di Pasquale, E., Cacciatore, C., & Fabre, S. (2014). The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Human reproduction update*, 20(6), 869-883.
- Persing, D. H. (1993). Diagnostic molecular microbiology current challenges and future directions. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 16(2), 159-163.
- Pineda, R., Montes, D., & Hernandez, D. (2018). Association of the Polymorphisms FecXR, FecGH, and FecGI and Non-Genetic Factors that Affect the Prolificacy of Colombian Creole Sheep. *Indian Journal of Science and Technology*, 11, 17.
- Piper, L. R., & Bindon, B. M. (1983). The Booroola Merino and the performance of medium non-Peppin crosses at Armidale. *Wool Technology and Sheep Breeding*, 31(1).
- Polley, S., De, S., Brahma, B., Mukherjee, A., Vinesh, P. V., Batabyal, S., ... & Goswami, S. L. (2010). Polymorphism of *BMPR1B*, *BMP15* and *GDF9* fecundity genes in prolific Garole sheep. *Tropical animal health and production*, 42(5), 985-993.
- Rattray, P. V., Garrett, W. N., Hinman, N., & East, N. E. (1974). Effects of level of nutrition, pregnancy and age on the composition of the wool-free ingesta-free body and carcass of sheep. *Journal of Animal Science*, 39(4), 687-693.
- Reed, G. H., Kent, J. O., & Wittwer, C. T. (2007). High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics.
- Reina, R., Mora, M. I., Glaria, I., García, I., Solano, C., Lujan, L., ... & Mamoun, R. Z. (2006). Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus research*, 121(2), 189-198.
- Rodríguez, A. W. H., & Medinilla, F. D. M. T. (2014). Estudio Genético Poblacional de Frecuencias Alélicas para 15 marcadores STR presentes en la Población del Estado de Zacatecas Aplicado a la Práctica Forense. *Archivos de medicina*, 10(1), 1.
- Rodríguez, R. O. L., Heredia, A. M., Quintal, F. J., & Velazquez, M. A. (1998). Productivity of Pelibuey and Blackbelly ewes mated at yearly and 8-monthly intervals over six years. *Small ruminant research: the journal of the International Goat Association*.
- Rodríguez, S., Gaunt, T. R., & Day, I. N. (2009). Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *American journal of epidemiology*, 169(4), 505-514.
- Roh, J. S., Bondestam, J., Mazerbourg, S., Kaivo-Oja, N., Groome, N., Ritvos, O., & Hsueh, A. J. (2003). Growth differentiation factor-9 stimulates inhibin production and activates Smad2 in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 144(1), 172-178.

- Roy, J., Polley, S., De, S., Mukherjee, A., Batabyal, S., Pan, S., ... & Goswami, S. L. (2011). Polymorphism of fecundity genes (FecB, FecX, and FecG) in the Indian Bonpala sheep. *Animal biotechnology*, 22(3), 151-162.
- Sakaridis, I., Ganopoulos, I., Argiriou, A., & Tsaftaris, A. (2013). A fast and accurate method for controlling the correct labeling of products containing buffalo meat using High Resolution Melting (HRM) analysis. *Meat science*, 94(1), 84-88.
- Sañudo, C., Nute, G. R., Campo, M. M., Maria, G., Baker, A., Sierra, I., ... & Wood, J. D. (1998). Assessment of commercial lamb meat quality by British and Spanish taste panels. *Meat Science*, 48(1-2), 91-100.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *Nature protocols*, 3(6), 1101.
- Segura, J., Sarmiento, L. & Rojas, O. (1996). Productivity of Pelibuey and Blackbelly ewes in Mexico under extensive management. *Small Rum. Res.* 21:57
- Shokrollahi, B., & Morammazi, S. (2018). Polymorphism of GDF 9 and BMPR 1B genes and their association with litter size in Markhoz goats. *Reproduction in domestic animals*, 53(4), 971-978.
- Sierra, I. (1976^a). Mejora de la prolificidad en la especie ovina. I Reunión Cient. Soc. Esp. Ovinotec. Valladolid. Ponencia: 9-28
- Sierra, I. S. I. D. R. O. (1978). Mejora de la prolificidad en la especie ovina (*Ovis Aries*) mediante cruzamiento. Resultados reproductivos de las hembras Romanov x Rasa Aragonesa. *Archivos de Zootecnia*, 105, 61-71.
- Silva, B. D. M., Castro, E. A., Souza, C. J. H., Paiva, S. R., Sartori, R., Franco, M. M., ... & Melo, E. D. O. (2011). A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (*GDF9*) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. *Animal genetics*, 42(1), 89-92.
- Su, Y. Q., Wu, X., O'Brien, M. J., Pendola, F. L., Denegre, J. N., Matzuk, M. M., & Eppig, J. J. (2004). Synergistic roles of *BMP15* and *GDF9* in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop. *Developmental biology*, 276(1), 64-73.
- Talebi, R., Ahmadi, A., Afraz, F., Sarry, J., Woloszyn, F., & Fabre, S. (2018). Detection of single nucleotide polymorphisms at major prolificacy genes in the Mehraban sheep and association with litter size. *Annals of Animal Science*, 18(3), 685-698.
- Tang, J., Hu, W., Chen, S., Di, R., Liu, Q., Wang, X., ... & Chen, W. (2019). The genetic mechanism of high prolificacy in small tail Han sheep by comparative proteomics of ovaries in the follicular and luteal stages. *Journal of proteomics*, 103394.
- Tang, J., Hu, W., Di, R., Liu, Q., Wang, X., Zhang, X., ... & Chu, M. (2018). Expression Analysis of the Prolific Candidate Genes, *BMPR1B*, *BMP15*, and *GDF9* in Small Tail Han Ewes with Three Fecundity (FecB Gene) Genotypes. *Animals*, 8(10), 166.
- Turner, H. N. (1966). Selection for increased reproduction rate. *Wool Technol. Shepp. Breed.* 13:69-79
- Turner, H. N. (1996). Measurement as an aid to selection in breeding sheep for wool production. In *Anim. Breed. Abstracts* (Vol. 24, No. 2, pp. 87-110).
- Turner, H. N., Hayman, R. H., Triffitt, L. K., & Prunster, R. W. (1962). Response to selection for multiple births in the Australian Merino: a progress report. *Animal Science*, 4(1), 165-176.

- Vacca, G. M., Dhaouadi, A., Rekik, M., Carcangiu, V., Pazzola, M., & Dettori, M. L. (2010). Prolificacy genotypes at *BMPR 1B*, *BMP15* and *GDF9* genes in North African sheep breeds. *Small Ruminant Research*, 88(1), 67-71.
- Vitt, U. A., Mazerbourg, S., Klein, C., & Hsueh, A. J. (2002). Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. *Biology of reproduction*, 67(2), 473-480.
- Wang, W., La, Y., Zhou, X., Zhang, X., Li, F., & Liu, B. (2018). The genetic polymorphisms of TGF β superfamily genes are associated with litter size in a Chinese indigenous sheep breed (Hu sheep). *Animal reproduction science*, 189, 19-29.
- Wang, W., Liu, S., Li, F., Pan, X., Li, C., Zhang, X., ... & Li, T. (2015). Polymorphisms of the Ovine *BMPR-IB*, *BMP-15* and *FSHR* and Their Associations with Litter Size in Two Chinese Indigenous Sheep Breeds. *International journal of molecular sciences*, 16(5), 11385-11397.
- Wang, X., Yang, Q., Wang, K., Yan, H., Pan, C., Chen, H., ... & Lan, X. (2019). Two strongly linked single nucleotide polymorphisms (Q320P and V397I) in *GDF9* gene are associated with litter size in cashmere goats. *Theriogenology*, 125, 115-121.
- Wang, X., Yang, Q., Wang, K., Yan, H., Pan, C., Chen, H., ... & Lan, X. (2019). Two strongly linked single nucleotide polymorphisms (Q320P and V397I) in *GDF9* gene are associated with litter size in cashmere goats. *Theriogenology*, 125, 115-121.
- Wilhelm, J., & Pingoud, A. (2003). Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem*, 4(11), 1120-1128.
- Wilson, T., Wu, X. Y., Juengel, J. L., Ross, I. K., Lumsden, J. M., Lord, E. A., ... & McNatty, K. P. (2001). Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 64(4), 1225-1235.
- Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F. J., Elvin, J. A., Carino, C., & Celeste, A. J. (2001). Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular Endocrinology*, 15(6), 854-866.
- Zervas, G., & Tsiplakou, E. (2011). The effect of feeding systems on the characteristics of products from small ruminants. *Small Ruminant Research*, 101(1-3), 140-149.
- Zhang, Z., Liu, Q., Di, R., Hu, W., Wang, X., He, X., ... & Chu, M. (2019). Single nucleotide polymorphisms in *BMP2* and *BMP7* and the association with litter size in Small Tail Han sheep. *Animal reproduction science*, 204, 183-192.
- Zi, Z., Chapnick, D. A., & Liu, X. (2012). Dynamics of TGF- β /Smad signaling. *FEBS letters*, 586(14), 1921-1928.

ANEXO A. SECUENCIA DEL GEN *GDF9* (AF078545.2)

> [AF078545.2] *Ovis aries* growth differentiation factor-9 gene

GGATCCCCCTCAGTCTTCTCCTCGGTTCCCGGCTTTCGTCGGAGCCTCAGGAAGCGGCCGAAATCGGACGGACTAAGAGTAGAAGAGCGAG
GGGCTGTCAACCTCCAGAGCTGCCCTAGGGTCGGGTGCTCTGGCGCGGTGAAAGGGTCTTTGAGGCCCGCGCTGGCAGTCAACCGGA
GATTTTGTACTGTATGTCAGTAAGCTGGAACCGGAATCGGCTATGGTCAGGCCCTCAGCGACCGCAAGACCCGAATCAGGGACACGGA
TCTGAGACTTCTCTGTGCGGCCACCGGATTAGAACTCCACTGGCAGGGTGTAGACTTTCCCAAGAGATAATAAAAAATGTTCCATTTAGCC
ACAAGAGTCTTAGTAATAGTACAGCAAGTGTAGCAGCTGTTAGTGATTGTAGGAGGGAAGAGGCAACCTCCGTCGCAGCCGGCTTC
TCCCTCACAGAGTCTGCCTGGGCGCAATGTGCATGTTGCCACTGTTCACTGCCAGGAGGAGGCAAGCGTTCGGTGTGAGGCAT
TCCATTTTCGAAAGTGTCTTCTTAAAGTACTGCTGTCTGTACAGCTGACTGACTTTTCCACTGTATGCAACGTGTCTGTAAATG
TTTTTTTCATGGAATTGCTGGCCATGTGTAATCTAGGACTAAGTTTTCATTCAGCAGTTGGGTGTGTTTTATAACCCCTCCTGGCAGAT
CCGAGCCAGGAGGCTTGGCAGACAATGAACTTAAAATTTACCAGTATACCTCGGTTTTATCAGCCTGGGTACTGCACAGACTGGTCTG
TATCAGGTAAGTATATTAGCTCTTCTTAGTGTACCATGTCATTTATCTGAAACATAATCTTTAACCTGATCTTCCAGAGGCA
AGAACATAAATACTTATACAGGTAAGAACAAAAATACCTAGCAAAATCTCCACCATTGAGTGATTAATAAAAAAGCAACCTTTCAATTT
ATTTCTAGTACCTGAAAACGCTTTAAACCTTCAATTAAGTATGCATAGATGAATGAGCAGACCCAAATAAAGGCACCAAGGTATTA
TACTTTAAAGTGAAGTCAAGTAAATGTGATGTCTCTCTTTTAAAGCATATTGCAGTATTCCAAGTACATATCTTAAAGGCTGCGAG
AACTAGGCAAAAATAGCAGTTCTCTGCTCTGGAATCTCAATTCAGTATGAAATTTCTCACCCTCCAAATCAACATGACGTAAATA
ATATTCTAAGCACCTGGAAGTGGGAGAAGTGGTACAGATCCAGGGAGAAGAGTAAACCAATACCATAAGTTGCATACAAACAGATCTGG
GTATCATCATGAATCATTAGCTTTCCCATGCCTTCGAAGTTTCAGCAAGCATCTAGGGAACATTTTAAAAATCCTAATCTCTCTCAG
AAATCGGCCGCTTTTTTTTTTAAAGTCACTCCTGTAGCCTTTCAGTACATAGCTAGTCCATTAAGTTAAGAGATTTTAAATAAATGC
CAGGGAAGGAAAAGCAAACTATATGGCAAGTAAATCTGAATCTAATAGGACAACTGAATGAATAGGTTGTTGTCAGCTGATAAA
AATTATCCACAGTAAGCATCTTAAGTCTGATTACAAGATTGAACCTAGCCACCCACACCTAAAGTTTATTTAAGAGACCAACCG
AGGCTCTTCTGTTTTTAGGAAGAAGACTGGTATGGGAAATGTGTTCTTGTCAATCTTCCAAGCCATGGCGCTTCCCAACAAATTC
M A L P N K F
TTCCTTTGGTTTTGCTGCTTTGCTGGCTCTGTTTTCTTATTAGCCTTGATTCTCTGCTTCTAGGGGAGAAGCTCAGATTGTAGTAGG
F L W F C C F A W L C F P I S L D S L P S R G E A Q I V A R
ACTGCGTTGGAATCTGAGGCTGAGACTTGGTCTTGTGAAACATTTAGTGGGAGACACAGACCTGGTCTCTTTCCCTCTCTTAGAG
T A L E S E A E T W S L L N H L G G R H R P G L L S P L L E
GTTCTGTATGATGGGCACGGGAACCCCGAGGCTGCAGCCAGATGACAGAGCTTTGCGCTACATGAAGAGGCTCTATAAGGCATACGCT
V L Y D G H G E P P R L Q P D D R A L R Y M K R L Y K A Y A
ACCAAGGAGGGACCCCTAAATCCAACAGACGCCACCTCTACAACACTGTTCCGGCTCTCACCCCTGTGCTCAGCACAAGCAGGCTCCT
T K E E G T P K S N R R H L Y N T V R L F T P C A Q H K Q A P
GGGACCTGGCGCAGGTGTGAGGAGCAGATTGGTTAATGGGTGGAGGGAAGAAGAAGACCTTTTTGCATTTCAAGTACATAAAGGAG
D L A A
TTGGCCCTGCTCCTGACTTGCATTTTACTTTGTCATGGTACTCAATATCCAACAAACCTGGTCTTGTACTTACTTACTGTTTTATTCCT
AATGGCCTCATGGGTTGATGTAGGCTAAATCTCTTGTAGAGAGATTTAATGGCCTTAAACCTGGGAAGAGTGCTGCTGGAGGTTAGC
ATCTTGTCCAGGGTCACAAAATCAAGACTGTAAAAAAGGATTTTGTACTTCTGTCATATTCTTTCTAGTCTACCAATGTTGGCCTGGA
CATGAACCTACAGTACCTTCTCAGCTGTTAGTGTGCTTTAGTAAACAGGATGTTTTCCACGTTTGTGCTTCTGTGAGAGGAAAAC
TGAAGTCTCTATGTGGAACAGTATACCCCTACAAGGCAATGTGTTAATCAACAATCTTGTGTGTGAGAGAGATGGGAGCAGTGCT
ATTTAAAAAAGAAAAAAGTATATTCATTAGCTCGTACTTACAGAAAACCTTCTAACCCAGCAGGTCATTTGTGGCTATCTTAAAC
CCTTTCTCCTTCTGAGCTCTGTTTTGTTACAGTGCCTTTAGAGCTTCCATTTGTTGTGCTCAGTCTCAAGTGTCCAAATTAACCTTAGAG
AAGTACTTTTTCTTATTGATTTGCGGTAAGAAGTAAATGTTTTCTTAAACAGCCTGGCAAGTGTCTTTTGATAGTTTTCTCTTA
AAGACTTTCCAAGAGAAAAAATACTGCTTTCTTTTACTTCTCTTTGTTGTCAGCAACTTAATAAGATTTCAAACTTCAAAATATA
TGATTCCTCTTTAATTTCCCAACAAAGCTATTTCTGAATTTCTGGTATCCAGCAGTAAAGTGTGGGACTTAGATGTGGTACAGATAAC
TTGCTTTTTCTTTATAACCCCTATCCACCCCTGACGTTTAAAGGCTTGAGAATGTGGGGAGAAAGGGACAGAAGCACATCTGAGGTACT
GATTCCTTGATTTGACTTCTGTTACATATGGCATTACTGTTGATTGTTTTTCTTCTCAGGAACCTTTCCATCAGTGGATCTGCTGTT
G T F P S V D L L F
AACCTGGATCGTGTACTGTTGTGGAACATTTATTCAAGTCACTTGTGTATACTTTCAACAACTCCATTTCTTTCCCTTTCCTGTT
N L D R V T V V E H L F K S V L L Y T F N S I S F P F P V
AAATGTATATGCAACCTGGTGATAAAGAGCCAGAGTTTCTAGCAAGACTCTCCCTAGAGCTCCATACTCATTTACCTATAACTCACAG
K C I C N L V I K E P E F S S K T L P R A P Y S F T Y N S Q
TTTGAATTTAGAAAGAAATACAAATGGATGGAGATTGATGTGACGGCTCTTTGAGCCTCTGGTGGCTCCCAAGAGGAATATTCAC
F E F R K K Y K W M E I D V T A P L E P L V A S H K R N I H
ATGTCGTAAATTTTACATGTGCGGAAGACCAGCTGCAGCATCTTACGCGGGGACAGCCTGTTAACATGACTCTTCTCGTAGCGCC
M S V N F T C A E D Q L Q H P S A R D S L F N M T L L V A P
TCACTGCTTTTGTATCTGAACGACACAAGTGTCTCAGGCTTTTACAGGTGGCATTCCCTCCACCTAAAAGGAGCCTTCACAGGGTCTCT
S L L L Y L N D T S A Q A F H R W H S L H P K R K P S Q G P
GACCAGAAGAGAGGCTATCTGCTACCCCTGGGAGAGAAGTGTGAGGGTGAAGATCGTCCGTCACCCAGAGACCAGGAGT
D Q K R R G L S A Y P V G E E A A E G V R S S R H R D Q E S
GCCAGCTCTGAATTTGAAGAGCCTCTGGTTCAGCTTCACTGAGTGAATACTTCAACAGTTTCTTTTCCCAAGATGAATGT
A S S E L K K P L V F A S V N L S E Y F K Q F L F P Q N E C
GAGTCCATGACTTTAGACTTAGCTTTAGTCACTGAAAGTGGGCAACTGGATTGTGGCCCCACACAATAACACCCCTCGATACTGTAAA
E L H D F R L S F S Q L K W D N W I V A P H K Y N P R Y C K
GGGACTGTCCCAGGCGCTGGACATCGGTATGGCTTCCGGTTCACACCATGGTGCAGAACATCATCCATGAGAAATCTGACTCA
G D C P R A V G H R Y G S P V H T M V Q N I I H E K L D S S
GTGCCAAGACCATCTGTACCTGCCAAGTATAGCCCTTTGAGTGTGTTGGCCATCGAGCCTGATGGCTCAATCGCTTATAAAGAAAT

V P R P S C V P A K Y S P L S V L A I E P D G S I A Y K E Y
 GAAGATATGATAGCCACTAAGTGTACCTGTCGTTAACAGACTCCTGTCAAGTAAAACCATGAGTGTCCCTGGCCAGTGTAAATGCCGCGCC
 E D M I A T K C T C R *
 CCTGTCATGTCCTTTGGGAGGAAGTTTCATGTGTCAAATCTCTGACTGTACGACACTGTGTGTGTGTAAAGGAGGAGCCTGTATAGATTA
 GCATATTTCTGTGGCATCTATCAATGTAAGGGATAACAGCTGCCTTCCATGGCCAAATGTTTAAATGAAATGATTTCTTTTGGAGAAC
 TTTGAATTTTTTCCCAAGTGATTCTTTTTTCTTTTGTAGGAGTCTTCTTTTGTATGTAAGAAAATTTAAAACTTAATTAGCATAAAT
 CTTGAGTGAAGTGCAGTCTAGACAATTCAGAGTGTATAGTCTTATTTAATGGAGGAATAAATTCCTGTGAGTGGCATAAATTTCTG
 TGTGCGGTTTTAATTGAAGATTTGCTTTTAAATGGTTATTTGAGAGGGAGAGGAAGTGTCTAAAAGCTAGTCTTTACTCAATTTACTA
 TCCCTTTTTCAGAGTTAGAGAGACTAACTCTCTACCTAAATTAGACTAGAGAGTATACAATATATTGGGCTTCCCTGGTGGCTCAGTGGT
 AAAGAATCTGCCTGCCAATGCAGTAGATGTAGGTTCAACCACTGGAGAAGGAGATGGCAACCCATCTAGTGTCTTACCTGGCAAACCCC
 ACGCACCGAGAAAACCTGGCAGGCTGTATAGTCCATGGGGTCACAAAAGAGTCAGGCACGACTTAGCAACTAAACAACATACACTATAAC
 CCATTTCTGTTGTTAGTGATTGGTACTAATCTGCACCTTAGATGGCTTTATTTAAAGGAAACAGCCTTGCAAATTTTCCCAAGAAAT
 TGCAGATTTAAGATTTTTTAAAAACACGTTTTATCCTTTGTATATTTAAACTCTGAACCTTTGGAAGGCGGTCAAGAAGCGTTTTTGT
 TTTTTTTTTTCTTTGGTTTTGCTGCTTTCCCTCAGCTCCCATCACTCCACCCTGCAGGTTTTTTCCAGGTGAATTTAGCACTGTTAGC
 ACTAAACTAAGCTGACAGTCACTAGGTTATATTACAGAGCAGGCTTGTGGATATGAGGGCTTTTATGTGGGTTTTTCTAGTAAATCTAC
 CTTGAGGAAGACCTGGAGATGGGAGTTTCAAGGCTGAGCAGTGATTTCTGTTTTCAGAGTTTATAAAACCCTCATCTACAAATCAAAGTA
 CCTCCAAGATGCAAGTAAATGATCTTTGCTTGGTGCCTAGTGTCTAAGAAAGTCAGTGGGATTTTGATAGAGATTGTGTTGAATCTGTA
 GATTAGTTTGGGGTGTATTGCCATCTTAAACATCAAGACTTCCAATCCATGGGTGTGGTGGATCC

>>>>Codones

>>>>inicio y termino de intron

>>>>Mutaciones que no causan esterilidad

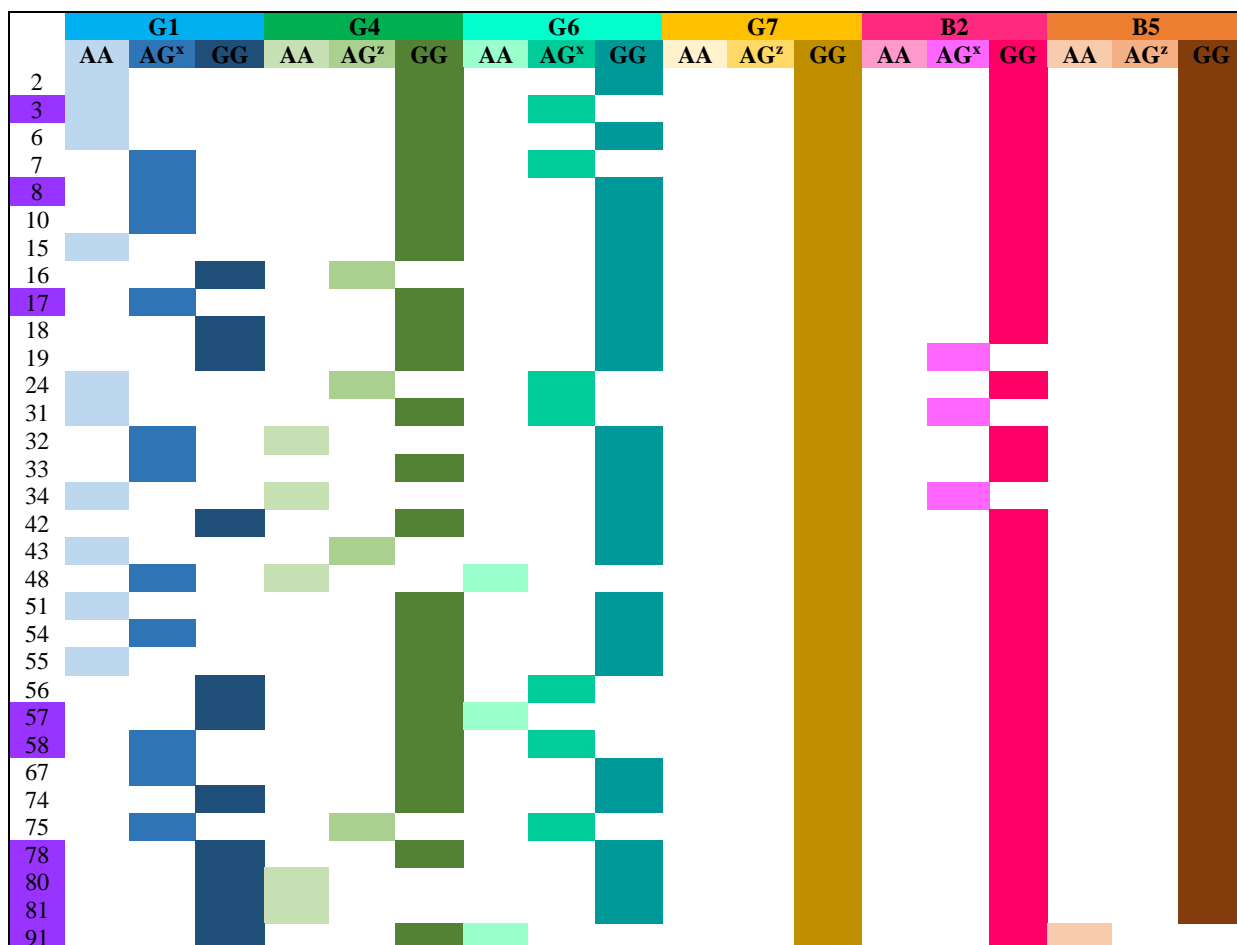
>>>>Mutación que causa esterilidad

>>>>Sitio de escisión de la proteasa Furina

ANEXO B. SECUENCIA DEL GEN *BMP15* (AH009593.2)

>|AH009593.2| *Ovis aries* chromosome X growth differentiation factor 9B

```
CTGCTGTTTCTGTTTGTGGATGCAAAGAGGACAATTTAGAAGACCTCTTTTTGGTTCCAGGAGATCCTACCAGAGGAAGAAACATAGGAC
CTGCCTGCCAGCCTTTCATTTTTCTTGCCTATCCTTTGTGGTAGTGGAGCCTGGATGCTGTACCCATGTAAAAGGAAAGTTAAAG
CGTTATCCTTTGGGCTTTTATCAGAACATGTTGCTGAACACCAAGCTTTTCAAGATGGTCTCTGAGCATCCTTAGAATCCTTCTTTGG
M V L L S I L R I L L W
GGACTGGTGCTTTTTATGGAAACATAGGGTCCAATGACACAGGTAGGGCAGCCCTCTATTGCCACCTGCCTGAGGCCCTACCTTGCCC
G L V L F M E H R V Q M T Q V G Q P S I A H L P E A P T L P
CTGATTCAGGAGCTGCTAGAAGAGCCCTGGCAAGCAGCAGAGGAAGCCGGGCTTAGGGCATCCCTTACGGTATATGCTGGAGCTG
L I Q E L L E E A P G K Q Q R K P R V L G H P L R Y M L E L
TACCAGCGTTTCAGCTGACGCAAGTGGACACCCTAGGAAAACCGCACCATTGGGGCCACCATGGTGAGGCTGGTGAGGCCCTGGCTAGT
Y Q R S A D A S G H P R E N R T I G A T M V R L V R P L A S
GTAGCAAGGCCTCTCAGAGGTGAGTTATCATACATATATGTTTCTGGTGGGAGGGGGGAGAAAATGGGGAAGAAAAGTGTAGAAAAAAGT
V A R P L R Q
GGATCTGTTCAGTTTTCTGTTCAGGCTTACATATTGCCTACAGGTAGGTGGTTTTCAAAGATGGCACCCCTGGGAGAACCTGGCTCCAAT
TTGCTTCCCTTTAGGGCTCCAATTTAAGAACAGATTGCCTTGGGGCTCCCTGAGGACTTCTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
GTTTTTCTCCGTCTAGGGGATGAGTGTCTAAAAATGAGCCACAATTTGTCTCTTAAGGAAAAAGACTTGGACTCAAATCTTTATTC
TAACAAACACTGGCTTGTGTCTCTGGCATAGCTTCTGTAGCTTCAGTTTTCTCGTCTGCAAAATGGGAATAGCAACTATCTCATAA
GGCTATTGTGGATTCAAGAGCAAATGCATGTAAAGCATCTAATACATTATATAAGTGCCTAATAGATCGCTATTATGATCTTAAATTCAT
CTCAAGGCTGCTTGTCTGTTGACTGAGCAGGCTGTGTAGAGAGACTAAGGCTAGGATATAAGAAGCTAACGCTTTGCTCTTGTTCCTCT
CTTACTAATGACAGGCTCTGGCACATACAGACCTGGACTTTCCTCTGAGACCAAACCGGGTAGCATACCAACTAGTCAGAGCCACTGTG
S S W H I Q T L D F P L R P N R V A Y Q L V R A T V
GTTTACCGCCATCAGCTTACCTAACTCATTCCACCTCTCCTGCCATGTGGAGCCCTGGGTCCAGAAAAGCCCAACCAATCACTTTCCCT
V Y R H Q L H L T H S H L S C H V E P W V Q K S P T N H F P
TCTTCAGGAAGAGGCTCCTCAAAGCCTTCCCTGTTGCCAAAACCTGGACAGAGATGGATATCATGGAACATGTTGGGCAAAGCTCTGG
S S G R G S S K P S L L P K T W T E M D I M E H V G Q K L W
AATCACAAGGGGCGCAGGGTTCACGACTCCGCTTCGTGTGTGACGAGCAAGAGGTAGTGAGGTTCTTGAGTCTGGTGGCATGGCACT
N H K G R R V L R L R F V C Q Q P R G S E V L E F W W H G T
TCATCATTGGACTGTCTCTTGTACTGTATTTCAATGACACTAGAGTGTTCAGAAAGACCAAACTCTCCCTAAAGGCCTGAAAGAG
S S L D T V F L L L Y F N D T Q S V Q K T K P L P K G L K E
TTTACAGAAAAGACCCTTCTCTCTCTGAGGAGGGCTCGTCAAGCAGGCAGTATTGCATCGGAAGTTCTTGCCCTCCAGGGAGCAT
F T E K D P S L L L R R A R Q A G S I A S E V P G P S R E H
GATGGGCCTGAAAGTAAACAGTGTCCCTCCACCCCTTTTCAAGTCAGCTTCCAGCAGCTGGGCTGGGATCACTGGATCATTGCTCCCAT
D G P E S N Q C S L H P F V S F Q Q L G W D H W I I A P H
CTCTATAACCCCAACTACTGTAAAGGGAGTATGCTCTCGGGTACTACACTATGGTCTCAATTCTCCAATCATGCCATCATCCAGAACCTT
L Y T P N Y K G V C P R V L H Y G L N S P N H A I I Q N L
GTCAGTGAGCTGGTGGATCAGAAATGCCCTCAGCCTTCTGTGTCCTTATAAGTATGTTCCATTAGCATCCTTCTGATTGAGGCAAAT
V S E L V D Q N V P Q P S C V P Y K Y V P I S I L L I E A N
GGGAGTATCTGTACAAGGAGTATGAGGGTATGATTGCCAGTCTGCACATGCAGGTGACGGCAAAGGTGCA
G S I L Y K E Y E G M I A Q S C T C R *
```



ANEXO C. SNP'S DEL GEN *GDF9* Y *BMP15* EN LA POBLACIÓN OVINA

Figura 20. Combinaciones alélicas de los individuos analizados en la raza Pellibuey.

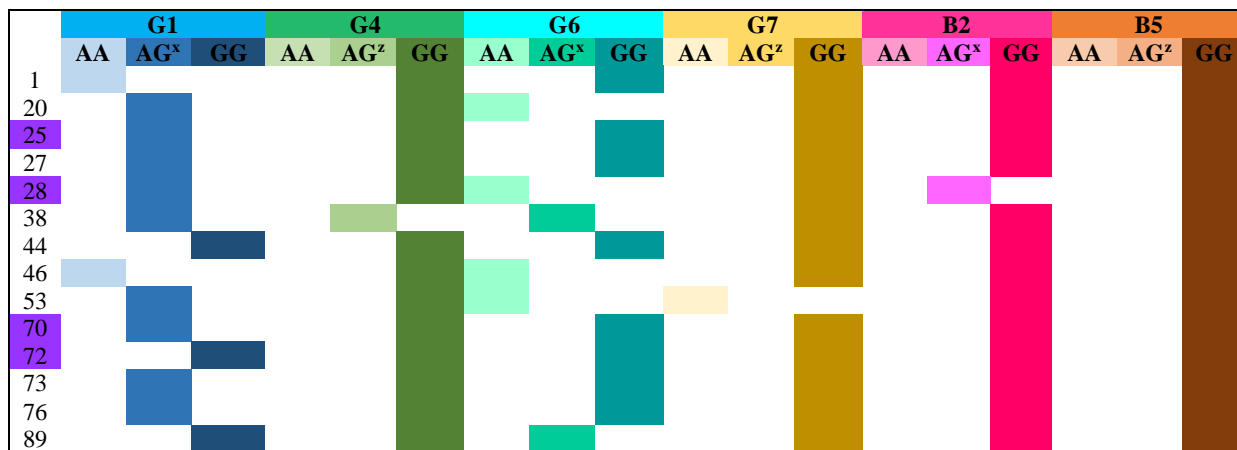


Figura 21. Combinaciones alélicas de los individuos analizados en la raza Black Belly.

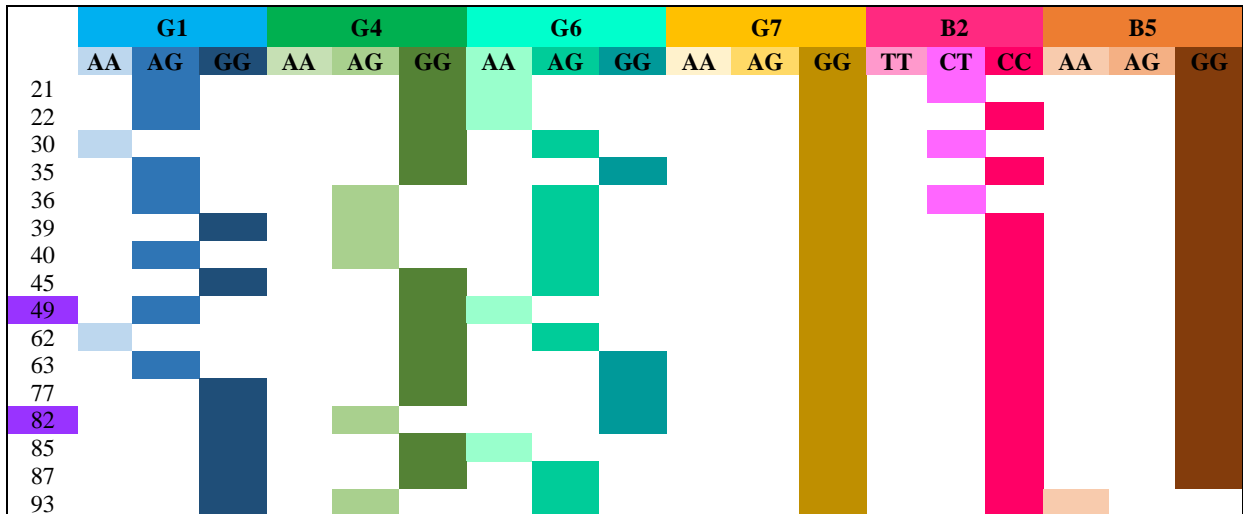


Figura 22. Combinaciones alélicas de los individuos analizados en la raza Katahdin.

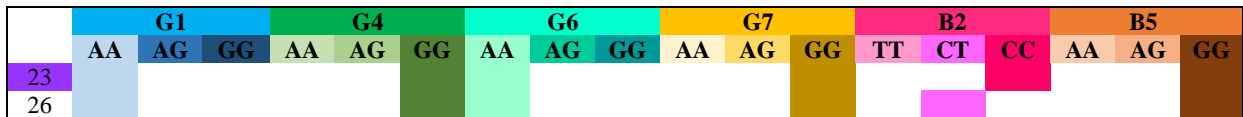


Figura 23. Combinaciones alélicas de los individuos analizados en la raza Dorper.

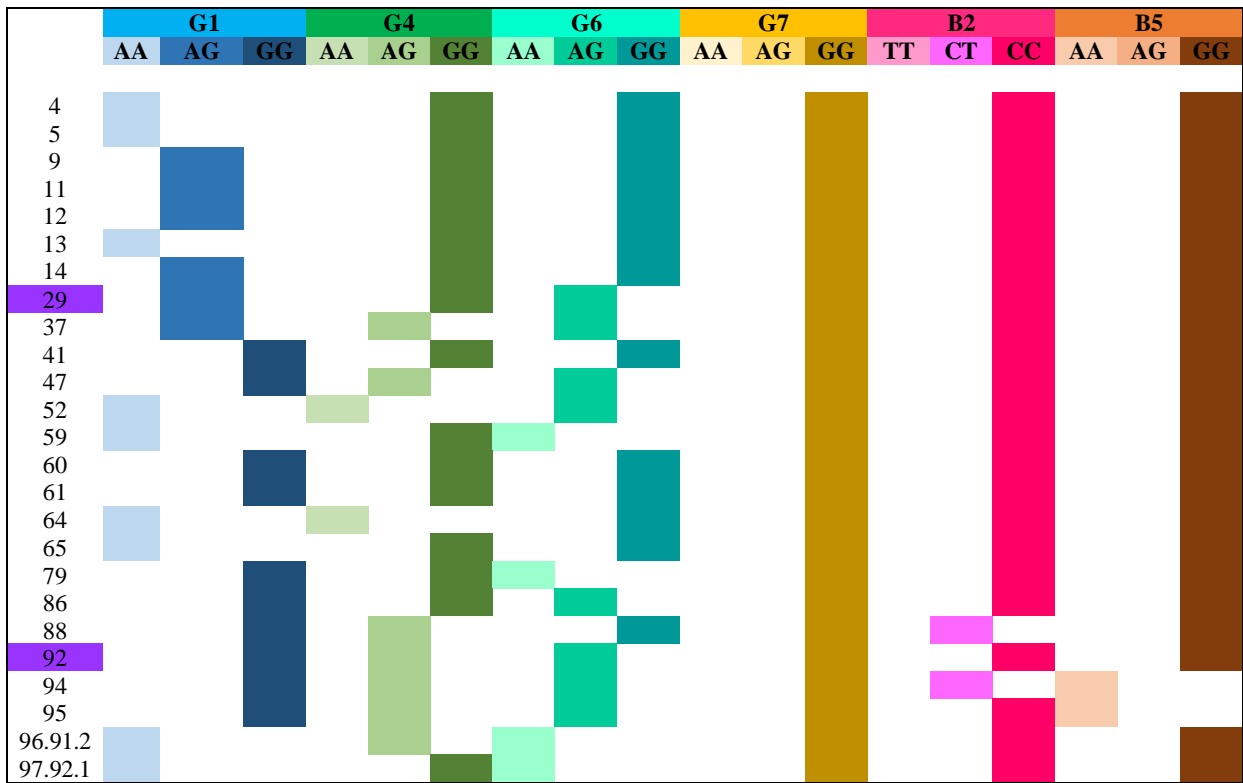


Figura 24. Combinaciones alélicas de los individuos analizados en cruza de ovino.

ANEXO D.

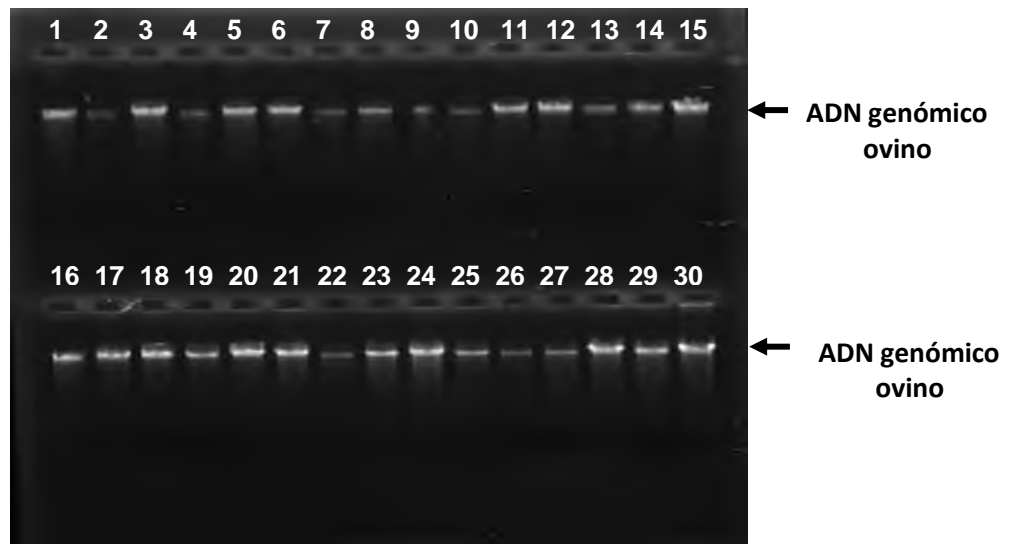


Figura 25. Gel de agarosa al 2 % (TAE IX). Verificación de ADN. Carril 1-30: ADN genómico de sangre de ovino.