



**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC**

T E S I S

**IDENTIFICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN
GDF9 RELACIONADOS CON LA PROLIFICIDAD DE LOS
OVINOS (*Ovis aries*) MEDIANTE EL ANÁLISIS HRM.**

Presenta:

RAQUEL ANAHI ESCOBAR CHAPARRO

Para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Asesor de tesis:

DR. JOSÉ ABAD ZAVALA

Co-asesor de tesis:

DR. GABRIEL GUILLEN SOLÍS

ABRIL DEL 2016

DEDICATORIAS

A mis padres, **Yolanda Chaparro Olarra y Benito Escobar Cortés** sabiendo que no hay forma de agradecer toda una vida llena de sacrificios y esfuerzos para brindarme la mejor herencia de todas, les dedico este trabajo por darme la oportunidad de superarme y que este objetivo logrado también es de ustedes, porque la fuerza que me ayudó a conseguirlo fue su apoyo.

A mis hermanos **Xóchilt Beatriz Escobar Chaparro y Rigoberto Escobar Chaparro** porque me enseñaron que siempre debo esforzarme para cumplir mis objetivos y llegar al éxito.

A toda **mi familia** para demostrarles que si se quiere se puede, que vale la pena luchar para superarse, porque el futuro depende de ello.

A todos mis **amigos y compañeros** por formar parte de esta trayectoria.

A mis **profesores y asesores** por el apoyo y el tiempo que dedicaron en mi aprendizaje.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente por el apoyo brindado de mi familia, mis amigos y compañeros que me guiaron en este largo camino.

A mi madre **Yolanda Chaparro Olarra**, por ser mi ejemplo de vida, por siempre darme consejos y motivarme para ser mejor cada día, de nunca rendirme y siempre mirar hacia adelante, gracias a ella por ser mi todo. Por ella y para ella.

A mi padre **Benito Escobar Cortés**, por confiar en mi capacidad y entusiasmo de salir adelante, por ser un gran apoyo en toda la carrera.

A mis hermanos **Xóchilt Beatriz Escobar Chaparro** y **Rigoberto Escobar Chaparro** por escucharme y alentarme en los momentos difíciles de frustración, por aconsejarme ante distintas situaciones, y por siempre demostrarme cuánto me quieren y se preocupan por mí.

A mi mejor amiga **Angélica Rosado Ferrer** por estar al pendiente de mí y siempre decirme que sí se podía, por compartir alegrías, tristezas y decepciones.

A mi novio **Armando Noriega Feria**, por ser mi motivación y estar presente en este arduo y largo camino, por apoyarme, aconsejarme y escucharme en todo momento.

A mi asesor de tesis **Dr. José Abad Zavaleta**, por su disponibilidad de tiempo para aclarar mis dudas, por guiarme, asesorarme y por brindarme su amistad, así como también a todo el equipo de trabajo del Biotecnología Animal que compartieron su conocimiento para concluir este proyecto: Dr. Víctor Meza Villalvazo, Antonio, Luis, Keyla, Erick y Javier.

A mi Co-asesor de tesis **Dr. Gabriel Guillen Solís y Grupo Quae** por su amistad, comprensión, apoyo y por darme la oportunidad de aprender más a detalle de la biología molecular.

A mis amigos que formaron parte de esta generación de biotecnología: **Laura Isabel Méndez Sánchez, Laura del Carmen Vázquez Alcántara, Sarahí del C. Hernández Heredia, Alyn Flores Herrerías, Rebeca Ramos Gonzales, Javier Santamaría Alcántara, Juan Alberto Francisco Rodríguez, Juan Ramón Gonzales Vergara, Yamil Oswaldo Cruz Uriarte, Claudio Ángel Zepeda del Valle**, gracias por ser los mejores compañeros-amigos y compartir momentos de alegría, estrés, pereza, ansiedad, enojos, desveladas.

A mis profesores: la **Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa** y el **Dr. Julián Mario Peña Castro** por su valioso tiempo dedicado a la solución de mis dudas, por el conocimiento compartido en clases, por sus bonitas explicaciones que me adentraron al mundo de la biología molecular.

INDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	6
INDICE DE FIGURAS	7
1. RESUMEN	10
2. INTRODUCCIÓN	11
3. ANTECEDENTES	14
3.1 Generalidades de los ovinos.....	14
3.2 Ovinocultura en México.....	14
3.3 Producción y consumo de ovino en México.....	14
3.4 Importancia del mejoramiento genético en el ganado ovino.	16
3.5 Genes importantes en la tasa de ovulación ovina	18
3.6 Gen Boorola: Mutación FecB.....	21
3.7 Gen Inverdale: Mutación FecX.....	21
3.8 Gen de alta fertilidad GDF9: FecGH	22
3.9 Efectos de las mutaciones en genes mayores sobre la foliculogénesis y la tasa de ovulación.	24
3.10 Métodos moleculares para el diagnóstico de genes relacionados con la prolificidad.....	25
3.10.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	26
3.10.2 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	27
4. JUSTIFICACIÓN	31
6. OBJETIVOS.....	32
7. METODOLOGÍA	33
7.1 Búsqueda de animales potenciales.....	33
7.2 Identificación de los animales	33
7.3 Toma de muestras sanguíneas.....	33

7.4 Extracción de ADN.....	33
7.5 Diseño de secuencias sintéticas.	34
7.6 Diseño de oligonucleótidos	35
7.7 Amplificación de las secuencias control	36
7.8 Amplificación de las muestras de ADN de ovino	37
7.9 Análisis HRM (High ResolutionMelt Analysis).....	39
7.10 Ensayo RFLP (Restricción FragmentLengthPolymorphism)	39
7.11 Secuenciación	39
7.12 Análisis estadístico.....	40
8. RESULTADOS.....	41
8.1 Verificación de ADN de las muestras de ovinos.	41
8.2 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	41
8.3 Análisis HRM (High-Resolution Melt Analysis)	43
8.3.1 Mutación G1 (R87H) en el gen GDF9	44
8.3.2 MutaciónG4 (E241K) en el gen GDF9	45
8.3.3 MutaciónG6 (V332I)en el gen GDF9	46
8.3.4 Mutación G7(V371M) en el gen GDF9	47
8.4 Ensayo RFLP (Restricción FragmentLengthPolymorphism)	48
8.5 Secuenciación	48
8.6 Análisis estadístico.....	54
9. DISCUSIÓN	66
10. CONCLUSIONES	71
11. PERSPECTIVAS.....	71
12. REFERENCIAS.....	73
13. ANEXOS	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes mayores que afectan la tasa de ovulación y prolificidad en ganado ovino (Davis, 2005).	20
Tabla 2. Polimorfismos del gen GDF9 que afectan la fecundidad en ganado ovino (Hanrahan <i>et al.</i> , 2004).	24
Tabla 3. Secuencias control utilizadas para el análisis HRM.	35
Tabla 4. Secuencia de oligos utilizados en la amplificación del gen GDF9.	36
Tabla 5. Protocolo de la mezcla de reacción Luminaris Color HRM Master Mix y Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 2X.....	38
Tabla 6. Protocolo del termociclador Pikoreal96.....	38
Tabla 7. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para la mutación G4 del gen GDF9.	56
Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para la mutación G6 del gen GDF9.	57
Tabla 9. Frecuencias genotípicas y alélicas de muestras de ovino para la mutación G4 del gen GDF9 de acuerdo a su raza.....	59
Tabla 10. Frecuencias genotípicas y alélicas de muestras de ovino para la mutación G6 del gen GDF9 de acuerdo a su raza.....	59
Tabla 11. Frecuencias genotípicas y alélicas de muestras de ovino para la mutación G4 del gen GDF9 de acuerdo a su sexo.	60
Tabla 12. Frecuencias genotípicas y alélicas de muestras de ovino para la mutación G6 del gen GDF9 de acuerdo a su sexo.	61
Tabla 13. Combinaciones de los alelos AA, AG y GG de los polimorfismos G2 y G4 del gen GDF9 a nivel Población.	65
Tabla 14. Polimorfismos existentes en el gen GDF9 en ovinos de pelo: Kathadin ...	85
Tabla 16. Polimorfismos existentes en el gen GDF9 en ovinos de pelo: Dorper	90
Tabla 17. Polimorfismos exitentes en el gen GDF9 en ovinos de pelo: Black Belly..	91
Tabla 18. Polimorfismos exitentes en el gen GDF9 en ovinos de pelo: Cruzas.....	91

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de carne en canal de ganado ovino por entidad federativa, 2014 (INEGI, 2014).	15
Figura 2. Total nacional de producción y precio medio de carne en canal de ganado ovino, 2009-2014 (INEGI, 2014).....	16
Figura 3. Factores de crecimiento que intervienen en la etapa primaria (Oocito) de la foliculogénesis (Matzuk <i>et al.</i> 2000).	19
Figura 4. Polimorfismos del gen GDF9 ubicado en el cromosoma 5.....	23
Figura 5. Representación esquemática de los efectos de una mutación en un gen de fecundidad (Fec) sobre la y tasa de ovulación en ovinos (Fabre, 2006).	25
Figura 6. Gráfica de curvas de disociación normalizadas de fragmentos de organismos para la diferenciación de genotipos	29
Figura 7. Análisis HRM. Diferencia de fluorescencia de fragmentos de interés respecto a una secuencia de referencia para la diferenciación de genotipos	29
Figura 8. Saturación de fluoróforos sobre la doble cadena de ADN. A) SYBR Green B). Eva Green (Bio-Rad).	30
Figura 9. Diagrama de amplificación de las regiones de interés del gen GDF9	37
Figura 10. Verificación de ADN. Carril 1-30: ADN genómico de sangre de ovino. ...	41
Figura 11. Amplificación de los controles y muestras del gen GDF9 mediante qPCR. A. Controles GDF9PSG1, GDF9NSS1 y muestras.	42
Figura 12. Análisis HRM con diferentes fluoróforos. Eva Green.....	43
Figura 13. Análisis HRM para la mutación G1:.....	44
Figura14. Análisis HRM para la mutación G4:.....	45
Figura 15. Análisis HRM para la mutación G6:.....	46
Figura 16. Análisis HRM para la mutación G7.....	47
Figura 17. Ensayo RFLP para la mutación G1	48
Figura 18. Secuenciación de un fragmento de 708pb en el exón 1 del gen GDF9 en muestra de ovino con genotipo GG.....	49
Figura 19. Multialineamiento del exón 1 del gen GDF9 (AF078545.2) comparadas con productos de PCR secuenciados del gen GDF9.	49

Figura 20. Secuenciación de un fragmento de 799pb en el exón 2 del gen GDF9 en muestras de ovino. A. Genotipo AG. B. Genotipo GG.....	50
Figura 21. Multialineamiento del exón 2 del gen GDF9 (AF078545.2) comparadas con productos de PCR secuenciados del gen GDF9.	51
Figura 22. Secuenciación de un fragmento de 799pb en el exón 2 del gen GDF9 en muestras de ovino. A. Genotipo AA. B. Genotipo AG. C. Genotipo GG.....	51
Figura 23. Multialineamiento del exón 2 del gen GDF9 (AF078545.2) comparadas con productos de PCR secuenciados del gen GDF9.	52
Figura 24. Secuenciación de un fragmento de 799pb en el exón 2 del gen GDF9 en muestras de ovino con genotipo GG.....	52
Figura 25. Multialineamiento del exón 2 del gen GDF9 (AF078545.2) comparadas con productos de PCR secuenciados del gen GDF9.	53
Figura 26. Descripción de las secuencias homologas al producto secuenciado de la región del gen GDF9.....	53
Figura 27. Blast _n del fragmento de ADN secuenciado del gen GDF9 de muestras de ovino.....	54
Figura 28. Porcentaje de genotipos en regiones del gen GDF9.....	55
.....	56
Figura 29. Frecuencia genotípica para la mutación G4 en el gen GDF9.....	56
.....	58
Figura 30. Frecuencia genotípica para la mutación G6 en el gen GDF9.....	58
Figura 31. Verificación de los productos de qPCR en gel de agarosa al 3% para la mutación G1 (R87H) con un tamaño de 94bp.....	83
Figura 32. Verificación de los productos de qPCR en gel de agarosa al 3% para la mutación G4 (E241K) con un tamaño de 97bp.Carril 1: Marcador de peso. Carril 2-4: Controles sintéticos. Carril 5-7: Muestras de ovino. Carril 8: Control Negativo.	83
Figura 33. Verificación de los productos de qPCR en gel de agarosa al 3% para la mutación G6 (V332I) con un tamaño de 96bp.Carril 1: Marcador de peso. Carril 2-4: Controles sintéticos. Carril 5: Control Negativo. Carril 6-8: Muestras de ovino.	84

Figura 34. Verificación de los productos de qPCR en gel de agarosa al 3% para la mutación G7 (V371M) con un tamaño de 99bp. Carril 1: Marcador de peso. Carril 2-4: Controles sintéticos. Carril 5: Control Negativo. Carril 6-8: Muestras de ovino. 84

Tabla 15. Polimorfismos G1, G2, 64 Y G6 existentes en el gen GDF9 en ovinos de pelo: Pellibuey 89

Tabla 16. Polimorfismos G1, G2, 64 Y G6 existentes en el gen GDF9 en ovinos de pelo: Dorper..... 90

Tabla 17. Polimorfismos G1, G2, 64 Y G6 existentes en el gen GDF9 en ovinos de pelo: Black Belly 91

Tabla 18. Polimorfismos G1, G2, 64 Y G6 existentes en el gen GDF9 en ovinos de pelo: Cruzas 91

1. RESUMEN

En México existe escasez de carne de ovino por la baja producción que se debe al bajo uso de tecnologías adoptadas por los ovinocultores, aproximadamente un 30 % son importaciones, tal hecho impacta sobre la economía por el aumento en los precios. Aproximadamente el 35 % de los ovinocultores hacen uso de técnicas reproductivas que permiten aumentar la producción. Una alternativa que promete una mayor producción anual de animales es el aumento de los partos múltiples que depende del índice de herencia.

En este estudio se reporta la identificación de las mutaciones G1, G4, G6 y G7 presentes en el gen GDF9 en ovinos de pelo: Kathadin, Pellibuey, Black Belly, Dorpe y Cruzas mediante el análisis HRM, siendo este un método que no ha sido utilizado para la localización de estos genes, que resulto eficaz para la diferenciación de genotipos. Mediante la técnica de qPCR se realizó la amplificación de regiones específicas que presentan mutaciones ligadas a éste carácter, se analizaron las diferencias alélicas mediante HRM (High Resolution Melt Analysis) utilizando como agente intercalante; SYBR Green, con un incremento de temperatura de 0.04°C dentro de un rango de 65°C a 95°C. Las mutaciones G1 y G7 no se encontraron localizadas en la población de la región del Papaloapan. Únicamente se hallaron las mutaciones G4 y G7 presentes en el exón dos del gen GDF9 en los ovinos de pelo; Kathadin, Pellibuey, Black Belly, Dorpe y Cruzas, donde el genotipo GG fue el más predominante. Estos resultados muestran que los ovinos de pelo en la región del Papaloapan podrían ser un importante aporte como antecedente para posteriores estudios de las mutaciones del gen GDF9, los cuales ya han sido reportados como responsables de la prolificidad en ovinos.

2. INTRODUCCIÓN

La prolificidad (P) es un factor importante en la producción del ganado *Ovis aries* (Bradford, 1985) y tiene fuerte impacto sobre la economía. En el año 2011, la producción total de carne en México fue de 56, 546 toneladas, contemplando ranchos y rastros, con un precio estimado de 212.5 millones de dólares. Esta producción sólo cubrió el 70 % del consumo nacional aparente, estimado 80, 780 toneladas de carne. El 30 % restante fue importado, principalmente de Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos, lo que ocasionó un aumento en los precios. De acuerdo a esto, la producción de ovinos no logra satisfacer la creciente demanda de consumo nacional (SAGARPA, 2011).

De acuerdo a lo reportado por la Unión Nacional de Ovinocultores (UNO), en México se explotan ocho razas en forma muy intensa (Rambouillet, Suffolk, Hampshire, Dorset, Pelibuey, Black Belly, Katahdin y Dorper) que componen el total del inventario ovino mexicano (Arteaga, 2012). En el año 2011, SAGARPA registro que en México existen aproximadamente 8, 219, 386 cabezas ovinas, de las cuales el 70.9 % se localiza en diez estados de la república, ubicando a Oaxaca con un 7 % y el 29.1 % restante es representado por el resto de las entidades federativas.

Las principales causas de una baja producción de carne ovina se deben generalmente a las condiciones de pastoreo tradicionales que se establecen, con escaso uso de tecnología. La manera 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).

La práctica de cruzamientos terminales con sementales de razas lanadas con una aptitud cárnica marcada y cualidades maternas lácteas o prolificidad, son una de las opciones para mejorar la producción de ovinos. No obstante, la aplicación de técnicas reproductivas 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, por ejemplo la inseminación artificial y la transferencia de embriones (De La Cruz, 2010).

A partir de la inseminación artificial en ovinos (IAO) se obtiene un alto valor genético de razas puras, sin embargo el costo y venta limita a muchos ovinocultores. Las posibilidades de empleo de la IAO se clasifican de acuerdo a ciertas variables como; el sistema de conservación del semen (fresco, refrigerado o congelado), la vía de aplicación de la dosis (exocervical, intrauterina y transcervical), el tipo del celo y ovulación (natural o por el uso de tratamiento hormonales) (Carbajo *et al.*, 1995).

La multiovulación y la transferencia de embriones (TE) es la inducción de una respuesta de ovulación múltiple mediante tratamientos hormonales y, la posterior fecundación de los ovocitos (monta natural o de manera *in vitro*). Después de los estados del desarrollo y de control de vialidad, los ovocitos se almacenan para la implantación posterior a hembras (López *et al.*, 1991).

Así, la cantidad producida de carne de ovino, no satisface la demanda a nivel nacional (INEGI, 2012), situación que hasta ahora no es alarmante, pero si

realizamos un cálculo en diez años, obtendremos que la tasa de crecimiento poblacional irá en aumento, por ello, se propone estudiar los genes que intervienen en la prolificidad del ganado ovino, de tal manera que se mejore la reproducción animal con el fin de obtener camadas más grandes de las normales. 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.

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades de los ovinos.

Los ovinos son mamíferos ungulados con extremidades revestidas en pezuñas, dotados con un par de dedos. Su nombre científico es *Ovis aries* o también conocidos como borregos u ovinos. Los machos son conocidos como carneros mientras que las hembras son ovejas. Las ovejas pueden tener una cría por parto sin embargo a veces se presentan ocasiones en donde se tienen tres crías por parto, esto de acuerdo a sus características génicas. Su periodo de gestación oscila entre los 145-150 días. La carne de ovino es una fuente rica en proteínas y grasas, y contiene los aminoácidos esenciales (INEGI, 2007).

3.2 Ovinocultura en México

Actualmente el ganado ovino es una fuente prometedora en el sector ganadero respecto a su finalidad de explotación; sea producción de carne, lana, leche o doble propósito. Entre las características que se destacan para ser explotados se encuentran: la fertilidad (capacidad y facilidad del animal para tener crías), la prolificidad (capacidad de un animal en tener más crías por parto), la habilidad materna (capacidad de una hembra para destetar más crías vivas) y la rusticidad (habilidad que tiene un animal para adaptarse al medio ambiente); (INEGI, 2007). Estos indicadores son aspectos para calcular la eficiencia reproductiva, que pueden ser afectados también por factores como la alimentación (Buratovich, 2010).

3.3 Producción y consumo de ovino en México

En el año 2014, se reportó que la producción de carne registrada, obtenida de sacrificios de ganado en rastros municipales por entidad federativa fue de 2, 661

toneladas, principalmente por la producción en canal obtenida en Aguascalientes (22 % del total), Estado de México (15.4 %), Jalisco (12.8 %), Querétaro (11 %), Guanajuato (8.2 %), Sinaloa (6.2 %), Michoacán (5.37 %), Puebla (5.1 %), Oaxaca (3 %) y Zacatecas 2.7 %, presentando una disminución de producción en comparación con lo registrado en el año 2011-13 (INEGI 2014).



Figura 1. Producción de carne en canal de ganado ovino por entidad federativa, 2014 (INEGI, 2014).

El precio medio de la carne en canal del ganado ovino creció 11 % en el 2014, al situarse en 43 mil 334 pesos por tonelada, registrándose los mayores aumentos en Nayarit (16.6 %), Yucatán (16 %), Durango (13.5 %), Morelos (12.1 %), Oaxaca (11.7

%), Chihuahua (11.6 %), Estado de México (11.2 %), Tlaxcala (11.1 %) y en Aguascalientes y San Luis Potosí (11 % en lo individual).

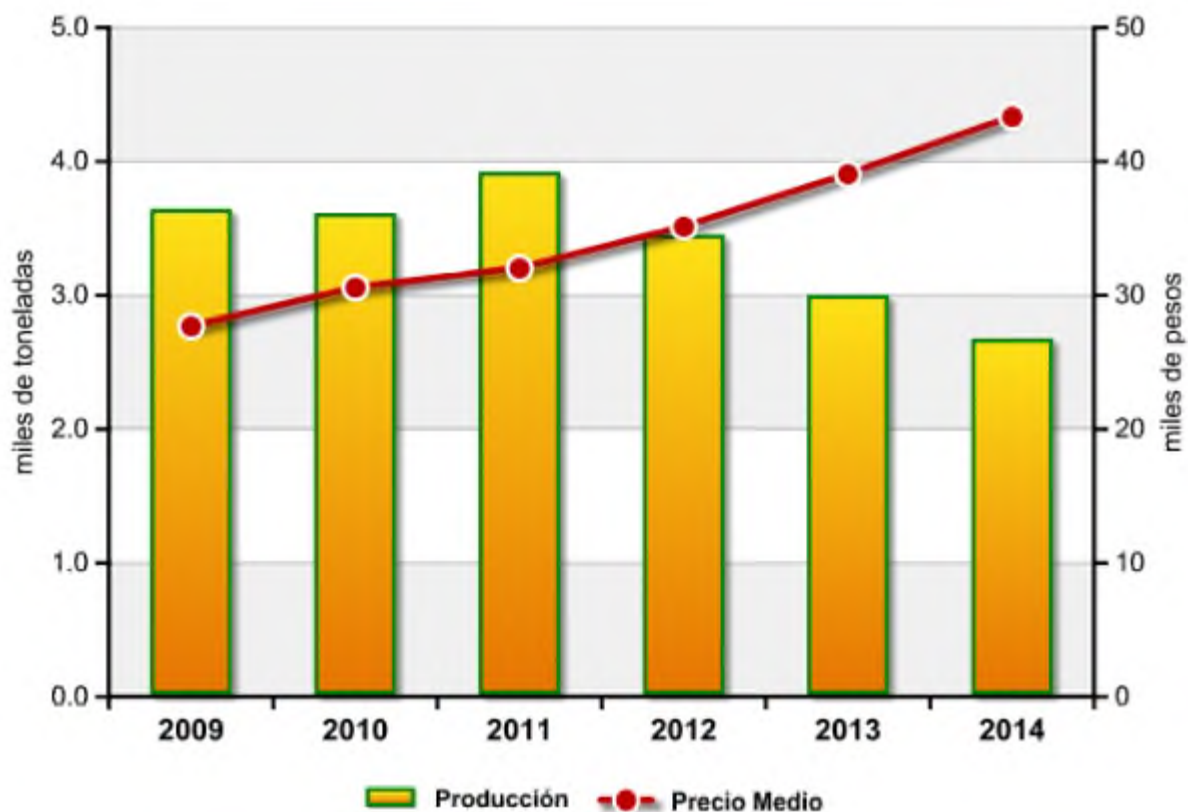


Figura 2. Total nacional de producción y precio medio de carne en canal de ganado ovino, 2009-2014 (INEGI, 2014).

3.4 Importancia del mejoramiento genético en el ganado ovino.

El ganado ovino ha sido estudiado ampliamente debido a su gran potencial genético respecto al aumento en la tasa de ovulación (TO), es por ello que es una de las fuentes más prometedoras en el sector ganadero para mejorar en la competitividad de la producción animal (Bodin, 2006). Las ovejas tienen ciclos estrales múltiples, pero esta fertilidad varía de acuerdo al ambiente climático en el que se encuentre así como de la alimentación (Alba, 1964). Una alimentación de calidad, tanto en su

contenido de energía como de proteína, influirá notablemente aumentando el número de óvulos liberados en el momento del celo y, por ende, el porcentaje de crías por parto (Buratovich, 2010). 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). Por ello, los genes mayores 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.

En el año 2006 se reportó la patente CN1274842C de un método para la predicción del número de crías por parto de ovejas y su aplicación (Chu *et al.*, 2006), teniendo como propósito incrementar el uso de ovejas para la cría de animales, utilizando el análisis del polimorfismo del gen GDF9 en 4 razas ovinas donde se detectaron genotipos AA y AB sólo en ovejas Han, Hu y Dorset, mientras que el alelo BB se encontró sólo en las ovejas Suffolk. Otra invención fue presentada en el año 2014 (WO2014018404A1), un método para el cultivo *in vitro* de folículos ováricos en la fecundación *in vitro* de ovocitos y su maduración en un medio de cultivo químicamente definido que comprende heterodímeros BMP15/GDF9, siendo útiles en cualquier reproducción de contexto, incluyendo una clínica para la reproducción asistida y veterinaria o clínica agrícola (Matsuk *et al.*, 2012).

Los principales genes relacionados con la prolificidad, tomando en cuenta la tasa de ovulación y tamaño de la 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.*, 2004).

3.5 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 (tabla 1). La fertilidad en las hembras se ve afectada por estos genes que influyen en gran medida a 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, asociadas a señales paracrinas y autocrinas, así como a factores de señalización en las células foliculares (McNatty *et al.*, 2005). En ovinos con alta TO se han identificado 14 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 (Sosa *et al.*, 2004). 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), la sustancia inhibidora Muleriana (MIS) y los factores neurotróficos derivados de la glía (GDNFs) (Matzuk *et al.* 1996).

En los oocitos (células que se transforman a ovocitos) de mamíferos se producen al menos cinco factores de crecimiento durante la foliculogénesis, el factor GDF9

(Growth differentiation factor-9) que actúa en el crecimiento folicular, así como también BMP15 (Bone morphogenetic protein 15), BMP6 (Bone morphogenetic protein 6), FGF8 (fibroblast growth factor 8) y TGF- β 2 (transforming growth factor β 2), no obstante aún falta mucho por conocer sobre los genes que actúan en la foliculogénesis (Erickson *et al.*, 2000). Sin embargo, GDF9 controla las funciones fisiológicas en las células de la granulosa, teca y oocitos (figura 3), provocando cambios en la expresión génica para el adecuado proceso de formación de folículos (Matzuk *et al.* 2000).

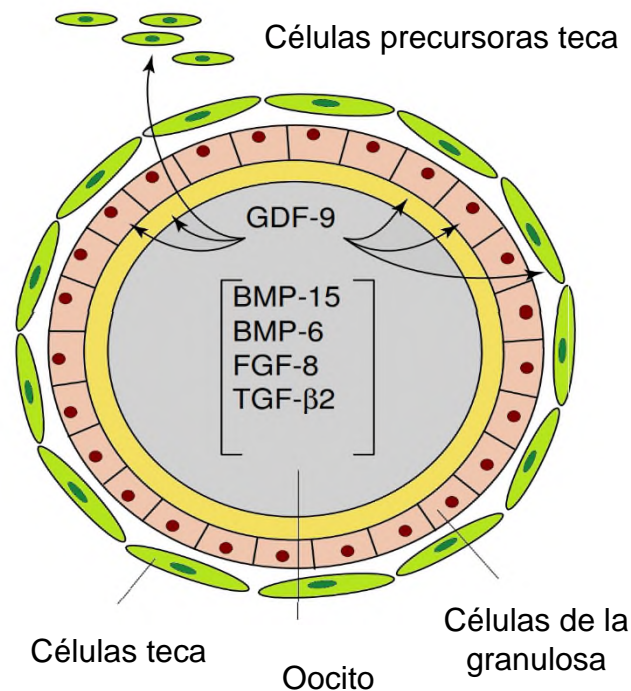


Figura 3. Factores de crecimiento que intervienen en la etapa primaria (Oocito) de la foliculogénesis (Matzuk *et al.* 2000).

Las principales mutaciones que incrementan la tasa de ovulación y afectan en la fecundidad de las ovejas se encuentran en el gen BMP15, BMPR-1B (Bone morphogenetic protein receptor type-1B) y GDF9.

Tabla 1. Genes mayores que afectan la tasa de ovulación y prolificidad en ganado ovino (Davis, 2005).

Gen	Nombre del Fenotipo	Alelo	Cr	Efecto sobre la tasa de ovulación (TO) y prolificidad (P)	Raza
BMPR-1B	Boorola	FecB ^B	6	(Hetero) B+: TO+1,5; P+1,0 (Homo) BB: TO+3,0; P+1,5	MerinoGarole, Duolang, Chinese
BMP15	Inverdale	FecX ^I	X	(Hetero) I+: TO+1,0; P+0,6 (Homo) II: Estéril (Ovarios hipoplásicos)	Romney
BMP15	Hanna	FecX ^H	X	(Hetero) H+: TO+1,0; P+0,6 (Homo) HH: Estéril (Ovarios hipoplásicos)	Romney
BMP15	Belclare	FecX ^B	X	(Hetero) B+: TO+1,0 (Homo) BB: Estéril (Ovarios hipoplásicos)	Belclare
BMP15	Galway	FecX ^G	X	(Hetero) G+: TO+0,7 (Homo) GG: Estéril (Ovarios hipoplásicos)	Belclare, Cambridge
BMP15	Lacaune	FecX ^L	X	(Hetero) L+: TO+1,5 (Homo) LL: Estéril (Ovarios hipoplásicos)	Lacaune
BMP15	ROA	FecX ^R	X	(Hetero) R+: TO+0,63; P+0,32 (Homo) RR: Estéril (Ovarios hipoplásicos)	Aragonesa
GDF9	High Fertility	FecG ^H	5	(Hetero) H+: TO+1,4 (Homo) HH: Estéril (Ovarios hipoplásicos)	Belclare y Cambridge

Cr: Cromosoma **Homo:** Homocigoto **Hetero:** Heterocigoto

3.6 Gen Boorola: Mutación FecB

El fenotipo Boorola fue el primer alelo FecB o también llamado gen Boorola, detectado en el ganado ovino de raza Merino Australiano, localizado en el cromosoma 6, que proporciona un aumento en el tamaño de la camada, debido al número de ovulaciones por ciclo estral. Este efecto es por una mutación en el receptor de la proteína morfogenética ósea (BMPR-1B) (Piper *et al.*, 1983). La existencia del gen de prolificidad en ovinos tienen 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 normal de 1 ovocito (Montgomery *et al.*, 1994). Las Ovejas Boorola en Nueva Zelanda que portan el gen Boorola tienen una mutación en el receptor BMPR-1B expresado en el ovario (Agresearch, 2001), provocando una sustitución del aminoácido glutamina por arginina (Mulsant *et al.*, 2001).

3.7 Gen Inverdale: Mutación FecX

El alelo FecX, localizado en el cromosoma X, fue observado en un rebaño de machos de la raza Romney con un patrón de herencia que transmitían el gen únicamente a sus hijas, expresándose en el ovario (Davis *et al.*, 1991), con una mutación de inactivación en la proteína morfogenética ósea 15 (BMP15); con un papel importante en la fertilidad de los mamíferos (Galloway *et al.*, 1999). La secuencia de codificación de longitud completa del gen BMP15 es de 1179 pb (pares de bases), está contenida en dos exones, separados por un intrón de alrededor de

5.4 kb, y codifica un pre péptido de 393 residuos de a.a (aminoácidos). El péptido maduro activo es de 125 a.a. de longitud (Galloway *et al.*, 2002).

Más tarde se encontraron variantes del gen BMP15 en la raza Romney, entre ellos, el alelo Inverdale (FecX^I), que consiste en una sustitución de un único nucleótido en una secuencia codificante madura, una transversión de una timina (T) por adenina (A), en la posición 92 , y el alelo Hanna (FecX^H), correspondiente a la sustitución de un nucleótido, un 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 en el tamaño de camada 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).

3.8 Gen de alta fertilidad GDF9: FecGH

Otras de las mutaciones que afectan la tasa de ovulaciones es el gen GDF9 (FecG^H) situado en el cromosoma 5 (figura 3), con una ubicación citogenética igual a 5q31.1 y con una ubicación molecular en el cromosoma desde el par de base 132, 861, 180 hasta el par de base 132, 866.883. El alelo FecG^H, aumenta 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). El gen GDF9 se localiza en los ovocitos, 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). El gen GDF9 tiene aproximadamente 2.5 kb

(kilobases) y contiene 2 exones separados por 1126pb que codifican un intrón y prepropéptido de 453 a.a., siendo el péptido maduro activo 135 a.a. (Bodensteiner *et al.*, 1999).

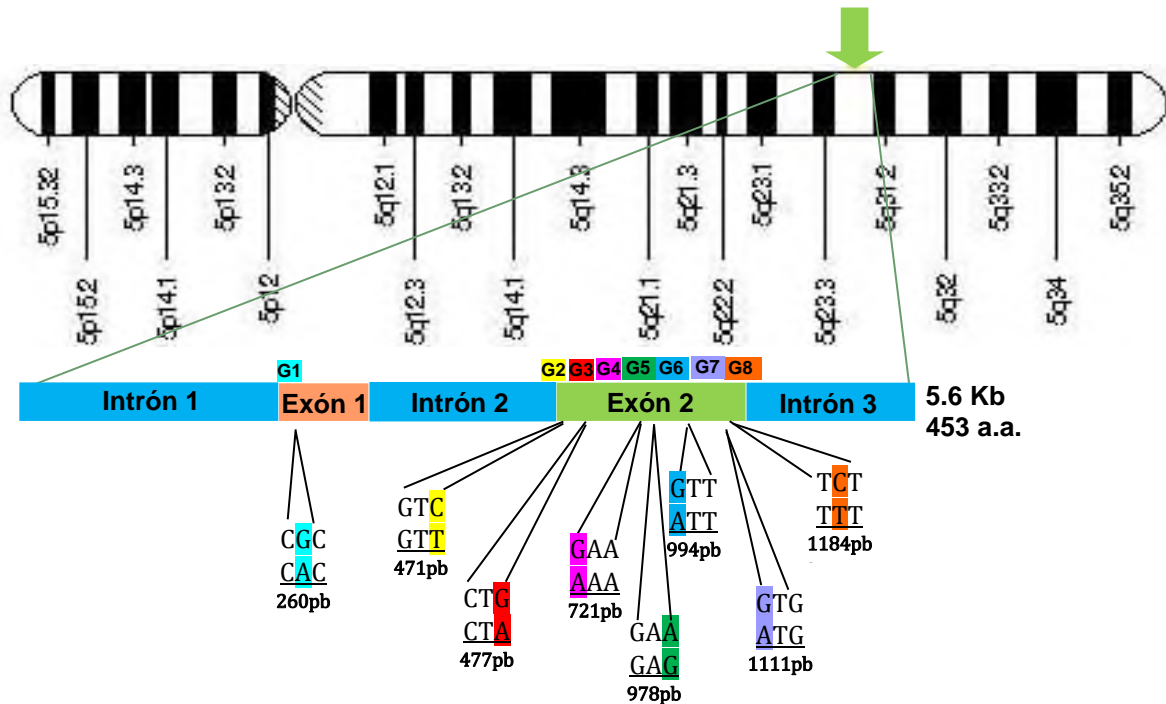


Figura 4. Polimorfismos del gen GDF9 ubicado en el cromosoma 5.

Se conocen mutaciones relacionadas con la prolificidad en el gen GDF9 reportadas en ovejas de razas Rommey, Cambridge, Belclare y Aragonesa (Bodin, 2006). Un estudio identificó 8 mutaciones nombradas G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7 y G8, presentes en el gen GDF9 (tabla 2). 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. En la figura 3 se observa la ubicación de las mutaciones mencionadas anteriormente (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	
GDF9	G1	G-A	260	Arg (R)-His (H)	R87H
	G2	C-T	471	Sin cambio Val (V)	V157V
	G3	G-A	477	Sin cambio Leu (L)	L159L
	G4	G-A	721	Glu (E)-Lys (K)	E241K
	G5	A-G	978	Sin cambioGlu (E)	E326E
	G6	G-A	994	Val (V)-Ile (I)	V332I
	G7	G-A	1111	Val (V)-Met (M)	V371M
	G8	C-T	1184	Ser (S)-Phe (F)	S395F

3.9 Efectos de las mutaciones en 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 sigue investigando, así como nuevas alteraciones en el gen GDF9 y su relación con lo descrito anteriormente.

Las mutaciones presentes en el gen GDF9 y BMP15, así como también una disminución en el sistema BMP, se asocia a un aumento en la tasa de ovulación (figura 4). 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 (Follicle stimulating

hormone) dependientes, como activina/inhibina y receptores de LH (Luteinizing hormone) en las células de la granulosa de folículos antrales (Montgomery *et al.*, 1992).

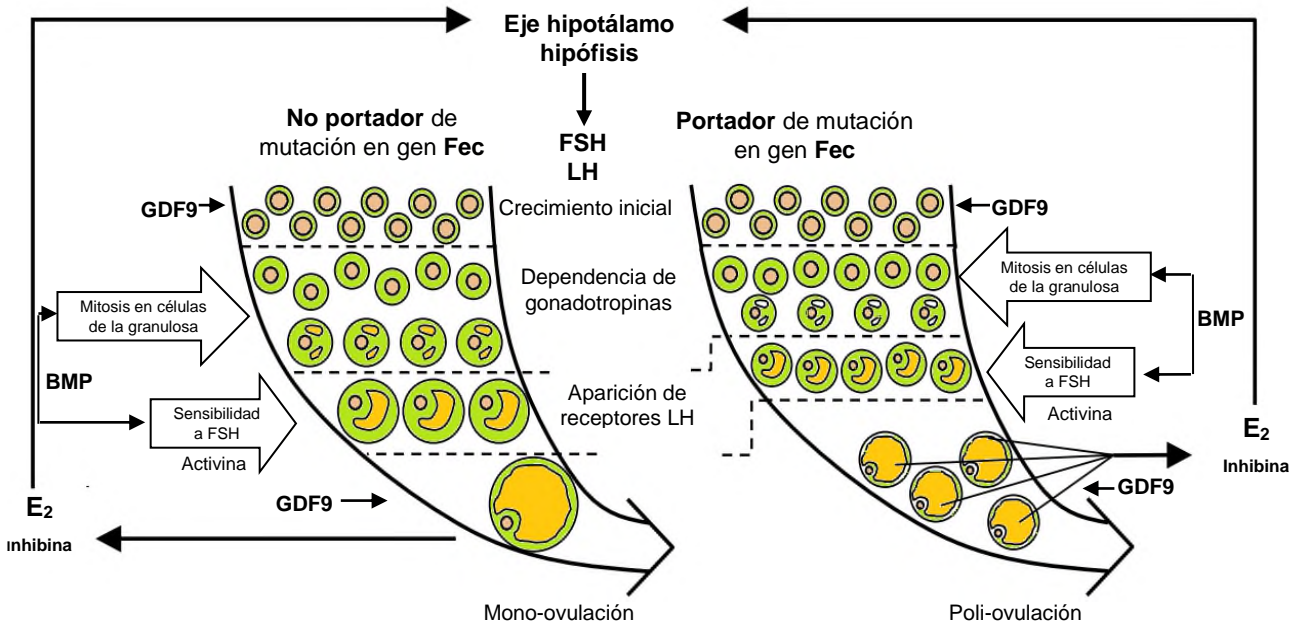


Figura 5. Representación esquemática de los efectos de una mutación en un gen de fecundidad (Fec) sobre la y tasa de ovulación en ovinos (Fabre, 2006).

3.10 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), frecuentemente seguida por secuenciación del ADN para identificar directamente la secuencia de ADN de una muestra que está involucrada con algún carácter específico (Lloyd *et al.*, 1986).

3.10.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Esta técnica molecular permite el análisis del ADN, consiste en la amplificación de fragmentos de ADN flanqueado por dos oligonucleótidos que hibridan a la doble cadena de ADN reconocimiento el sitio de unión específico (Persing *et al.*, 1993). Este procedimiento se lleva a cabo en tres etapas a temperaturas diferentes con una repetición de 25-40 veces (ciclos). La primera es la desnaturalización del ADN a una temperatura de 95-98°C logrando así la separación de las hebras. La segunda etapa consiste en el alineamiento de los oligonucleótidos que hibridan una región específica a una temperatura de 58-60 °C y en la última etapa (elongación) interviene la DNA polimerasa que se encarga de sintetizar la nueva cadena de ADN a una temperatura aproximada de 70-72 °C, generando millones de copias, debido a que cada ciclo duplica la cantidad de ADN sintetizado lo que da como resultado una amplificación exponencial (2^n , donde n es el número de ciclos) (Timothy *et al.*, 1998). La PCR ha sido útil para la detección de ocho nuevos polimorfismos conformacionales de cadena sencilla en el gen GDF9 en ovinos. La PCR y el análisis

electroforético, en conjunto con la secuenciación y el uso de enzimas de restricción, permitieron la detección de las mutaciones en el gen por cambios de base. De estas mutaciones, una de ellas produce un cambio no conservativo y se asocia con la esterilidad cuando se expresa el alelo homocigoto y con el aumento de la tasa de ovulación cuando se presenta heterocigosidad (Hanrahan *et al.*, 2003).

3.10.2 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

La PCR en tiempo real es 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).

Existen métodos específicos y no específicos para monitorear los productos amplificados. Dentro de los específicos, el más usado es 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. Los métodos específicos siguen el principio conocido como; transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) para generar la señal, tal como; las pruebas por hibridación con Sondas Taqman que consisten en transferir energía desde un donador o reportero fluorescente a un aceptor o quencher. (Livak *et al.*, 1995).

La discriminación alélica es un ensayo basado en qPCR que permite detectar polimorfismos de nucleótidos simple. Normalmente es un ensayo multiplex que utiliza dos sondas Taqman marcadas de forma diferente que son dirigidas a los alelos. Una de las sondas se diseña con 100 % de coincidencia para el primer alelo y la otra con 100 % de coincidencia para el alelo mutante, de tal manera que las sondas se adaptaran a la región específica y emitirán señal fluorescente. De esta forma es posible saber si existen alelos homocigotos o heterocigotos.

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 $\sim 0.2^\circ\text{C}/\text{seg}$, lo que ocasiona la desnaturalización del producto de qPCR como se muestra en la figura 6, 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 (figura 7), permitiendo comparar las curvas de disociación de las cadenas de ADN para la detección de polimorfismos o alteraciones epigenéticas

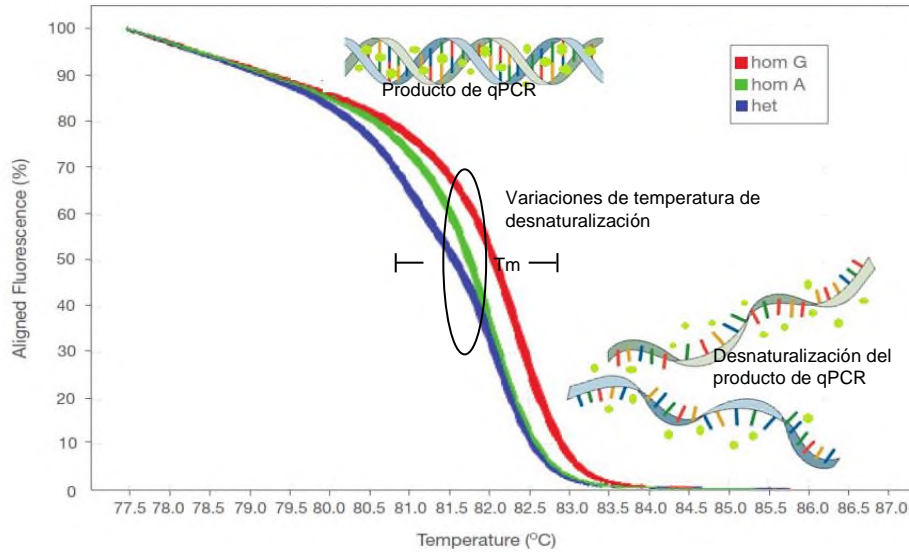


Figura 6. Gráfica de curvas de disociación normalizadas de fragmentos de organismos para la diferenciación de genotipos; homocigoto G (curva roja), homocigoto A (curva verde) y heterocigoto AG (curva azul) (Adaptado de Bio-Rad).

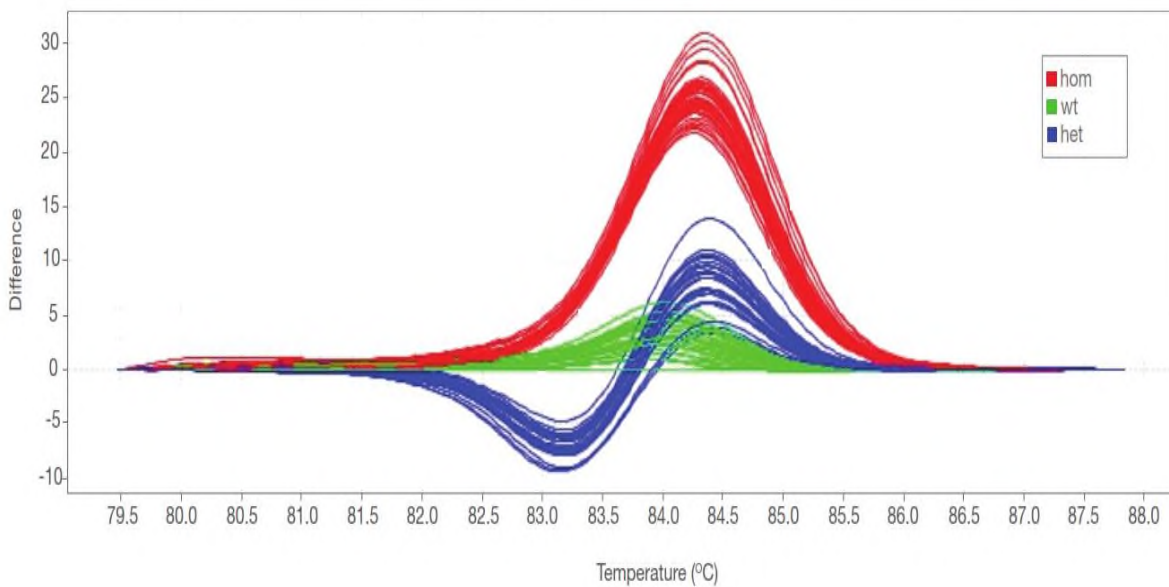


Figura 7. Análisis HRM. Diferencia de fluorescencia de fragmentos de interés respecto a una secuencia de referencia para la diferenciación de genotipos; homocigoto G (curva roja), homocigoto A (curva verde) y heterocigoto AG (curva azul) (Bio-Rad).

El análisis HRM depende de la habilidad para detectar los cambios en las curvas de disociación mediante el fluoróforo intercalante sobre el ADN. SYBR green es un agente intercalante que aumenta la emisión de fluorescencia cuando se une al ADN de doble hélice. Tiene dos picos principales de excitación: a 280 nm en UV y 502 nm en región visible (Wilhelm *et al.*, 2003). Su principal inconveniente es su baja especificidad debido a que se unen también a productos inespecíficos y además puede inhibir la reacción de PCR (Gudnason *et al.*, 2007).

Eva Green es un fluoróforo de unión al ADN, con un espectro de excitación y emisión muy parecido al SYBR Green. La diferencia entre los fluoróforos utilizados en la qPCR, consiste en la capacidad que tienen para saturar el ADN (Figura 8).

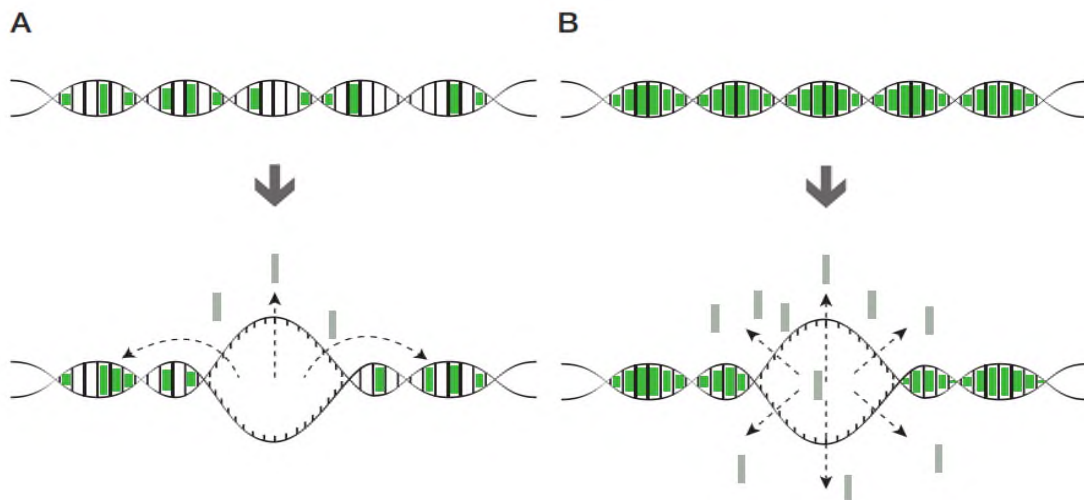


Figura 8. Saturación de fluoróforos sobre la doble cadena de ADN. A) SYBR Green B). Eva Green (Bio-Rad).

Es importante decir que hasta ahora no hay reportes sobre el uso de la técnica HRM ni sondas Taqman para la identificación de los polimorfismos presentes en el gen GDF9.

4. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, los ovinos son 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 favorables 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 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.

5. HIPÓTESIS

La técnica HRM permite la identificación de polimorfismos del gen GDF9 ligados a la prolificidad de ovinos en la región del Papaloapan.

6. OBJETIVOS

- Identificar mediante el análisis molecular HRM los polimorfismos G1, G4, G6 y G7 del gen GDF9 Pelibuey, Black Belly, Kathandin, Dorper y sus cruzas en la región del Papaloapan del estado de Oaxaca.
- Estimar la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos del gen GDF9 asociados a la prolificidad en ovinos de pelo antes mencionados.

Objetivos específicos

- Diseñar oligonucleótidos para amplificación de los fragmentos de interés del gen GDF9 en ovinos
- Diseñar secuencias control de los fragmentos de interés para el análisis HRM
- Extraer el ADN de sangre total y verificar su integridad
- Amplificar el ADN mediante qPCR para el post análisis HRM
- Secuenciar muestras representativas en base al comportamiento obtenido en el análisis HRM.
- Determinar las variantes genéticas de los genotipos encontrados en las muestras analizadas de ADN de ovino.
- Determinar si la población se encuentra en equilibrio Hardy Weinberg.

7. METODOLOGÍA

7.1 Búsqueda de animales potenciales.

Se localizaron los ranchos ubicados en la región del Papaloapan principalmente los municipios; Acatlán de Pérez Figueroa, Loma Bonita y cercanos como Tres Valles, Cosamaloapan, Carlos A. Carrillo en donde se tenía como actividad la producción de ovinos.

7.2 Identificación de los animales

Se utilizaron registros reproductivos de las explotaciones de los productores demandantes, tomando como criterio de selección, aquellas hembras que hayan tenido partos, para el caso de los sementales todos fueron evaluados.

7.3 Toma de muestras sanguíneas.

Una vez identificados los animales en 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).

7.4 Extracción de ADN

Se utilizó el Kit de Extracción de ADN Sanguíneo GF-1 (Vivantis GF-BD-050), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En un tubo para centrifugado, se colocaron 200 µl de sangre de ovino y se le agregaron 200 µl de Buffer BB, se mezcló 5 seg en vórtex y se adicionaron 200 µl proteinasa K para la ruptura celular. Posteriormente se incubó a 65°C por 10 min.

Se adicionaron 200 µl de etanol absoluto y se mezcló hasta obtener una solución homogénea.

La mezcla se transfirió a una columna ensamblada dentro de un tubo, se centrifugó a 5,000g por 1 min y se descartó el líquido filtrado.

Se lavó la columna con 500 µl de Wash Buffer 1, se centrifugó a 5000 g por 1 min y se descartó el líquido filtrado.

Se lavó la columna con 500 µl de Wash Buffer 2, se centrifugó a 5000 g por 1 min y se descartó el líquido filtrado. Se repitió este paso con un tiempo de centrifugado de 3 min. La columna se puso en un tubo nuevo, se adicionaron 100 µl de Elution Buffer precalentado y se centrifugó a 5000 g por 1 min. 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 verificaron mediante electroforesis cargando 4 µl de ADN más 1 µl de buffer de carga en gel de agarosa al 0.8 % con buffer TAE 1X por 35min a 100 Volts. Las bandas se visualizaron en un sistema de fotodocumentación visualizando bandas propias del ADN genómico.

7.5 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 buscó el gen de interés y se diseñaron 8 secuencias control de nucleótidos de 50-100pb ubicadas en el exón 1 y 2 del gen GDF9 donde presentaban mutaciones por sustitución de bases de acuerdo a lo reportado por Hanrahan *et al.*, (2004). 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 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 muestra las secuencias control sintéticas donde el color verde representa la zona que hibrida el oligonucleótido directo, la zona sombreada en color azul indica

la mutación o también llamado SNP (Single Nucleotide Polymorphism) mientras que la zona sombreada en color morado representa la región sin cambio en la secuencia y la región en color amarillo, la zona que hibrida el oligonucleótido reverso.

Tabla 3. Secuencias control utilizadas para el análisis HRM.

Nombre de la secuencia control	Secuencia control sintético	Tamaño	Mutación
GDF9PSG1	<p> TGATGGGCACGGGGAACCCCCCAGGCTGCAGCCAGAT GACAGAGCTTTGCACTACATGAAGAGGCTCTATAA </p>	72pb	G1 (R87H)
GDF9NSS1	<p> TGATGGGCACGGGGAACCCCCCAGGCTGCAGCCAGAT GACAGAGCTTTGCGCTACATGAAGAGGCTCTATAA </p>	72pb	Sin cambio
GDF9PSG4	<p> GAGGAATATTCAG ATGTCTGTAAATTTTACATGTGCGAAAGACCAGCTGCA GCATCCTTCAGCGCGGGACAGCCTGT </p>	77pb	G2 (E241K)
GDF9NSS4	<p> GAGGAATATTCAG ATGTCTGTAAATTTTACATGTGCGGAAGACCAGCTGCA GCATCCTTCAGCGCGGGACAGCCTGT </p>	77pb	Sin cambio
GDF9PSG6	<p> GAGAGT GCCAGCTCTGAATTGAAGAAGCCTCTGATTCCAGCTTCAGT CAATCTGAGTGAATACTTCAAACAGTTTC </p>	76pb	G6 (V332I)
GDF9NSS6	<p> GAGAGT GCCAGCTCTGAATTGAAGAAGCCTCTGGTTCCAGCTTCAGT CAATCTGAGTGAATACTTCAAACAGTTTC </p>	76pb	Sin cambio
GDF9PSG7	<p> TTAGACTTAGCTTTAGTCAGCTGAAGTGGGACAACCTGGATT ATGGCCCCACACAAATACAACCCTCGATACTGTA </p>	75pb	G7 (V371M)
GDF9NSS7	<p> TTAGACTTAGCTTTAGTCAGCTGAAGTGGGACAACCTGGATT GTGGCCCCACACAAATACAACCCTCGATACTGTA </p>	75pb	Sin cambio

7.6 Diseño de oligonucleótidos

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

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en la amplificación del gen GDF9.

Nombre	Secuencia de oligonucleótidos	Tamaño (mer)	%GC	Tm (°C)
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 GCT 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

7.7 Amplificación de las secuencias control

Se realizaron diluciones (1:10 ,1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000) por duplicado de las secuencias control GDF9PSG1, GDF9NSS1, GDF9PSG4, GDF9PSS4, GDF9NSG6, GDF9NSS6, GDF9NSG7 y GDF9NSS7 partiendo de una concentración de 10µM para determinar la concentración estándar a utilizar.

Para la dilución 1:10, se agregaron en un tubo, 10 µl del control (10pM) y se adicionaron 90 µl de H₂O. Para la dilución 1:100, se agregaron en un tubo, 10 µl de la dilución 1:10 y 90 µl de H₂O y así sucesivamente.

Las diluciones control estándar de las secuencias mutantes y sin cambio se amplificaron mediante qPCR (Figura 9). Para la G1 (G/A) se utilizaron los oligonucleótidos GDF9G1FS (AGGTTCTGTATGATGGGCACG) y GDF9G1RS (GTAGCGTATGCCTTATAGAGCC). Para la mutación G4 (G/A) se usaron los oligonucleótidos GDF9G4FS (CTCCCACAAGAGGAATATTCAC) y GDF9G4RS (AGTCATGTTAAACAGGCTGCT). La tercera mutación G6 (G/A) se amplificó con los oligonucleótidos GDF9G6FS (AGAGACCAGGAGAGTGCCAG) y GDF9G6RS (CTGGGGAAAAAGAACTGTTTGAAG) y los oligonucleótidos empleados para la

cuarta mutación G7 (G/A) fueron GDF9G7FS (AGCTCCATGACTTTAGAC TTAGC) y GDF9G7RS (GACAGTCCCCTTTACAGTATCG) de acuerdo al diseño previo de oligonucleótidos.

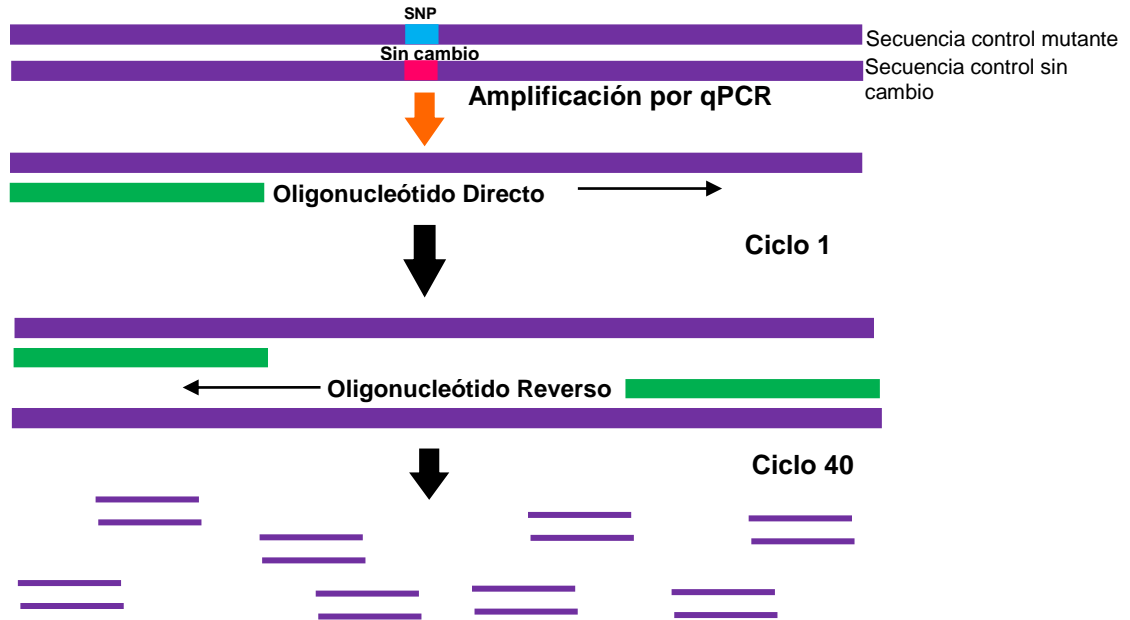


Figura 9. Diagrama de amplificación de las regiones de interés del gen GDF9

7.8 Amplificación de las muestras de ADN de ovino

A partir de ADN genómico extraído de sangre, se amplificó el marcador GDF9 por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) utilizando los oligonucleótidos empleados en la amplificación de las secuencias control (tabla 3). La amplificación de los fragmentos de interés se llevó a cabo mediante el protocolo de reacción Luminaris Color HRM Master Mix (Thermo Scientific #K1031BID), reactivo que contiene el agente intercalante Eva green para la mezcla de reacción y Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 2X (Thermo Scientific #K0252) como se muestra en la tabla 4.

Se estandarizó la concentración de controles sintéticos y de las muestras, requeridas para obtener una señal significativa de fluorescencia en el mismo ciclo de qPCR. Para todas las amplificaciones se utilizó una concentración de controles sintéticos de 0.0001 μM y de 12 ng/ μl de ADN genómico de ovino. La identificación de cada mutación se realizó por separado, debido a la temperatura de alineamiento específica para cada par de oligonucleótidos.

Tabla 5. Protocolo de la mezcla de reacción Luminaris Color HRM Master Mix y Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 2X.

Luminaris Color HRM Master Mix		Maxima SYBR Green qPCR Master Mix	
Reactivos	Cantidad	Reactivos	Cantidad
Master Mix (2X)	10 μl	Master Mix (2X)	12.5 μl
Oligonucleotido F (Forward)	1 μl (1 μM)	Oligonucleotido F (Forward)	1 μl (1 μM)
Oligonucleotido R (Reverse)	1 μl (1 μM)	Oligonucleotido R (Reverse)	1 μl (1 μM)
ADN genómico	1 μl (12ng)	ADN genómico	3 μl (\leq 500ng)
Agua libre de nucleasas	7 μl	Agua libre de nucleasas	7.5 μl
Volumen final	20 μl	Volumen final	25 μl

El protocolo del termociclador (Tabla 5) se efectuó como se muestra a continuación, con el fin de estandarizar las condiciones de amplificación.

Tabla 6. Protocolo del termociclador Pikoreal96

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	10 min	1
Desnaturalización	95°C	15 seg	40
Alineación/Extensión	58°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 4 μl de ADN más 1 μl de buffer de carga mostrando un tamaño esperado de ~100 pb.

7.9 Análisis HRM (High Resolution Melt Analysis)

Se realizó un ensayo HRM utilizando el fluoróforo Eva Green y SYBR Green para comparar la eficiencia de cada uno de acuerdo a las gráficas de diferencia para la detección de genotipos. Posteriormente se seleccionó un fluoróforo y se aplicó a todas las muestras. La técnica HRM permitió el análisis post PCR para detectar variantes alélicas dentro de nuestra secuencia de interés. Se realizó una curva 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.

7.10 Ensayo RFLP (Restricción Fragment Length Polymorphism)

Se realizó un ensayo RFLP como validación del análisis HRM de la mutación G1 (A/G) utilizando la enzima *HhaI* (Biolabs R0139S) con sitio de restricción GCG/C.

7.11 Secuenciación

Se realizó una selección de muestras representativas, tomando en cuenta el comportamiento de la desnaturalización del producto de PCR mostrado en las curvas del análisis HRM: aquellas curvas que se solapaban respecto a las curvas de los controles sintéticos y aquellas que no pero que mostraban el mismo comportamiento, así como también aquellas que tenían un comportamiento distinto. Se amplificaron fragmentos de 708 y 799 que abarcaron las mutaciones G1 y en el otro G4, G6 y G7, respectivamente. Se amplificaron mediante PCR utilizando los oligonucleótidos GDF91F y GDF91R para el fragmento de 708pb y los oligos GDF92BF y GDF92BR para el fragmento de 799pb (Anexo). Los productos se purificaron con el reactivo

AMPureXP (A63882). Posteriormente se secuenciaron en el Instituto de biotecnología (IBT).

7.12 Análisis estadístico

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

8. RESULTADOS

Se extrajeron un total de 305 muestras de sangre de ovinos de distintos ranchos ubicados en la región del Papaloapan.

8.1 Verificación de ADN de las muestras de ovinos.

La verificación del ADN extraído a partir de las muestras de sangre de ovino se observan en la figura 10, visualizando bandas propias del ADN genómico.

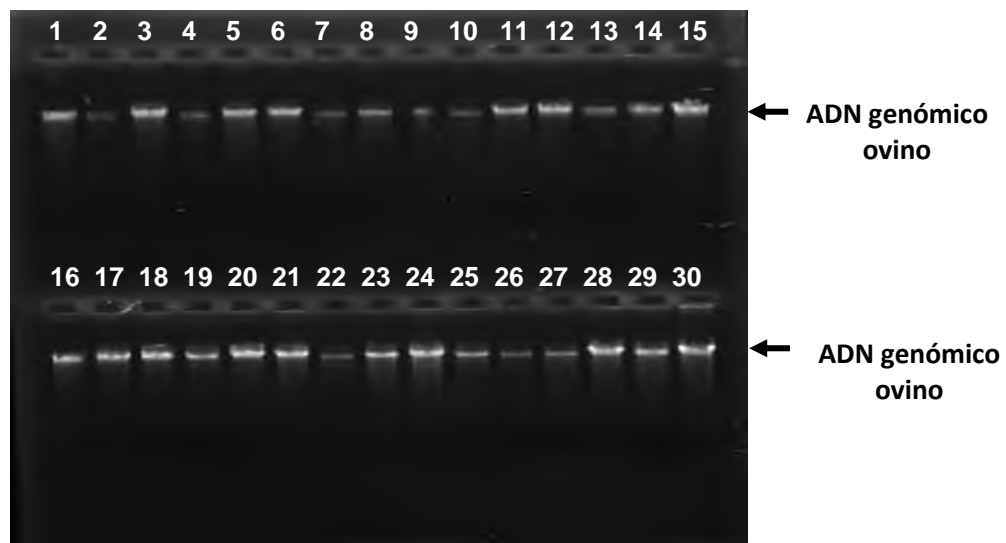


Figura 10. Verificación de ADN. Carril 1-30: ADN genómico de sangre de ovino.

8.2 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Las amplificaciones tuvieron un rango de fluorescencia de 1200 a 1800 RFU como se muestra en la Figura 8. La especificidad de los oligonucleótidos se demostró con la amplificación de los controles del gen GDF9 y las muestras procesadas.

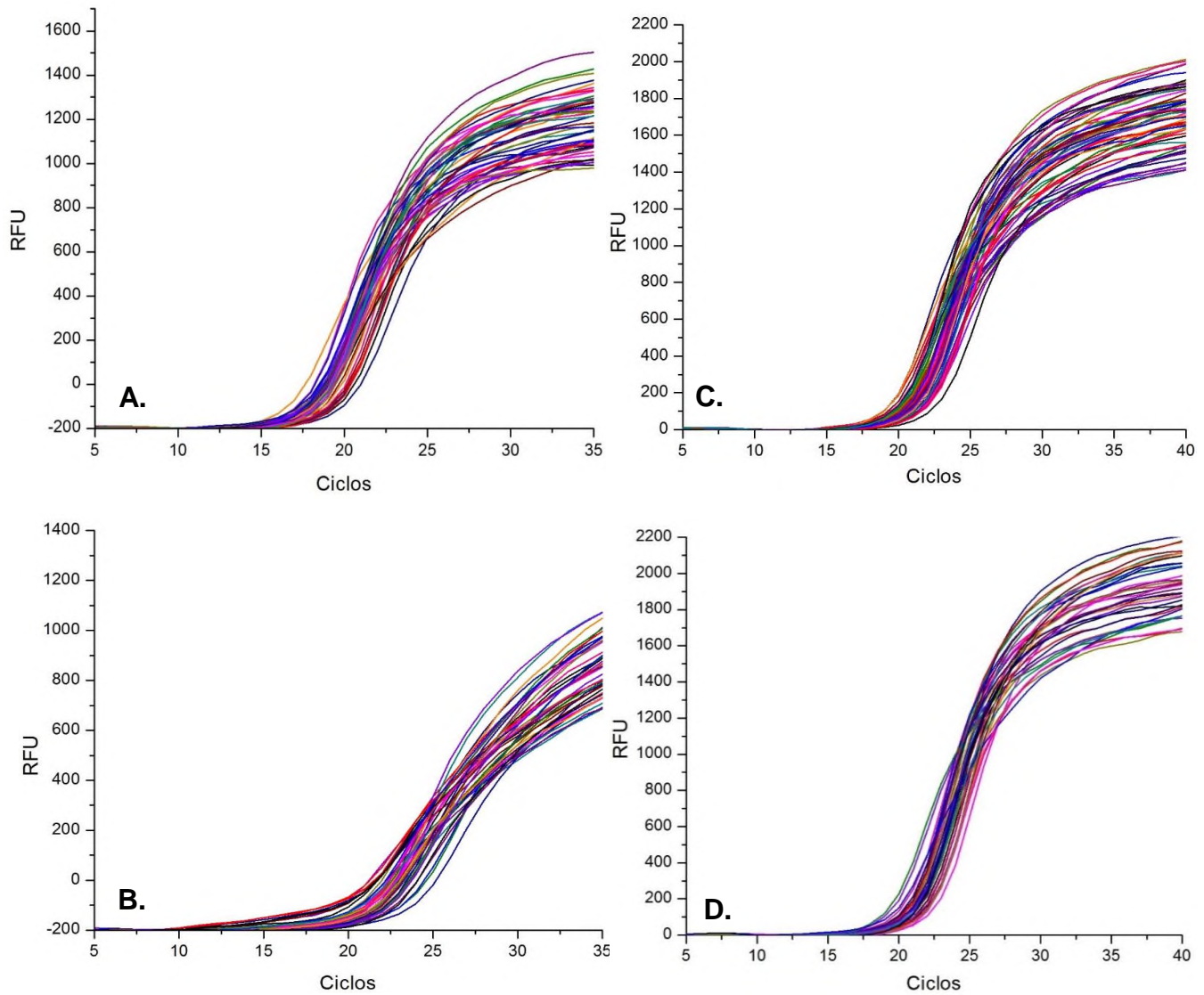


Figura 11. Amplificación de los controles y muestras del gen GDF9 mediante qPCR. A. Controles GDF9PSG1, GDF9NSS1 y muestras. B. Controles GDF9PSG4, DF9NSS4, y muestras. C. Controles GDF9PSG6, GDF9NSS6 y muestras. D. Controles GDF9PSG7, GDF9NSS7 y muestras.

El tamaño obtenido de los productos de qPCR se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 3 % TAE IX, mostrando un tamaño esperado de ~100 pb así como se observa en las figuras del anexo 3.

8.3 Análisis HRM (High Resolution Melt Analysis)

El análisis HRM utilizando el fluoróforo Eva Green mostró una eficiencia del 99.5% respecto a la identificación de los genotipos en la mutación G6 mediante el software de análisis de curvas de fusión PikoReal 2.2 mientras que SYBR Green tuvo una eficiencia del 98% para reconocer los genotipos. En la figura 12 se puede apreciar la diferencia entre un fluoróforo y otro, en donde existe una diferencia para identificar el alelo AG, sin embargo no se descarta como método de identificación, por lo cual SYBR green se utilizó en la genotipificación de los polimorfismos del gen GDF9.

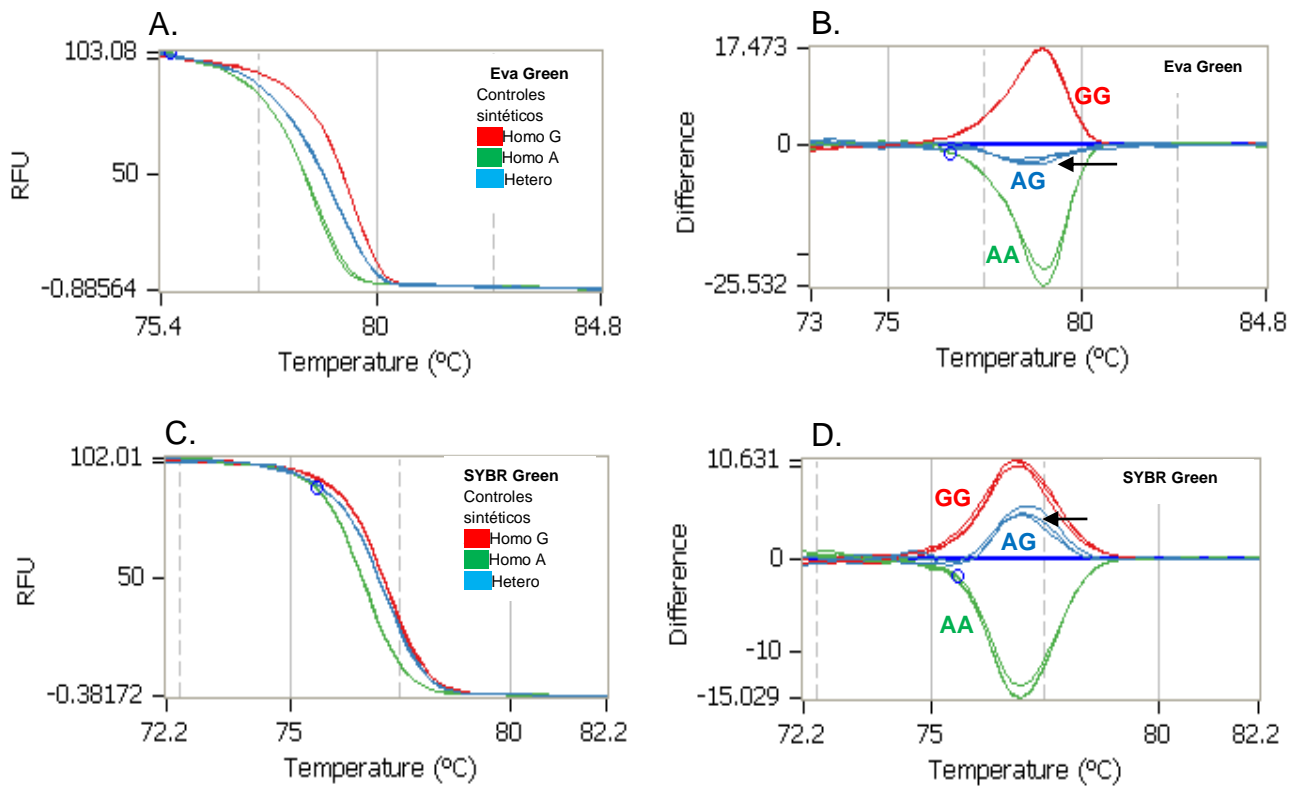


Figura 12. Análisis HRM con diferentes fluoróforos. Eva Green: A. Curvas de disociación que indican la desnaturalización de los productos de qPCR en controles sintéticos. B. Diferencia de fluorescencia de los controles sintéticos a partir de las curvas de disociación. SYBR Green: C. Curvas de disociación de los productos de qPCR de controles sintéticos. D. Diferencia de fluorescencia.

8.3.1 Mutación G1 (R87H) en el gen GDF9

El ensayo realizado mediante controles sintéticos para la identificación de la mutación G1 (R87H) localizado en el exón 1 del gen GDF9, en donde ocurre una transición de una A por una G 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 únicamente se identificó el genotipo GG, teniendo como referencias los controles sintéticos.

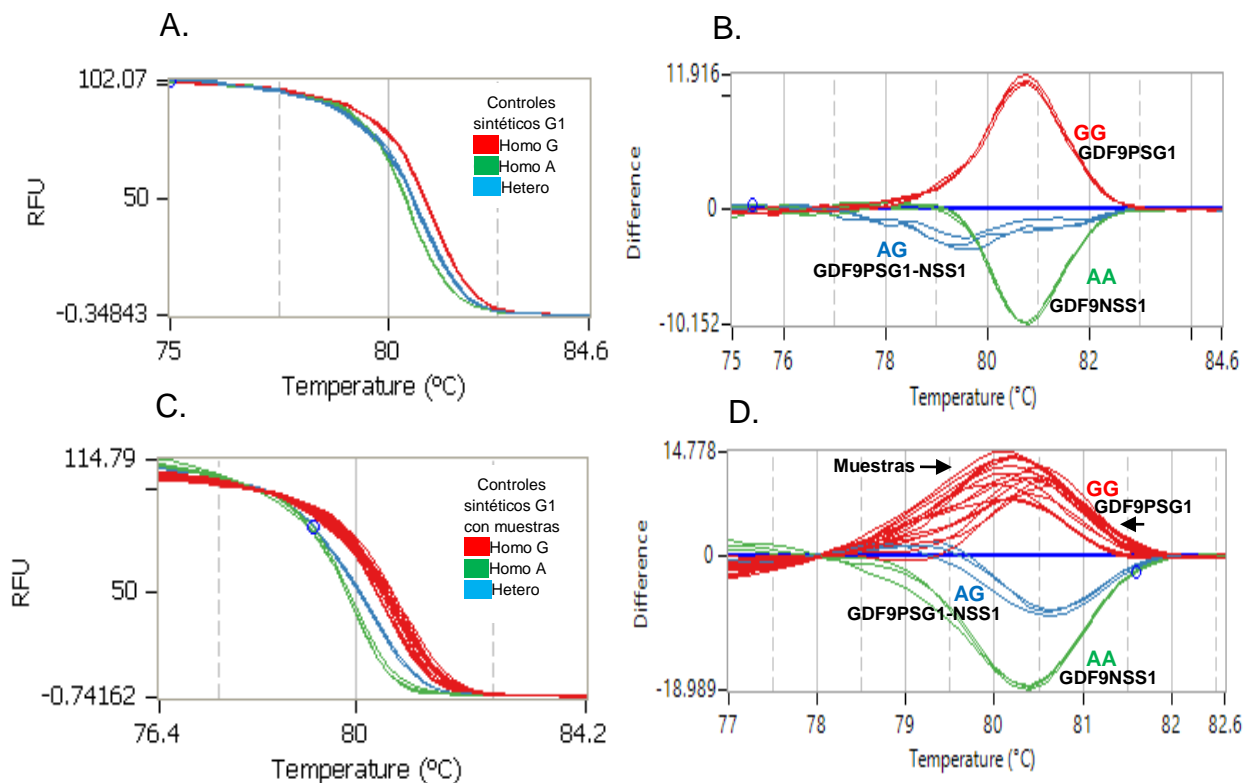


Figura 13. Análisis HRM para la mutación G1:A. Curvas de disociación que indica la desnaturalización de los productos de qPCR en controles sintéticos. B. Diferencia de fluorescencia de los controles sintéticos GDF9PSG1 y GDF9NSS1 a partir de las curvas de disociación para diferenciar genotipos. C. Curvas de disociación de los productos de qPCR de controles sintéticos y muestras de ADN ovino. D. Diferencia de fluorescencia de muestras de ADN ovino tomando como referencia los controles sintéticos.

8.3.2 Mutación G4 (E241K) en el gen GDF9

El análisis HRM realizado con controles sintéticos para la identificación de la mutación 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, mostró tres curvas de fusión con una temperatura específica correspondientes a los tres genotipos posibles. El ensayo realizado en las muestras permitió identificar los genotipos AG y GG.

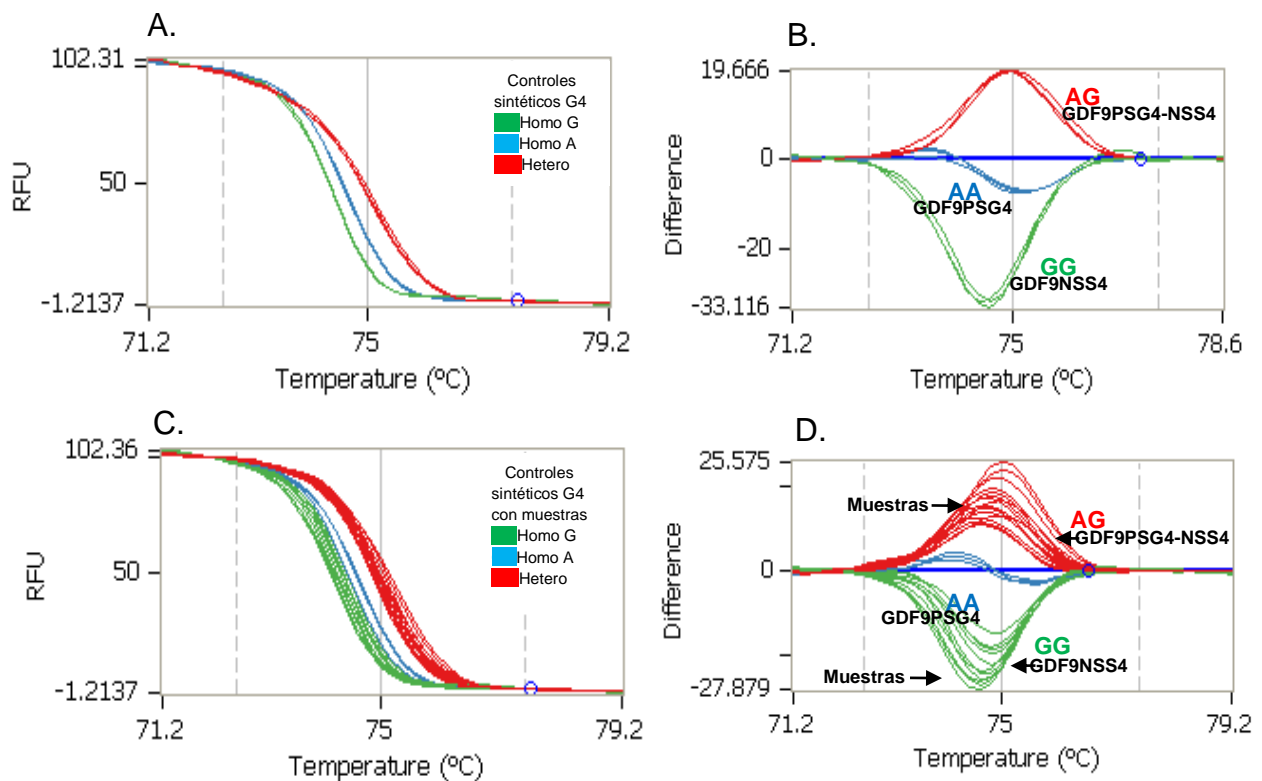


Figura14. Análisis HRM para la mutación G4: A. Curvas de disociación de los productos de qPCR en controles sintéticos. B. Diferencia de fluorescencia de los controles sintéticos GDF9PSG4 y GDF9NSS4 a partir de las curvas de disociación para diferenciar genotipos. C. Curvas de disociación de los productos de qPCR de controles sintéticos y muestras de ADN ovino. D. Diferencia de fluorescencia de muestras de ADN ovino tomando como referencia los controles sintéticos.

8.3.3 Mutación G6 (V332I) en el gen GDF9

Para la mutación G6 localizado en el exón 2 del gen GDF9, en donde ocurre una transición de una A por una G en la posición 996 partir del codón de inicio, 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 AA, GG y AG, cabe mencionar que el genotipo AG mostró dos comportamientos diferentes.

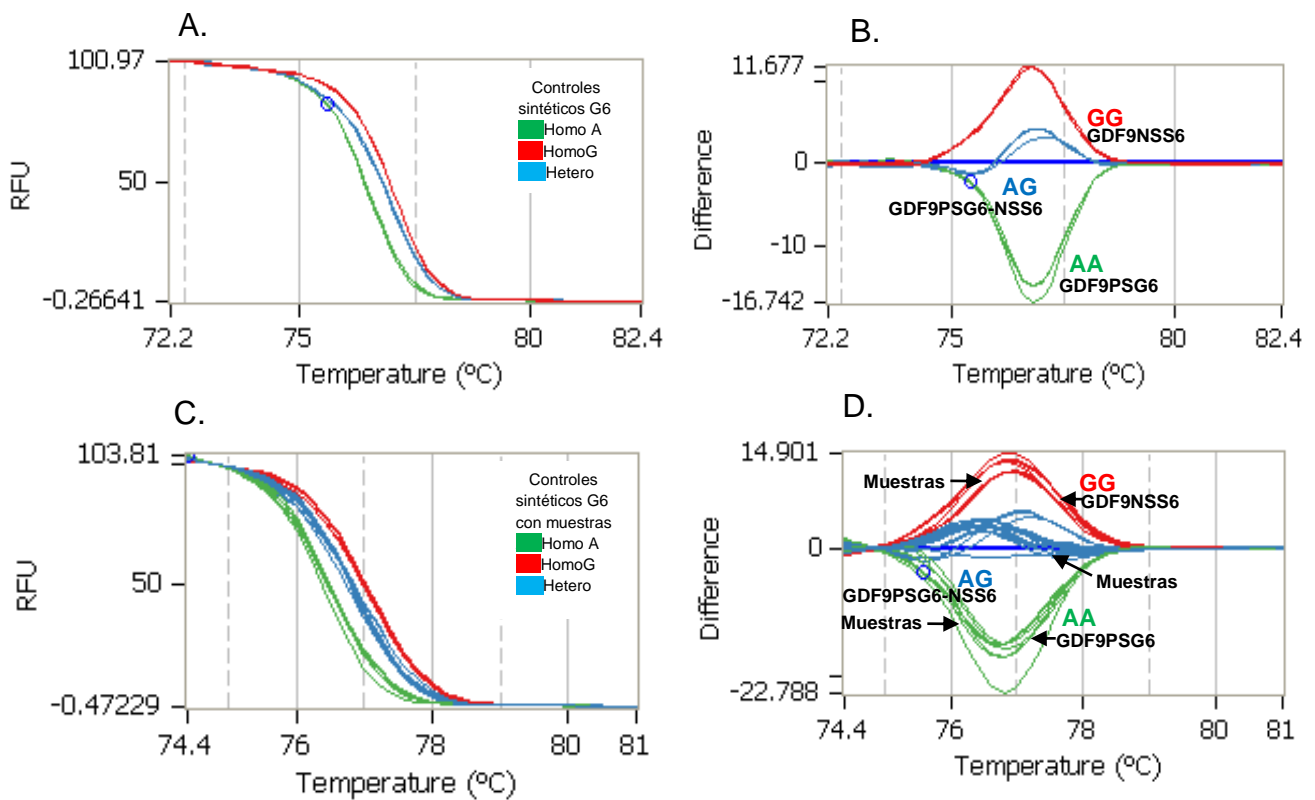


Figura 15. Análisis HRM para la mutación G6: A. Curvas de disociación que indica la desnaturalización de los productos de qPCR en controles sintéticos. B. Diferencia de fluorescencia de los controles sintéticos GDF9PSG6 y GDF9NNS6 a partir de las curvas de disociación para diferenciar genotipos. C. Curvas de disociación de los productos de qPCR de controles sintéticos y muestras de ADN ovino. D. Diferencia de fluorescencia de muestras de ADN ovino tomando como referencia los controles sintéticos.

8.3.4 Mutación G7 (V371M) en el gen GDF9

La figura 16 mostró la adecuada identificación de los genotipos en los controles sintéticos, sin embargo al analizar las muestras de ADN de ovinos, únicamente se identificó el genotipo GG localizado en el exón 2 del gen GDF9 en el análisis HRM, donde se obtuvieron tres diferentes temperaturas y curvas de fusión correspondientes a los tres genotipos posibles respecto a los controles.

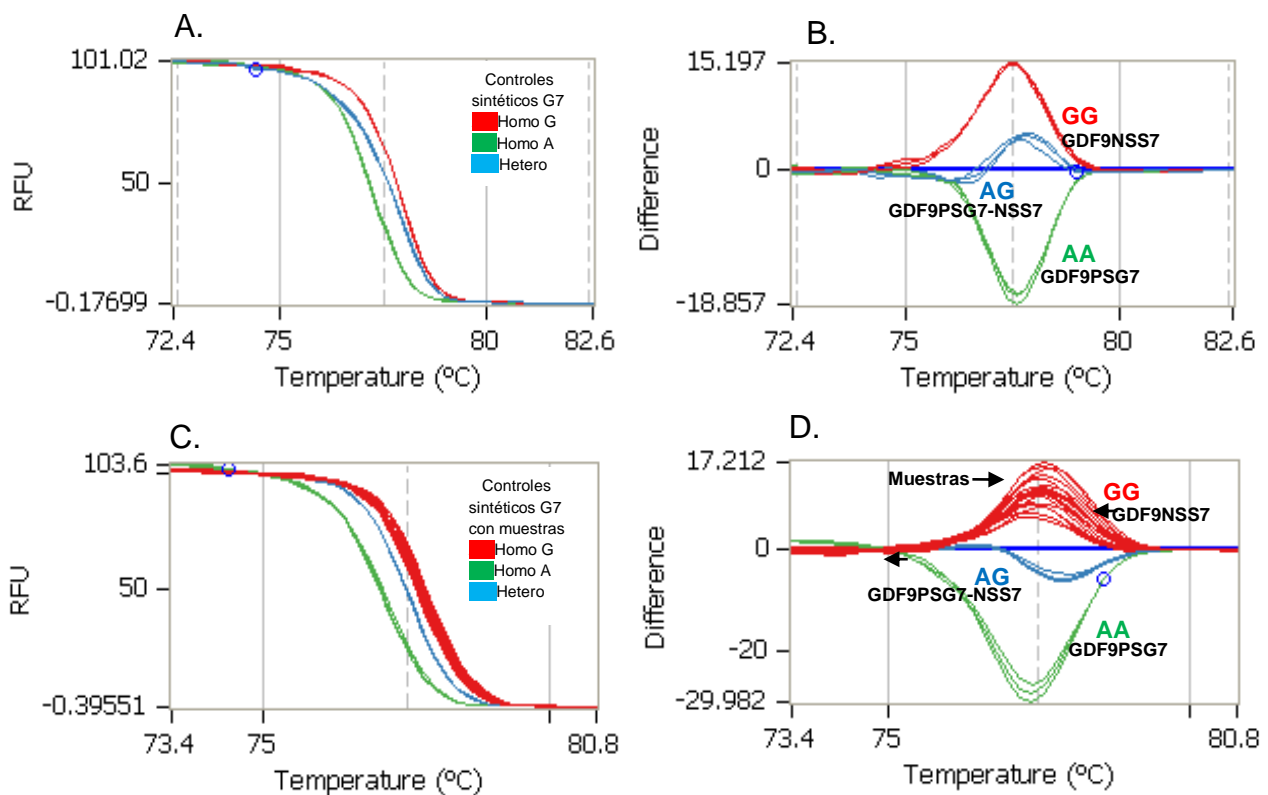


Figura 16. Análisis HRM para la mutación G7: A. Curvas de disociación que indica la desnaturalización de los productos de qPCR en controles sintéticos. B. Diferencia de fluorescencia de los controles sintéticos GDF9PSG7 y GDF9NSS7 a partir de las curvas de disociación para diferenciar genotipos. C. Curvas de disociación de los productos de qPCR de controles sintéticos y muestras de ADN ovino. D. Diferencia de fluorescencia de muestras de ADN ovino tomando como referencia los controles sintéticos.

8.4 Ensayo RFLP (Restricción Fragment Length Polymorphism)

Para verificar que la mutación G1 no estaba presente en las muestras de ADN de ovino, se analizaron muestras representativas, ~ 50 muestras. El producto amplificado fue de 708 pb correspondiente a la región del primer exón del gen GDF9 que se digirió con la enzima *HhaI*. Se observaron patrones de restricción de 127 pb, 254 pb y 327 pb, lo cual indicó que no había cambios en la secuencias de nucleótidos de las muestras de ADN en ovinos y únicamente conservaba el alelo GG. Coincidentemente arroja el mismo resultado que se obtuvo mediante en análisis HRM que se muestra en la figura 13.

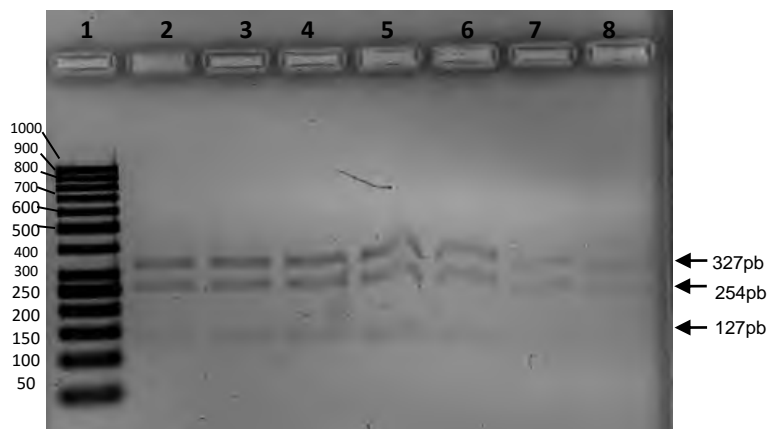


Figura 17. Ensayo RFLP para la mutación G1. Carril 1: Marcador de peso. Carril 2-8. Producto de PCR digeridas con la enzima *HhaI* con el alelo GG.

8.5 Secuenciación

En el CLUSTAL 0(1.2.1), se escogieron dos secuencias aleatorias de muestras de ADN para representar el resultado obtenido de la secuenciación, tomando como validación que el secuenciador automático de ADN lee a partir de la base 50 hasta ~700 pb, desde el extremo 3' del oligo, ubicando a la mutación en la base 291 del

producto secuenciado. Estas secuencias comparadas del fragmento de 708 pb del exón 1 secuenciado para la identificación de la mutación G1 en muestras de ovino con la región de gen GDF9 (AF078545.2) se observa que conserva el genotipo GG, tal como se indica con una flecha negra en la figura18 y no muestra ningún cambio de nucleótidos respecto a la secuencia reportada en la base de datos como se observa en la figura 19 en la región sombreada en color morado.

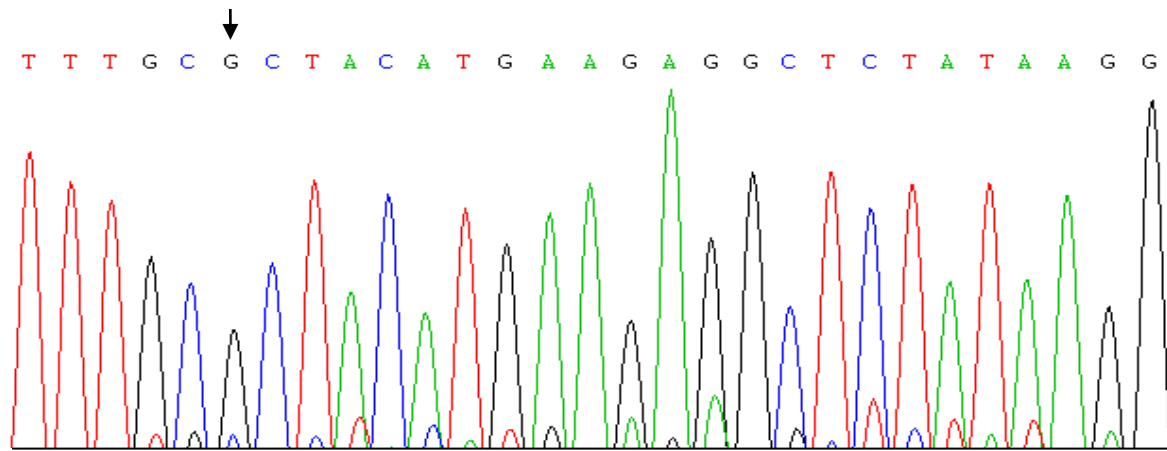


Figura 18. Secuenciación de un fragmento de 708pb en el exón 1 del gen GDF9 en muestra de ovino con genotipo GG.

```

CLUSTAL O (1.2.1) multiple sequence alignment

Gen GDF9      TCTCCTTTCCCCTCTCTTAGAGGTTCTGTATGATGGGCACGGGGAACCCCCCAGGCTGCA
Muestra93    TCTCCTTTCCCCTCTCTTAGAGGTTCTGTATGATGGGCACGGGGAACCCCCCAGGCTGCA
Muestra117   TCTCCTTTCCCCTCTCTTAGAGGTTCTGTATGATGGGCACGGGGAACCCCCCAGGCTGCA
*****

Gen GDF9      GCCAGATGACAGAGCTTTGCGCTACATGAAGAGGCTCTATAAGGCATACGCTACCAAGGA
Muestra93    GCCAGATGACAGAGCTTTGCGCTACATGAAGAGGCTCTATAAGGCATACGCTACCAAGGA
Muestra117   GCCAGATGACAGAGCTTTGCGCTACATGAAGAGGCTCTATAAGGCATACGCTACCAAGGA
*****

Gen GDF9      GGGGACCCCTAAATCCAACAGACGCCACCTCTACAACACTGTTCGGCTCTTCACCCCTG
Muestra93    GGGGACCCCTAAATCCAACAGACGCCACCTCTACAACACTGTTCGGCTCTTCACCCCTG
Muestra117   GGGGACCCCTAAATCCAACAGACGCCACCTCTACAACACTGTTCGGCTCTTCACCCCTG
*****

```

Figura 19. Multialineamiento del exón 1 del gen GDF9 (AF078545.2) comparadas con productos de PCR secuenciados del gen GDF9.

La secuenciación de productos de PCR con un tamaño de 799pb para la identificación de la mutación G4 ubicada en la posición 84 del fragmento amplificado se muestra en la figura 20, donde las zonas cambiantes se indican con flechas negras. Cabe mencionar que la secuenciación reveló heterocigosidad (figura 20.A) en parte de la población, teniendo la presencia del alelo AG o también representado como base degenerada “R” en el resultado de la secuenciación.

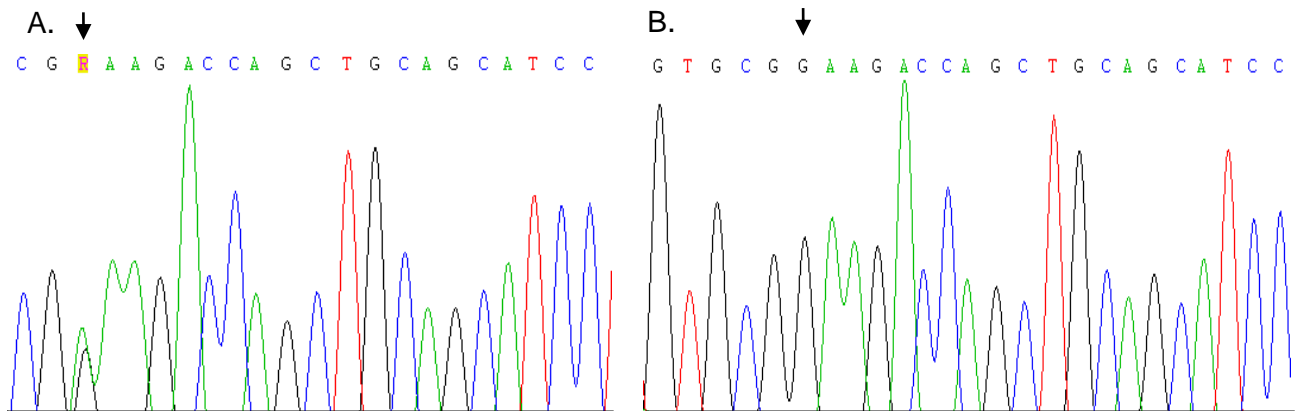


Figura 20. Secuenciación de un fragmento de 799pb en el exón 2 del gen GDF9 en muestras de ovino. A. Genotipo AG. B. Genotipo GG.

Por otro lado, la figura 21 muestra el CLUSTAL O (1.2.1) que compara fragmentos de secuencias previamente seleccionadas de manera aleatoria de acuerdo al resultado arrojado en la secuenciación con la región del gen GDF9 (AF078545.2) que demuestra que se conserva el genotipo GG así como también el genotipo AG, esto se observa en la región sombreada en color verde.

```

CLUSTAL O (1.2.1) multiple sequence alignment
Muestra65  TGTCTGTAAATTTTACATGTGCGGAAAGACCAGCTGCAGCATCCTTCAGCGCGGGACAGCC
Muestra44  TGTCTGTAAATTTTACATGTGCGGAAAGACCAGCTGCAGCATCCTTCAGCGCGGGACAGCC
Gen GDF9   TGTCTGTAAATTTTACATGTGCGGAAAGACCAGCTGCAGCATCCTTCAGCGCGGGACAGCC
Muestra45  TGTCTGTAAATTTTACATGTGCGGAAAGACCAGCTGCAGCATCCTTCAGCGCGGGACAGCC
*****

Muestra65  TGTTTAACATGACTCTTCTCGTAGCGCCCTCACTGCTTTTGTATCTGAACGACACAAGTG
Muestra44  TGTTTAACATGACTCTTCTCGTAGCGCCCTCACTGCTTTTGTATCTGAACGACACAAGTG

```

```

Gen GDF9      TGTTTAACATGACTCTTCTCGTAGCGCCCTCACTGCTTTTGTATCTGAACGACACAAGTG
Muestra45    TGTTTAACATGACTCTTCTCGTAGCGCCCTCACTGCTTTTGTATCTGAACGACACAAGTG
*****

Muestra65    CTCAGGCTTTTCACAGGTGGCATTCCCTCCACCCTAAAAGGAAGCCTTCACAGGGTCCTG
Muestra79    CTCAGGCTTTTCACAGGTGGCATTCCCTCCACCCTAAAAGGAAGCCTTCACAGGGTCCTG
Muestra44    CTCAGGCTTTTCACAGGTGGCATTCCCTCCACCCTAAAAGGAAGCCTTCACAGGGTCCTG
Gen GDF9     CTCAGGCTTTTCACAGGTGGCATTCCCTCCACCCTAAAAGGAAGCCTTCACAGGGTCCTG
Muestra45    CTCAGGCTTTTCACAGGTGGCATTCCCTCCACCCTAAAAGGAAGCCTTCACAGGGTCCTG
*****

```

Figura 21. Multialineamiento del exón 2 del gen GDF9 (AF078545.2) comparadas con productos de PCR secuenciados del gen GDF9.

Los resultados de la secuenciación del producto de PCR de 799 pb para la identificación de la mutación G6 mostraron la existencia de los alelos AA, GG y AG ubicada en la posición 357 del fragmento amplificado (figura 22). Sin embargo también se localizó la presencia de otra mutación indicada con las flechas moradas, representada por la letra “R” que significa A y G.

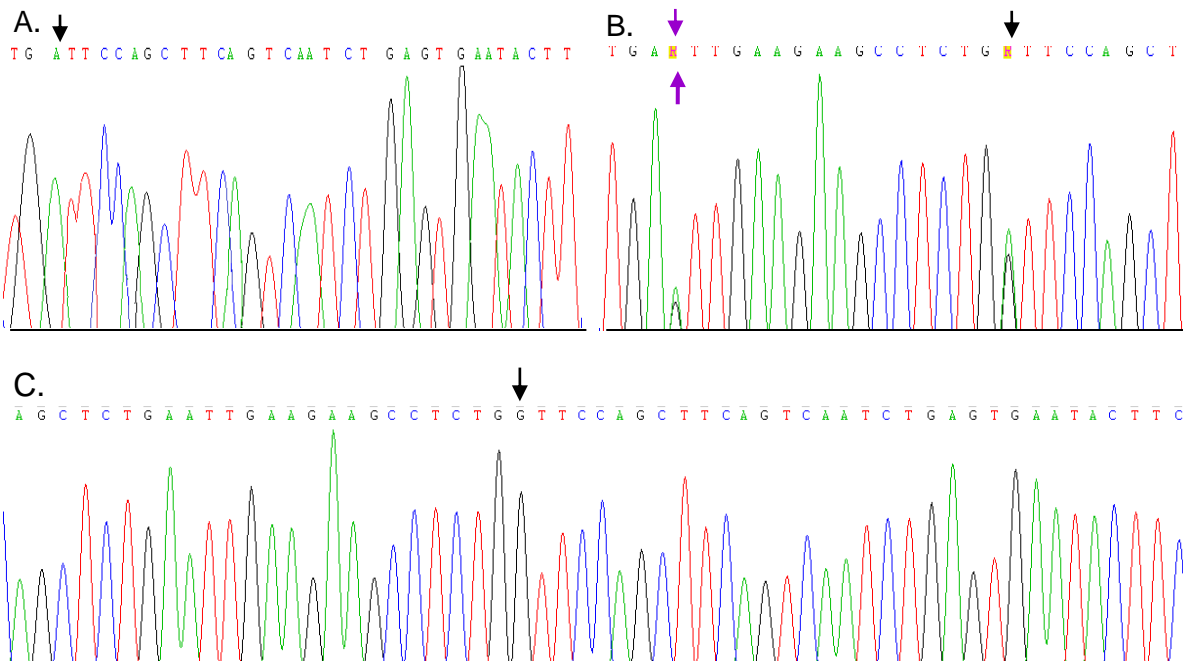


Figura 22. Secuenciación de un fragmento de 799pb en el exón 2 del gen GDF9 en muestras de ovino. A. Genotipo AA. B. Genotipo AG. C. Genotipo GG.

En el CLUSTAL 0 (1.2.1) se comparó la región del gen GDF9 (AF078545.2) con resultados de la secuenciación de muestras seleccionadas aleatoriamente y se observó la existencia de los alelos AA, GG y AG (figura 22), así como también se muestran las regiones cambiantes sombreadas en color rosa de otra mutación como se indicó anteriormente en la figura 21.

```

CLUSTAL 0 (1.2.1) multiple sequence alignment

Muestra65  CGTCCCGTCACCGCAGAGACCAGGAGAGTGCCAGCTCTGAAATTGAAGAAGCCTCTGATTC
Muestra7   CGTCCCGTCACCGCAGAGACCAGGAGAGTGCCAGCTCTGARITGAAGAAGCCTCTGRITTC
Muestra44  CGTCCCGTCACCGCAGAGACCAGGAGAGTGCCAGCTCTGAAITGAAGAAGCCTCTGGITTC
Gen GDF9   CGTCCCGTCACCGCAGAGACCAGGAGAGTGCCAGCTCTGAAITGAAGAAGCCTCTGGITTC
Muestra45  CGTCCCGTCACCGCAGAGACCAGGAGAGTGCCAGCTCTGARITGAAGAAGCCTCTGRITTC
*****

Muestra65  CAGCTTCAGTCAATCTGAGTGAATACTTCAAACAGTTTCTTTTTCCCCAGAATGAATGTG
Muestra79  CAGCTTCAGTCAATCTGAGTGAATACTTCAAACAGTTTCTTTTTCCCCAGAATGAATGTG
Muestra44  CAGCTTCAGTCAATCTGAGTGAATACTTCAAACAGTTTCTTTTTCCCCAGAATGAATGTG
Gen GDF9   CAGCTTCAGTCAATCTGAGTGAATACTTCAAACAGTTTCTTTTTCCCCAGAATGAATGTG
Muestra45  CAGCTTCAGTCAATCTGAGTGAATACTTCAAACAGTTTCTTTTTCCCCAGAATGAATGTG
*****

```

Figura 23. Multialineamiento del exón 2 del gen GDF9 (AF078545.2) comparadas con productos de PCR secuenciados del gen GDF9.

Los productos de 799pb secuenciados y comparados en el CLUSTAL 0 (1.2.1) con la región de gen GDF9 (AF078545.2) para la identificación de la mutación G7en muestras de ovino, mostrarón que se conserva el genotipo GG y no existe ningún cambio de nucleótidos (figura 24-25).

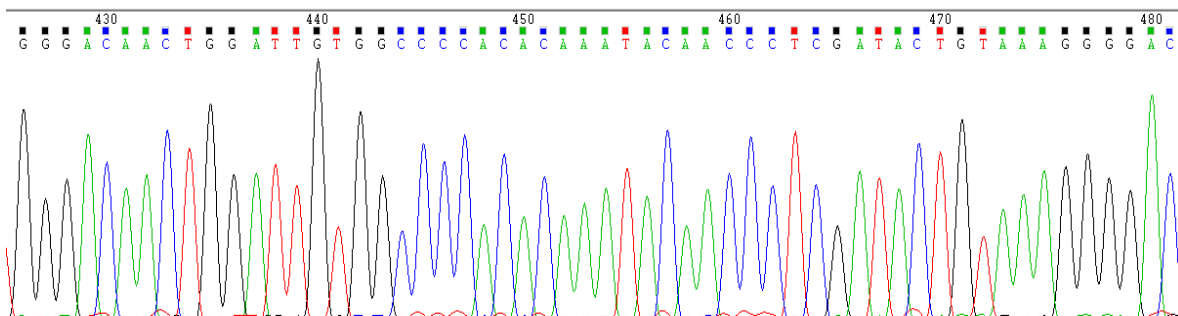


Figura 24. Secuenciación de un fragmento de 799pb en el exón 2 del gen GDF9 en muestras de ovino con genotipo GG.

```

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

193.65      CAGCTTCAGTCAATCTGAGTGAATACTTCAAACAGTTTCTTTTTCCCCAGAATGAATGTG
191.79      CAGCTTCAGTCAATCTGAGTGAATACTTCAAACAGTTTCTTTTTCCCCAGAATGAATGTG
192.44      CAGCTTCAGTCAATCTGAGTGAATACTTCAAACAGTTTCTTTTTCCCCAGAATGAATGTG
M234       CAGCTTCAGTCAATCTGAGTGAATACTTCAAACAGTTTCTTTTTCCCCAGAATGAATGTG
190.45      CAGCTTCAGTCAATCTGAGTGAATACTTCAAACAGTTTCTTTTTCCCCAGAATGAATGTG
*****

193.65      AGCTCCATGACTTTAGACTTAGCTTTAGTCAGCTGAAGTGGGACAAC TGGATTGTGGCCC
191.79      AGCTCCATGACTTTAGACTTAGCTTTAGTCAGCTGAAGTGGGACAAC TGGATTGTGGCCC
192.44      AGCTCCATGACTTTAGACTTAGCTTTAGTCAGCTGAAGTGGGACAAC TGGATTGTGGCCC
M234       AGCTCCATGACTTTAGACTTAGCTTTAGTCAGCTGAAGTGGGACAAC TGGATTGTGGCCC
190.45      AGCTCCATGACTTTAGACTTAGCTTTAGTCAGCTGAAGTGGGACAAC TGGATTGTGGCCC
*****

193.65      CACACAAATACAACCCTCGATACTGTAAAGGGGACTGTCCAGGGCGGTCGGACATCGGT
191.79      CACACAAATACAACCCTCGATACTGTAAAGGGGACTGTCCAGGGCGGTCGGACATCGGT
192.44      CACACAAATACAACCCTCGATACTGTAAAGGGGACTGTCCAGGGCGGTCGGACATCGGT
M234       CACACAAATACAACCCTCGATACTGTAAAGGGGACTGTCCAGGGCGGTCGGACATCGGT
190.45      CACACAAATACAACCCTCGATACTGTAAAGGGGACTGTCCAGGGCGGTCGGACATCGGT
*****

```

Figura 25. Multialineamiento del exón 2 del gen GDF9 (AF078545.2) comparadas con productos de PCR secuenciados del gen GDF9.

Para la verificación de homología de los productos secuenciados se realizó un BLAST_n para encontrar el porcentaje de identidad con el gen GDF9 en *Ovis aries*. En el análisis se observó un 100% de identidad con el Factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9) en *Ovis aries* con número de acceso AF078545.2 (Figura 26-27), el cual coincide con la secuencia que se ha trabajado en todos los apartados.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Ovis aries growth/differentiation factor 9 (GDF9) mRNA, complete cds	623	623	100%	7e-175	100%	KR063137.1
Ovis canadensis canadensis isolate 43U chromosome 5 sequence	623	623	100%	7e-175	100%	CP011890.1
Ovis aries growth differentiation factor 9 (GDF9), mRNA	623	623	100%	7e-175	100%	NM_001142888.2
Ovis aries growth differentiation factor-9 gene, complete cds	623	623	100%	7e-175	100%	AF078545.2
Ovis aries GDF9 gene, breed Norwegian white sheep	617	617	100%	3e-173	99%	HE866499.1
Ovis aries growth and differentiation factor 9 variant FecG-Embrapa (GDF9) mRNA, complete cds	617	617	100%	3e-173	99%	FJ429111.1

Figura 26. Descripción de las secuencias homologas al producto secuenciado de la región del gen GDF9.

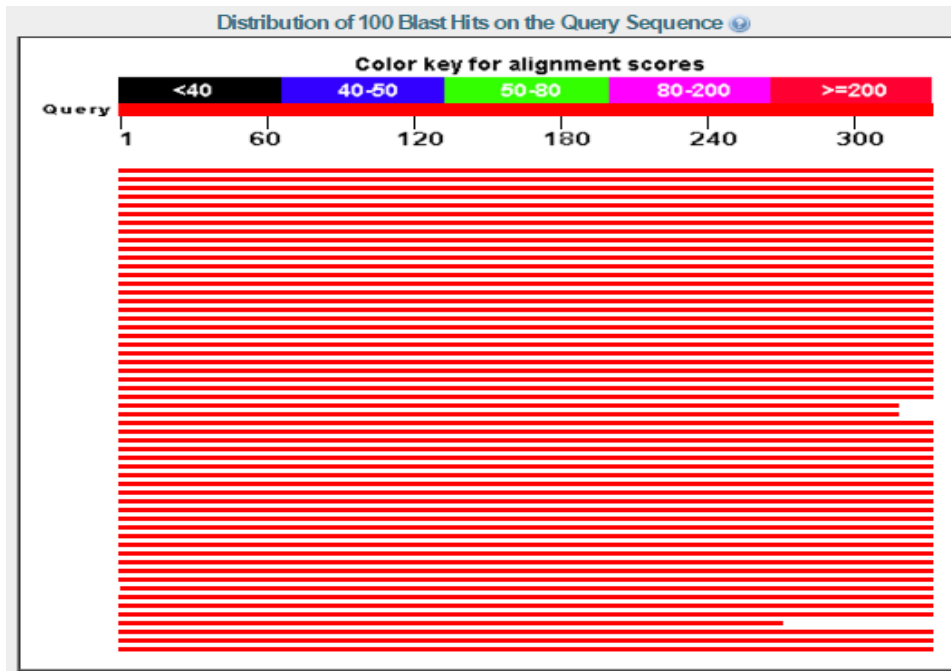


Figura 27. Blast_n del fragmento de ADN secuenciado del gen GDF9 de muestras de ovino.

8.6 Análisis estadístico

Para la identificación de la mutación G1 en el gen GDF9 se observó que el 100% de la población (n=270) presentó el genotipo GG, mientras que la mutación G4 mostró un 70% para el genotipo GG y un 30% para el genotipo AG del total de la población (n=226). La mutación G6 presentó los genotipos AA, GG y AG con un porcentaje 10%, 77% y 13% respectivamente del total de la población (n=293). Con respecto a la identificación de la mutación G7, no se observó ningún cambio en el análisis de las secuencias de ADN, por lo que todas las muestras analizadas (n=294) expresaron el 100% del genotipo GG. Cabe recalcar que de las 305 muestras extraídas de ADN no todas se identificaron por que no presentaron las mismas condiciones de amplificación por lo que se descartaron.

Mutaciones presentes en el gen GDF9 en ovinos

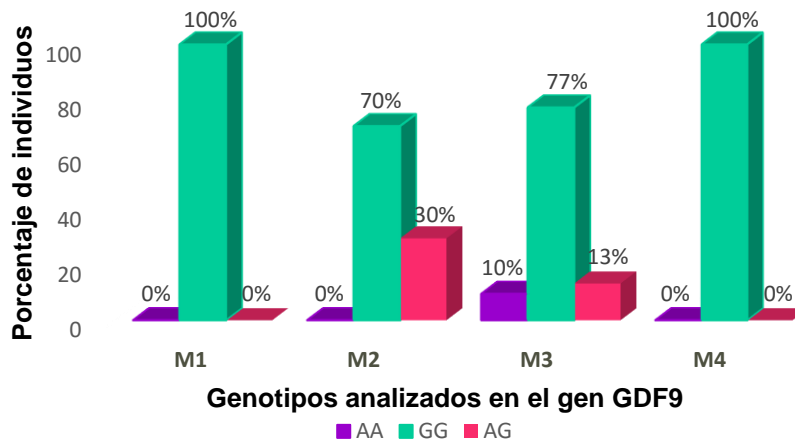


Figura 28. Porcentaje de genotipos en regiones del gen GDF9

Las muestras analizadas para la identificación de la mutación G4 expresaron los alelos AG y GG mientras que la mutación G6, mostró la existencia de los 3 alelos: AA, GG y AG, por lo que se aplicó el análisis estadístico de la variabilidad genética, considerando las razas como una sola población y tomando en cuenta el equilibrio Hardy-Weinberg con la prueba de X^2 (ji cuadrada), que indica el equilibrio de las frecuencias alélicas cuando cambian de una generación a otra y el equilibrio de las frecuencias genotípicas bajo los supuestos de que el sistema de apareamiento de los individuos analizados es aleatoria y sin selección.

En la tabla 6, se observa que la frecuencia del genotipo para el homocigoto AA fue de 0.0, para el heterocigoto AG de 0.3 y para el homocigoto GG de 0.7 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 14 % y 86 % respectivamente, siendo el alelo GG el más predominante como se observa en la figura 29. Asimismo se observa que la heterocigosidad media fue de 0.3. Se obtuvo un valor de $X^2_{obs}=6.84$

que se comparó con el valor obtenido de tablas que fue igual a $X^{2t}_{teorica}=5.99$ con 2 grados de libertad y un grado de confianza igual a 0.05. Como $X^{2}_{obs}>X^{2t}_{teorica}$, 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 7. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para la mutación G4 del gen GDF9.

	Genotipos			Total	Frecuencias alélicas	
	AA	AG	GG		A	G
Número de individuos observados	0	67	159	226	0.14	0.86
Frecuencia genotípica observada	0	0.3	0.7	1		
Frecuencia genotípica esperada $p^2+2pq+q^2$	0.02	0.26	0.72	1		
Número de individuos esperados	5	57	164	226		

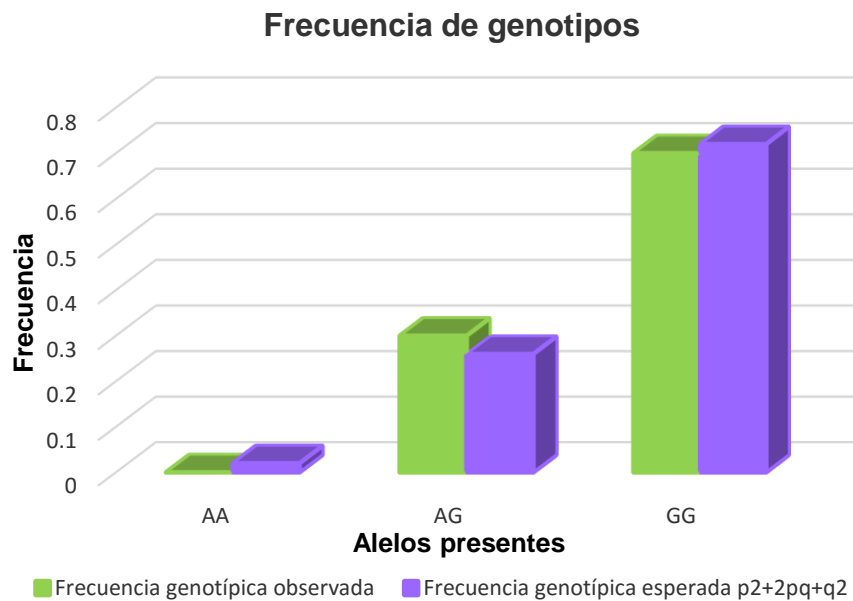


Figura 29. Frecuencia genotípica para la mutación G4 en el gen GDF9

En la tabla 7, se observa que la frecuencia del genotipo para el homocigoto AA fue de 0.10, para el heterocigoto AG de 0.13 y para el homocigoto GG de 0.77 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 17% y 83% respectivamente, siendo el alelo GG el más predominante como se observa en la figura 30. Asimismo se observa que la heterocigosidad media fue de 0.32. Se obtuvo un valor de $X^2_{obs}=79.22$ 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, lo que significa que en la composición genética actúa la selección natural y con ello cambios mutacionales.

Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de ovino para la mutación G6 del gen GDF9.

	Genotipos			Total	Frecuencias alélicas	
	AA	AG	GG		A	G
Número de individuos observados	28	39	226	293	0.17	0.83
Frecuencia genotípica observada	0.1	0.13	0.77	1		
Frecuencia genotípica esperada $p^2+2pq+q^2$	0.03	0.27	0.70	1		
Número de individuos esperados	8	80	205	293		

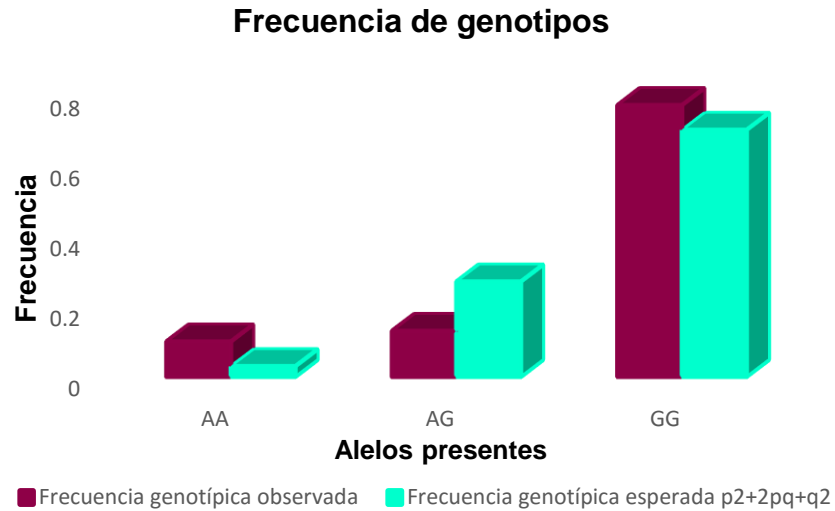


Figura 30. Frecuencia genotípica para la mutación G6 en el gen GDF9

En la tabla 9 se observa la comparación de frecuencias alélicas y genotípicas de las razas estudiadas de manera individual para la identificación de la mutación G4. Obteniendo como resultado general que la frecuencia genotípica observada más 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.

Así mismo, se observa que cada una de las razas estudiadas se encuentra en equilibrio Hardy Weinberg, no hay diferencias significativas entre los valores esperados y observados, teniendo una $X^2_{obs} \leq 4.26$, por lo que se asume que en cada población de acuerdo a su raza hay panmixia, es decir, que el apareamiento es al azar e independiente de cualquier preferencia física o genética, teniendo como supuesto que sólo conservan una mutación y recalando que permanecen como razas individuales.

Tabla 9. Frecuencias genotípicas y alélicas de muestras de ovino para la mutación G4 del gen GDF9 de acuerdo a su raza.

	Kathadin				Pelibuey				Dorper				Black Belly				Cruzas			
	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total
Nª de individuos observados	0	33	61	94	0	13	21	34	0	9	28	37	0	1	16	17	0	11	33	44
Frecuencia genotípica observada	0	0.351	0.64	1	0	0.382	0.61	1	0	0.243	0.756	1	0	0.058	0.941	1	0	0.25	0.75	1
Frecuencia genotípica esperada	.03	0.289	0.68	1	.03	0.309	0.65	1	0.01	0.213	0.771	1	0.00	0.05	0.94	1	0.015	0.21	0.76	1
p2+2pq+q2																				
Nª de individuos esperados	2.9	27.20	63.9	94	1.24	10.51	22.2	34	0.54	7.905	28.54	37	0.01	0.97	16.0	17	0.687	9.62	33.6	44
Frecuencias alélicas	A		G		A		G		A		G		A		G		A		G	
	0.18		0.82		0.2		0.8		0.12		0.88		0.03		0.97		0.125		0.875	

Tabla 10. Frecuencias genotípicas y alélicas de muestras de ovino para la mutación G6 del gen GDF9 de acuerdo a su raza.

	Kathadin				Pelibuey				Dorper				Black Belly				Cruzas			
	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total
Nª de individuos observados	23	31	96	150	3	7	25	35	2	1	33	36	0	0	17	17	0	0	55	55
Frecuencia genotípica observada	0.15	0.2067	0.64	1	0.086	0.2	0.714	1	0.056	0.0278	0.9167	1	0	0	1	1	0	0	1	1
Frecuencia genotípica esperada	0.07	0.3816	0.553	1	0.034	0.3024	0.663	1	0.005	0.1292	0.8659	1	0	0	1	1	0	0	1	1
p2+2pq+q2																				
Nª de individuos esperados	9.88	57.237	82.88	150	1.207	10.586	23.21	35	0.174	4.6528	31.174	36	0	0	17	17	0	0	55	55
Frecuencias alélicas	A		G		A		G		A		G		A		G		A		G	
	0.26		0.74		0.07		0.19		0.81		0.93		0		1		0		1	

Por otra parte, en la tabla 10 se observa la comparación de frecuencias alélicas y genotípicas de las razas estudiadas de manera individual para la identificación de la mutación G6, donde se muestra que la frecuencia genotípica observada más sobresaliente fue el homocigoto GG representado con letras en color rojo mientras que el homocigoto AA varía al igual que el heterocigoto AG 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.

El test de chi cuadrado, indicó que sólo la raza Pellibuey se encuentra en equilibrio Hardy Weinberg ($X^2_{obs}=4.015$), no hay diferencias significativas entre los valores esperados y observados, en cambio las razas Kathadin ($X^2_{obs}=31.51$), Dorper ($X^2_{obs}=4.015$) Black Belly, y sus cruzas, no se encuentran en equilibrio, probablemente porque existe una constatación de relación entre una población y otra.

Tabla 11. Frecuencias genotípicas y alélicas de muestras de ovino para la mutación G4 del gen GDF9 de acuerdo a su sexo.

	Hembras				Machos			
	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total
N ^a de individuos observados	0	66	134	200	0	1	25	26
Frecuencia genotípica observada	0	0.33	0.67	1	0	0.039	0.97	1
Frecuencia genotípica esperada $p^2+2pq+q^2$	0.02	0.28	0.70	1	0.0	0.03	0.96	1
N ^a de individuos esperados	5	55	140	200	0.0	1	25	26
Frecuencias alélicas	A		G		A		G	
	0.165		0.835		0.02		0.98	

Tabla 12. Frecuencias genotípicas y alélicas de muestras de ovino para la mutación G6 del gen GDF9 de acuerdo a su sexo.

	Hembras				Machos			
	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total
Nº de individuos observados	24	36	191	251	4	3	35	42
Frecuencia genotípica observada	0.09	0.15	0.76	1	0.1	0.07	0.83	1
Frecuencia genotípica esperada $p^2+2pq+q^2$	0.03	0.27	0.70	1	0.02	0.22	0.76	1
Nº de individuos esperados	7	70	174	251	0.72	9.20	32	42
Frecuencias alélicas	A		G		A		G	
	0.17		0.83		0.13		0.87	

El cálculo de la frecuencia genotípica observada y esperada evaluando a los ovinos de acuerdo a su sexo para la identificación de la mutación G4, fue de 0.67 para el genotipo GG y 0.33 para el genotipo AG, tal como se muestra en la tabla 11 en el caso de las hembras. Coincidentemente también los machos mostraron mayor dominancia para el genotipo GG, teniendo una frecuencia genotípica de 0.97. Por otra parte la mutación G6 (tabla 12) mostró una frecuencia de 0.76 para el genotipo GG en hembras y 0.83 en machos, lo que conlleva a decir que tanto el análisis a nivel población, a nivel de razas individuales y a nivel de sexo, coincide ser el alelo GG el más predominante sin embargo hay animales que destacan portando los genotipos AA y AG. Es preciso decir que el análisis que mejor representa el comportamiento evolutivo y permite analizar los cambios en el acervo genético pudiese ser el análisis que considera a todos los ovinos como una población puesto que hay relación entre razas.

Al concluir la identificación de los polimorfismos encontrados en la población ovina se mostraron mutaciones presentes en unos animales y ausentes en otros, sin embargo se observó que en algunos casos un mismo animal tuvo dos polimorfismos diferentes (Anexo 4).

En las figuras 31-34 se muestran los polimorfismos G2 y G4 ubicados en el eje “y” y “y secundario”, respectivamente, donde 1 significa presencia y 0 ausencia respecto a cada animal ubicándolo en el eje x de acuerdo a su raza: Kathadin, Pelibuey, Dorper, Black Belly y cruza, en los cuales se presentaron animales con combinaciones de alelos distintas. En la raza Kathadin se observó que la combinación más predominante en algunos animales fue el alelo GG del polimorfismo G2 junto con el alelo GG del polimorfismo G4 (43 %), indicado con el recuadro negro seguido de la combinación AG-GG (17 %), GG-AG (12 %), AG-AG (11 %), GG-AA (11 %) y por último AG-AA (6%). Aunado a esto también se observa que algunos animales sólo presentaron un polimorfismo.

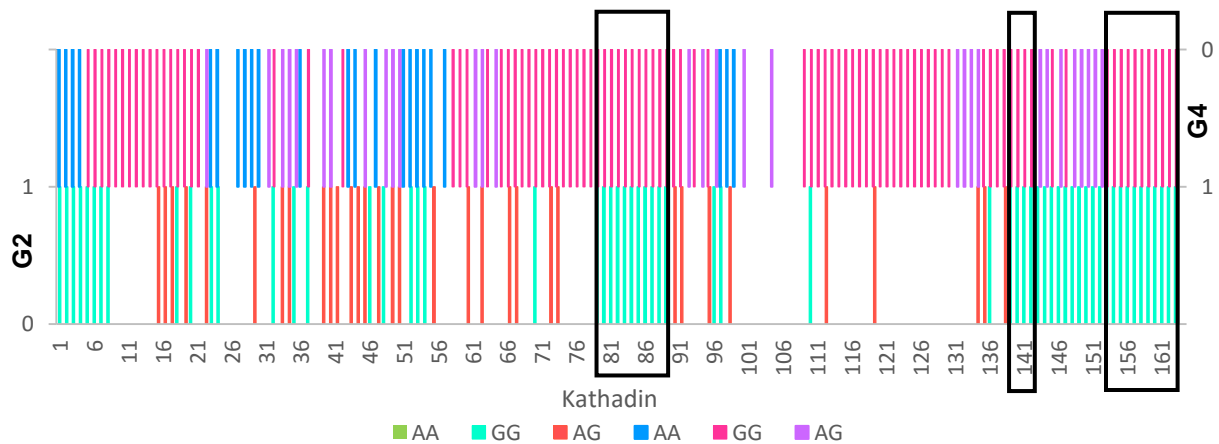


Figura 31. Combinaciones de los alelos AA, AG y GG de los polimorfismos G2 y G4 del gen GDF9 en la raza Kathadin.

En la raza Pelibuey se observó que la combinación más abundante en algunos animales fue el alelo GG del polimorfismo G2 junto con el alelo GG del polimorfismo G4 (44 %), indicado con el recuadro negro seguido de la combinación AG-GG (29 %), GG-AG (15 %), GG-AA (6 %), AG-AG (3 %), y por último AG-AA (3 %) como se observa en la figura 32.

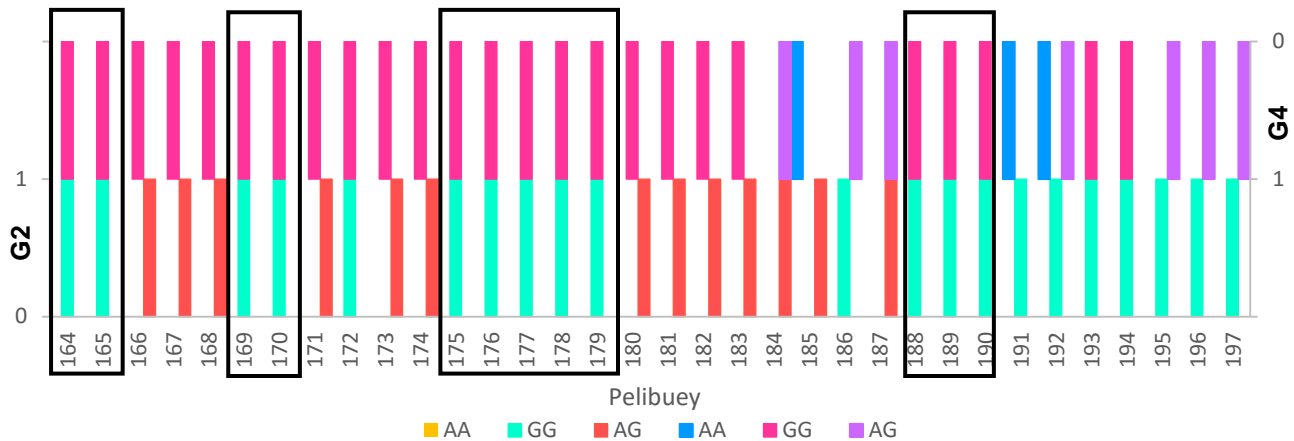


Figura 32. Combinaciones de los alelos AA, AG y GG de los polimorfismos G2 y G4 del gen GDF9 en la raza Pelibuey.

En la raza Dorper (figura 33) se observaron las combinaciones alélicas GG-GG (94 %), indicado con el recuadro negro, AG-GG (3 %) y AG-AA (3 %), siendo más abundante en algunos animales, el alelo GG del polimorfismo G2 junto con el alelo GG del polimorfismo G4. Mientras que en la raza Black Belly y cruza se observaron las combinaciones alélicas: GG-GG (81 %) y AG-GG (19 %) únicamente.

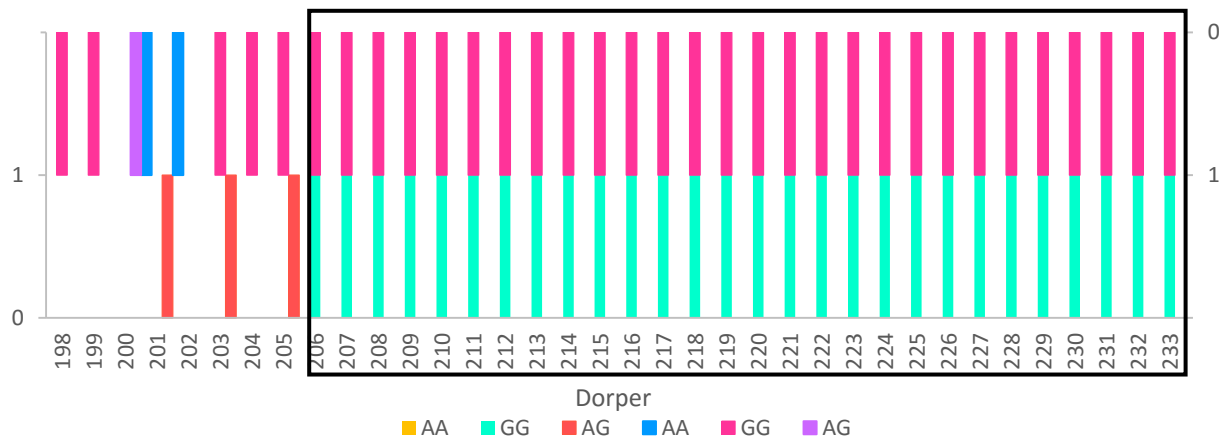


Figura 33. Combinaciones de los alelos AA, AG y GG de los polimorfismos G2 y G4 del gen GDF9 en la raza Dorper.

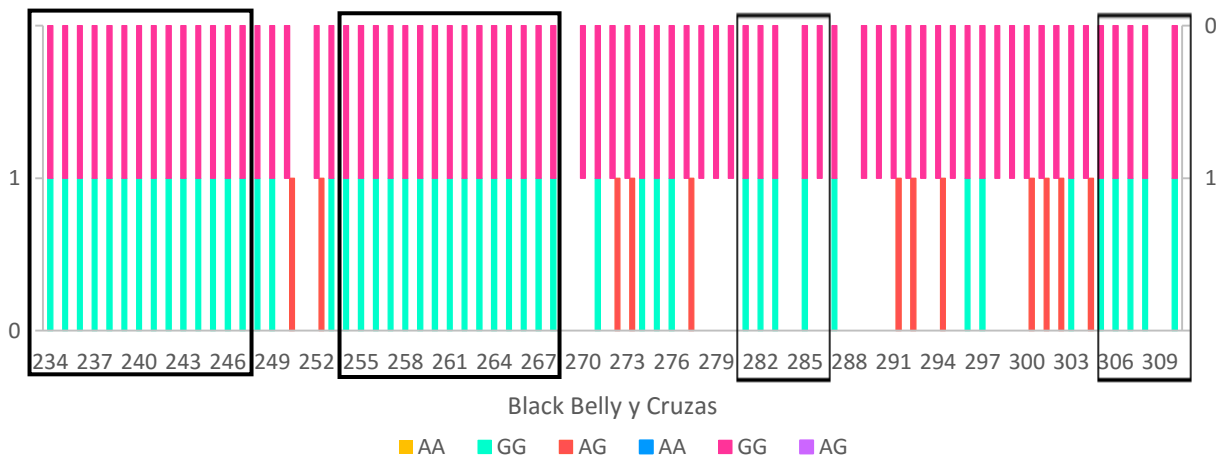


Figura 34. Combinaciones de los alelos AA, AG y GG de los polimorfismos G2 y G4 del gen GDF9 en la raza Black Belly y Cruzas.

A nivel de población, la combinación alélica más predominante fue GG-GG o también llamado alelo silvestre perteneciente a la oveja, seguida por la combinación AG-GG, GG-AG, GG-AA, AG-AG y por último AG-AA, como se observa en la tabla 13. En toda la población se observaron que las muestras de algunos animales sólo presentaron un polimorfismo de los dos analizados y encontrados, lo que sugiere pensar que existe otra variante alélica que interviene para que no se lleve a cabo la amplificación, es

importante mencionar que hubo muestras que se descartaron debido a que no cumplieron con la concentración requerida para llevar a cabo el análisis HRM.

Tabla 13. Combinaciones de los alelos AA, AG y GG de los polimorfismos G2 y G4 del gen GDF9 a nivel Población.

		Mutación G4		
		AA	AG	GG
Mutación G2	AA	0	0	0
	AG	8	11	38
	GG	12	16	131

9. DISCUSIÓN

En la especie ovina se han encontrado diversos polimorfismos relacionados con la prolificidad también conocidos como alelos Fec (Fecundidad), ubicados en el gen GDF9 (Hanrahan *et al.*, 2004). Estos se han asociado con el incremento de la tasa ovulatoria, aumento de la fertilidad y el tamaño de camada (Paz *et al.*, 2014) en distintas razas ovinas, tales como; ovejas Belclare, Cambridge, Santa Inés, Araucanos y Pellibuey (Chu *et al.*, 2011), 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). Se han identificado variantes involucradas con la tasa de ovulación mediante herramientas moleculares como PCR- RFLP y secuenciación directa sobre la región específica de ADN (Silva *et al.*, 2011).

En este estudio se identificaron las mutaciones G1, G4, G6 y G7 ubicadas en el gen GDF9 en ovinos de pelo: Kathadin, Pellibuey, Black Belly, Dorper y Cruzas mediante el análisis HRM basado en qPCR, método que no ha sido utilizado para la localización de estos genes, el cual demostró ser eficiente para la diferenciación de genotipos; tanto homocigotos como heterocigotos (Erali *et al.*, 2008) utilizando muestras y controles cuantificados en conjunto con el agente intercalante SYBR Green, fluoróforo que se ha puesto a prueba para genotipificación en otros estudios, donde se reporta que las curvas de fusión que se generan para detección de homocigotos y heterocigotos muestran espacios estrechos de amplicones de la Tm por lo que no se diferencia claramente mientras que utilizando LC Green o Eva Green, fluoróforos más saturantes, si se observan productos de ~44pb claramente separados (Wittwer *et al.*, 2003).

Por otra parte, otro estudio ha revelado que SYBR Green sólo se puede utilizar para HRM después de una modificación en el protocolo que indica el uso de tres oligonucleótidos que sean específicos para un alelo y lo reconozcan (Liew *et al.*, 2004). Otro método ha descrito la desnaturalización del ADN combinado con SYBR Green mediante qPCR que ofrece ser un proceso sencillo, rápido y barato para la detección de mutaciones (Kugelman *et al.*, 2009). Además de que otras publicaciones han demostrado que SYBR Green se puede utilizar con éxito para el análisis HRM usando un Rotor-Gene 6000 (Price *et al.*, 2007; Pomprasert *et al.*, 2008) a pesar de que SYBR Green ha sido clasificado como un agente intercalante con baja especificidad, porque puede unirse a productos inespecíficos y puede inhibirla reacción de PCR (Gudnason *et al.*, 2007).

En contraste con los estudios anteriores que utilizan el análisis HRM, podemos afirmar que en base a los resultados obtenidos, SYBR Green tiene potencial para ser utilizado en la detección de mutaciones, tomando en cuenta las condiciones establecidas en el presente estudio y el equipo específico para su realización. Cabe mencionar que en comparación con Eva Green, podemos pensar que las diferencias en la detección de los genotipos se deben al tamaño utilizado del amplicón puesto que se manejan normalmente tamaños pequeños, los cuales difieren de los controles utilizados para la identificación de los polimorfismos del gen GDF9.

En comparación con el ensayo RFLP, el análisis HRM muestra una gran ventaja, porque la reacción se realiza una sola vez en un tubo cerrado, lo cual disminuye riesgos de contaminación con respecto al RFLP, que es un método que requiere de varios pasos; amplificación por PCR, ensayo de restricción y preparación de geles para la observación de los productos obtenidos. Por tal motivo, podemos decir que el

análisis HRM es una herramienta de diagnóstico molecular con potencial que permite detectar mutaciones discrepando cambios significativos de fluorescencia con alta sensibilidad, especificidad y rapidez (<2.0 horas).

Por otro lado, en la identificación de mutaciones mediante el análisis HRM y verificado con la secuenciación de ADN y el ensayo de restricción, el polimorfismo G1 no se encontró en la población analizada de la región del Papaloapan, ni tampoco el G7, mientras que en otros estudios, estas mutaciones G1 y G7 localizadas en el gen GDF9 ya han sido identificadas y relacionadas con una alta fertilidad en ovejas Belclare y Cambridge (Hanrahan *et al.*, 2004) asimismo como en Araucanos que expresan la mutación G1 (Paz *et al.*, 2014), por lo que podemos sugerir que debido a que los ovinos mantuvieron las variantes silvestres, el factor involucrado que pudiera controlar estas variantes es la raza ovina, la alimentación y el ambiente en el que se desarrolla así como sus antecedentes reproductivos.

Respecto a los polimorfismos G4 y G6, se identificaron acertadamente, mostrando curvas claramente distantes para poder realizar la diferenciación de genotipos.

Los análisis estadísticos para la mutación G4 y G6 mostraron que la frecuencia del alelo GG, es decir; el alelo silvestre en la población ovina, es el más predominante y que el test de ji cuadrada (X^2) que mejor representa el comportamiento de las frecuencias genotípicas y alélicas es el análisis a nivel población porque estudiándolos por razas independientes, no es representativo debido a que hay una constante rotación entre razas en la región y estudiarlos por sexo resulta similar puesto que no se evalúa un número exacto de hembras igual a machos.

La presencia de la mutación G4 en la población fue polimórfica, presentando dos alelos AG y GG, mostrando la ausencia de homocigotos para el genotipo AA. Esta mutación consiste en la sustitución de ácido glutámico por lisina en la posición 241 de la proteína GDF9 tal como lo reporta Hanrahan *et al.* (2004), sustituyendo un grupo ácido por un grupo básico, justo antes del sitio de procesamiento de furina; enzima hidrolasa que cataliza la liberación de la proteína madura, lo que sugiere que es poco probable que afecte la región de codificación madura activa de la proteína, sin embargo, se ha considerado que las ovejas heterocigotas tienen indicios de una tasa de ovulación mayor (Filho *et al.*, 2002).

Además, la mutación G6, expreso los alelos: AA, AG y GG, mostrando mayor tendencia hacia el genotipo homocigoto GG. Cabe resaltar que el análisis HRM para la identificación de esta mutación mostró un comportamiento singular para el alelo AG, que se relacionó con el resultado obtenido en la secuencian de ADN, donde se observó la presencia de otro genotipo heterocigoto AG correspondiente a la mutación G5, que no era de interés en este estudio debido a que esta transición no afecta el cambio de aminoácidos y no se relaciona con un cambio en la función de la proteína.

La mutación G6 identificada en los ovinos de pelo de la región en comparación con lo reportado en el 2004 que muestra el genotipo homocigoto AA en ovejas Cambridge pero no en Belclare (Hanrahan *et al.*, 2004), apunta a que la raza es un factor importante en la incidencia de lo polimorfismos a nivel de epigenética.

La existencia de estas dos mutaciones (G4 y G6) del gen GDF9, un factor secretado por el ovocito también conocido como Fec^G uya función es controlar el crecimiento

folicular, en la población ovina de la región de Papaloapan en paralelo con Hanrahan *et al.* (2004), muestra que podrían ser un importante aporte como antecedente para posteriores estudios en otras razas acerca de las mutaciones del gen GDF9, los cuales han sido reportados como influyentes en la prolificidad de las ovejas.

Al finalizar la identificación y el análisis estadístico de los polimorfismos encontrados en la población ovina se observaron combinaciones de las mutaciones, es decir; se hallaron diferentes alelos en unos animales que en otros, sin embargo se observó que en algunos casos un mismo animal tuvo dos polimorfismos distintos con diferentes alelos o incluso con alelos iguales. Estas combinaciones pueden ser factores que determinen las características requeridas para una eficiencia máxima en la producción, por lo que sugerimos que aquellos animales que sean portadores de al menos un alelo heterocigoto, pudiesen ser prolíficos y de importancia para el ovinocultor, porque las hembras que tienen gemelos o partos múltiples aportan mayores beneficios económicos que las que sólo tienen un cordero con base a los antecedentes mencionados, así como también se deben tomar en cuenta las condiciones de pastoreo, que quizás se encuentren en desventaja respecto a otros.

Sin embargo queda pendiente un análisis que relacione el genotipo-fenotipo que demuestre la expresión de los genotipos identificados en el presente estudio así como también la elaboración de un pedigrí, puesto que los polimorfismos encontrados se hallaron en razas distintas a las que ya han sido evaluadas. Así como también se debe de tomar en cuenta que este carácter incluye la edad en que tuvo el primer parto, la regularidad de los partos y los partos múltiples, datos que no se obtuvieron en este análisis, por falta de registros por parte del productor.

10. CONCLUSIONES

El análisis HRM demostró ser eficiente para la correcta identificación de las mutaciones G1, G4, G6 y G7, utilizando el fluoróforo SYBR Green en muestras y controles cuantificados, quedando demostrado con el análisis de secuenciación de ADN.

Las mutaciones G1 y G7 no se encontraron localizadas en la población de la región del Papaloapan. Únicamente se hallaron las mutaciones G4 y G7 presentes en el exón dos del gen GDF9 en los ovinos de pelo; Kathadin, Pellibuey. Black Belly, Dorpe y Cruzas, donde el genotipo GG fue el más predominante.

Dichas mutaciones han sido asociadas al incremento de prolificidad en el caso de individuos heterocigotos. Lo que conlleva a decir que aunque sólo se hayan identificado dos de las cuatro mutaciones, la población de ovinos de la región del Papaloapan 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 dos generaciones que demuestren la herencia de la característica de los genes ligados al sexo

Sin embargo, se sugiere analizar más adelante la población de ovinos, tomando en cuenta un censo mayor de ovejas con tres o más registros de partos, debido a que el presente estudio reporta muchos animales con posible incidencia de un gen con efecto prolífico, sin embargo se desconoce el índice de heredabilidad así como también de expresión génica.

11. PERSPECTIVAS

Realizar una búsqueda de mutaciones en otros genes reportados con efecto en la prolificidad de los ovinos tal como; BMP15.

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 a futuro, centros de reproducción.

Confirmar el efecto de las mutaciones encontradas analizando la expresión a nivel genotipo-fenotipo, mediante el número de ovocitos encontrados en el líquido folicular.

12. REFERENCIAS

- Alba, J. D. (1964). Reproducción y genética animal: Selección de ovinos para la producción de carne. Turrialba: Editorial SIC.419-421
- Arteaga CJD, (2012). Mensaje institucional en el acto Inaugural del VII. Foro Ovino del Estado de México. INIFAP. ICAMEX.
- Bindon, B. M., Piper, L. R., & Hilliard, M. A. (1996). Reproductive physiology and endocrinology of prolific sheep. Prolific Sheep. Wallingford, UK: CAB International, 453-470.
- 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 PequeñosRumiantes* 7 (3): 38-45.
- Bradford, G. E. (1985). Selection for litter size. *Genetics of reproduction in sheep*, 3-18.
- 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.
- Carbajo A., Domínguez J., Boixo A., Chamorro C., Paz P., Olmedo J. (1995). Técnicas de aplicación en la inseminación artificial ovina. *Ovis* 36: 63-81
- Chu, M. X., Yang, J., Feng, T., Cao, G. L., Fang, L., Di, R., Li, N. (2011). GDF9 as a candidate gene for prolificacy of Small Tail Han sheep. *Molecular biology reports*, 38(8), 5199-5204.
- Davis, G. H. (2005). Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics Selection Evolution*, 37(1), S11.

- 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.
- De La Cruz MJA. (2010). Uso de sementales de razas lanadas en cruzamientos para la producción de carne. *Revista Borrego*, 62:36-40
- 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.
- Erickson, G. F., & Shimasaki, S. (2000). The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 11(5), 193-198.
- 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, August). 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).
- 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.

- 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., 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.
- Gudnason, H., Dufva, M., Bang, D. D., & Wolff, A. (2007). Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic acids research*, 35(19), e127.
- 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.
- Herschhorn, A., & Hizi, A. (2010). Retroviral reverse transcriptases. *Cellular and molecular life sciences*, 67(16), 2717-2747.
- Kugelman, G., Tapsall, J. W., Goire, N., Syrmis, M. W., Limnios, A., Lambert, S. B., ... & Whiley, D. M. (2009). Simple, rapid, and inexpensive detection of *Neisseria gonorrhoeae* resistance mechanisms using heat-denatured isolates and SYBR green-based real-time PCR. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(10), 4211-4216.
- 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.
- Liew, M., Pryor, R., Palais, R., Meadows, C., Erali, M., Lyon, E., & Wittwer, C. (2004). Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clinical chemistry*, 50(7), 1156-1164.
- 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.
- Lopez A., Cocero M., Picazo R., Barragan M. (1991). Rendimientos de la técnica de obtención y transferencia de embriones en ovinos. *ITEA Vol11 (1): 64-66*
- 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. (2012). Genetics of mammalian reproduction: modeling the end of the germline. *Annual review of physiology*, 74, 503-528.
- Matzuk, M. M., Kumar, T. R., Shou, W., Coerver, K. A., Lau, A. L., Behringer, R. R., & Finegold, M. J. (1995). Transgenic models to study the roles of inhibins and activins in reproduction, oncogenesis, and development. *Recent progress in hormone research*, 51, 123-54.
- 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.
- Montgomery, G. W., Lord, E. A., Penty, J. M., Dodds, K. G., Broad, T. E., Cambridge, L., Crawford, A. M. (1994). The Booroola fecundity (FecB) gene maps to sheep chromosome 6. *Genomics*, 22(1), 148-153.

- Mulsant, P., Lecerf, F., Fabre, S., Schibler, L., Monget, P., Lanneluc, I., Crihiu, 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.
- 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 8 in mothers of dizygotic twins. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(11), 4713-4716.
- 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.
- Persing, D. H. (1993). Diagnostic molecular microbiology current challenges and future directions. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 16(2), 159-163.
- 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).
- Pornprasert, S., Phusua, A., Suanta, S., Saetung, R., & Sanguansermisri, T. (2008). Detection of alpha-thalassemia-1 Southeast Asian type using real-time gap-PCR with SYBR Green1 and high resolution melting analysis. *European journal of haematology*, 80(6), 510-514.
- Price, E. P., Smith, H., Huygens, F., & Giffard, P. M. (2007). High-resolution DNA melt curve analysis of the clustered, regularly interspaced short-palindromic-repeat locus of *Campylobacter jejuni*. *Applied and environmental microbiology*, 73(10), 3431-3436.
- Reed, G. H., Kent, J. O., & Wittwer, C. T. (2007). High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics.

- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3(6), 1101-1108.
- Silva, B. D. M., Castro, E. A., Souza, C. J. H., Paiva, S. R., Sartori, R., Franco, M. M., Melo, E. 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.
- Souza, C.J., I.C.Macdougal, B.K. Campbell, A.S. Mcneilly y D.T. Baird. (2001).TheBooroola (fecb) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. *J. Endocrinol.*169: R1–R6.
- Timothy C., Sinclair J. (1998). *Biología Molecular en Medicina*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- 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).
- Wilhelm, J., & Pingoud, A. (2003). Real-time polymerase chain reaction.*ChemBiochem*, 4(11), 1120-1128.
- Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem*. 2003 49 (6 Pt 1): 853-60.




13. ANEXOS

ANEXOS 1. SECUENCIA DEL GEN GDF9 (AF078545.2)

> |AF078545.2| Ovis aries growth differentiation factor-9 gene

GGA TCCCCTCAGTCTTCTCCTCGGTTCCCGGCTTTCGTTCGGAGCCTCAGGAAGCGGCCGAAATCGGACG
GACTAAGAGTAGAAGAGCGAGGGGCCTGTCAACCTCCAGAGCTGCCCTAGGGTCGGGTGTCTTGGCGCG
GTGGAAAGGGTCTTTGAGGCCGCCGCTGGCAGTCAACGCGAGATTTTGTACTGTCATGTCCAGTAAGC
TGGAACCGGAATCGGCTATGGTCAGGCCCTCAGCGACCGCAAGACCCGAATCAGGGACACGGATCTGAG
ACTTCTCTTGTTCGGCCACCGGATTAGAATCCACTGGCAGGGTGTAGACTTTCCAAGAGATAATAAAAA
TGTTTCCATTTAGCCACAAGAGTCCTTAGGTAATAGTACAGCAAGTGATGAGCAGCTGTTAGTGATTGT
AGGAGGGAAGAGGCAACCTCCGTCGCAGCCGGCTTCTCCCTCACAGAGTTCTGCCTGGGGCCGAATGTC
ATGTTGCCACTGTTCACTGCCAGGAGGAAGGCAGGAACGTTGCGTGTGAGGCGATTCCATTTTCGGA
AAGTGCTTTCTTCTTAAGGATACTGCTGTCTGTACAGCTGACTGACTTTTCCACTTGATGCAACGTGT
CTGTAAATGTTTTTTTCATGGAATTGCTGGCCATGTGTAATCTAGGACTAAGTTTTTCATTCAGCAGTTT
GGGTGTGTTTTATAACCCTCCTTGGCAGATCCGAGCCAGGGAGGCTTGGCAGACAATGAACTTAAATT
TACCAGTATACCTCGGTTTTATCAGCCTGGGTACTGCACAGACTGGTTCTGTATCACGGTAAGTATATT
CAGCTCTTCTTAGTGTACCCATGTCTCATTTATCTGAAACATAATCTTTAACCTGATCTTAGCTCAGAG
GCAAGAACATAAACTTATAACAGGTAAGAACAAAAATACCTAGCAAATTTCCCACCATTTGAGTGAT
TAATAAAAAGCAAACCTTTTCAATTTATTTTCTAGTACCTGAAAACGTCTTTAAACCTTTCAATTAAGTA
TGCATAGATGAATGAGCAGACCCAAATAAAGGCACCAAGGTATTATACTTTAAAGTGAGTCAAGATTAA
ATGTGATGTCTCTTTTTTAAAGCATATTGCAGTATTCCAAGTACATATCCTTAAAAGGCTGCGGAGAAC
TAGGCAAAATAGCAGTTCTCTGCTCTCTGGAATCTCAATTTTCAAGTTGTGAATTTCTCTCACCTCCAAA
TCAACATGCAGTAAATAAATATTCTAAGCACCTGGAAGTGGGAGAAGTGGTACAGATCCAGGGAGAAGA
GTAAACCCAATACCATAAGTTGCATACAAACAGATCTGGGTATCATCATGAATCATTAGCTTTTCCCA
TGCCTTCGAAGTTTTCAGCAAGCATCTAGGGAACATTTTAAAAATCCTAATCTCTCAAGAAATCGGCC
GCTTTTTTTTTTAAAGATCACTCCTTGTAGCCTTTCAGCTACATAGCTAGTCCATTAAGTTAAGAGATT
TTAAATAAATGCCAGGGGAAAGGAAAAGGAAAACCTATATGGCCAAGTAAATCTGAATCTAATTAGGACA
AACTGAATGAATAGGGTGTGTCAGCTGATAAAAATTATCCACAGCTAAGCATCCTTAAGGTCTGATTA
CAGAATTGAACCTAGCCCACCCACACCTAAAAGTTTATTTAAGAGACCAACCGAGGCTCTTCCCTGGTT
TTTAGGAAGAAGACTGGTATGGGAAATGTGTTTCTTGCTAATTTCTTCCAAAGCCATGGCCTTCCCAAC
AAATTTCTTCTTTGGTTTTGCTGCTTTGCCTGGCTCTGTTTTCTTATTAGCCTTGATTCTCTGCCTTCT
AGGGGAGAAGCTCAGATTGTAGCTAGGACTGCGTTGGAATCTGAGGCTGAGACTTGGTCTTGTGTAAC
CATTTAGGTGGGAGACACAGACCTGGTCTCCTTTCCCCTCTCTTAGAGGTTCTGTATGATGGGCACGGG
GAACCCCCAGGCTGCAGCCAGATGACAGAGCTTTGCGCTACATGAAGAGGCTCTATAAGGCATACGCT
ACCAAGGAGGGGACCCTAAATCCAACAGACGCCACCTCTACAACACTGTTTCGGCTCTTACCCCTGT
GCTCAGCACAAGCAGGCTCCTGGGACCTGGCGGCAGGTGTTGTTAGGAGCAGATTGGTTAATGGGTGGAG
GGAAGAAGAAAGACCTTTTTGCATTTTCAAGTTACATAAAGGAGTTGGCCCTGCTCCTTGACTTGCATTTT
ACTTTGCATGGTACTCAATATCCAACAAACCTGGTGCTTGTATCTTACTTACTGTTTATTCTAATGGC
CTCATGGGTTGATGTAGGCTAAATCTCTTGTAGAAAGAGATTTAATGGCCTTAAAACCTGGGAAGAGTG
CTGCTGGAGGTTAGCATCTTGTCCAGGGTCAAAAATCAAGACTGTAAAAAAGGTATTTTACTTTCGT
TGCATATTCTTTCTAGTCTACCAATGTTGGCCTGGACATGAACCTACAGTACCTCTTTCAGCTGTTAGT
GTGCTTTAGTAAACAGGATGTTTTCCCCACGTTTGTGCTTTCTGTGAGAGGAAAACCTGAAGTCTTAT
GTGGAACAGTAGATCACCCCTACAAGGACAATGTGTTAATCAACAATCTTGTGTGTGTGAGAGAGATGGG
AGCAGTGCTATTTAAAAAAGAAAAAAGTATATTCAATTAGCTCGTGACTTACAGAAAACCTTCTAA
CCCAGCAGGTCATTTGTGGCTATCTTAAACCTTTCTCCTTCTTGGACGTCTGTTTTGTTACAGTGCG

TTTAGAGCTTCCATTTGTTGTCAGTCTCAAGTGTTCCAAATTAAGTCTAGAGAAGTACTTTTTCTTTATT
GATTCTGCCGGTAAGAAGTCTAGAAATGTTTTCTTAACAAGCCTGGCAAGTGTCTTTTGATAGTTTTCCCTC
TTAAAGACTTTCCAAGAGAAAAATACTGCTTTCCTTTTTAGCTTCTCTTTGTTTGCAGCAACTTAATA
AGATTCTAAAAGTCTCAAAATATAATGATTCCCTCTTTTAATTTCCCCACCAAAGCTATTCTGAATTTCTG
GTGATCCAGCAGTAAGTGTCTGGGACTTAGATGTGGTACAGATAACTTGTCTTTTCTTTATAACCCCTAT
CCCACCCTGACGTTTAAGGCTTGAGAATGTGGGGAGAAAAGGGACAGAAGCACATTCTGAGGTACTGAT
TCCTTGATTTGACTTCCTGTTACATATGGCATTACTGTTGGATTGTTTTTCTTC**TCA****GG****ACCTTTCCA**
TCAGTGGATCTGCTGTTTAACCTGGATCGTGTTACTGTTGTGGAACATTTATTCAAGTCAGTCTTGCTG
TATACTTTCAACAACCTCATTCTTTTCCCTTTCCTGTTAAATGTATATGCAACCTGGTGATAAAAAGAG
CCAGAGTTTTCTAGCAAGACTCTCCCTAGAGCTCCATACTCATTTACCTATAACTCACAGTTTGAATTT
AGAAAGAAATACAAATGGATGGAGATTGATGTGACGGCTCCTCTTGAGCCTCTGGTGGCCTCCCACAAG
AGGAATATTCACATGTCTGTAAATTTTACATGTGCG**G****AAGACCAGCTGCAGCATCCTTCAGCGCGGGAC**
AGCCTGTTTAACATGACTCTTCTCGTAGCGCCCTCACTGCTTTTGTATCTGAACGACACAAGTGCTCAG
GCTTTTCACAGGTGGCATTCCCTCCACCCTAAAAGGAAGCCTTCACAGGGTCTGACCAGAAGAGAGGG
CTATCTGCCTACCCCGTGGGAGAGAAGCTGCTGAGGGTGTAAAGATCGTCCCGTCACCCGACAGAGACCAG
GAGAGTGCCAGCTCTGAATTTGAAGAAGCCTCTG**GT****TCCAGCTTCAGTCAATCTGAGTGAATACTTCAA**
CAGTTTCTTTTTCCCCAGAATGAATGTGAGCTCCATGACTTTAGACTTAGCTTTAGTCAGCTGAAGTGG
GACAACCTGGATT**GT****G****CCCCACACAAATACAACCCTCGATACTGTAAAGGGGACTGTCCCAGGGCGGTC**
GGACATCGGTATGGCTCTCCGGTTCACACCATGGTGCAGAACATCATCCATGAGAACTTGACTCCTCA
GTGCCAAGACCATCCTGTGTACCTGCCAAGTATAGCCCTTTGAGTGTTTTGGCCATCGAGCCTGATGGC
TCAATCGCTTATAAAGAATATGAAGATATGATAGCCACTAAGTGTACCTGT**CGT****CA****CAG****ACTCCTGTC**
AAGTAAAACCATGAGTGTCTGGCCAGTGTAAATGCCGCGCCCTGTCTATGCCTTTGGGAGGAAGTTT
CATGTGTCAAATCTCTGACTGTACGACACTGTGTGTTGTGTAAGGAGGAGCCTGTATAGATTAGCATAT
TCTGTGGCATCTATCAATGTAAGGATAACAGCTGCCTTCCCTCATGGCCAAATGTTTAAATGAAATGTA
TTTTTTTTGGAGAACTTTGAATTTTTTCCCAAGTGATTCTTTTTTCCCTTTTTGTAGGAGTCTTCTTTTT
GATGTAAGAAAATTTAAAACTTAATTAGCATAAATCTTGAGTGGAAATTGCAGTTCTAGACAATTCAGA
GTGCTATAGTCTTATTTAATGGAGGAATAAATTCCTGTGAGTGGCATAAATTTCTGTGTGCGGTTTTTA
ATTGAAGATTTGCTTTTAAATGGTTATTTGAGAGGGAGAGGAAGTGTGTCTAAAAGCTAGTCTTTACTC
AATTTACTATCCCTTTTTTCAGAGTTAGAGAGACTAACTCTCTACCTAAATTAGACTAGAGAGTATACAA
TATATTGGGCTTCCCTGGTGGCTCAGTGGTAAAGAATCTGCCTGCCAATGCAGTAGATGTAGGTTCAAC
CACTGGAGAAGGAGATGGCAACCCATCTAGTGTCTTACCTGGCAAACCCACGCACCCGAGAAAACCTG
GCAGGCTGTATAGTCCATGGGGTCACAAAAGAGTCAGGCACGACTTAGCAACTAAACAACATACACTAT
AACCCATTTCTGTTGTGTTAGTGATTGGTACTAACTCTGCACCTTAGATGGCTTTATTTAAAGGAAACA
GCCTTGCAAATTTTCCAAGAAAATGCAGATTTAAGATTTTTTAAAACACGTTTTATCCTTTGTATATT
TAAAACCTCTGAACCTTTGGAAGGCGGTCAAGAAGCGTTTTTTGTTTTTTTTTTTTTCTTTGGTTTTGCT
GCTTCCCTCAGCTCCCATCACTCCACCCTGCAGGTTTTTTCCAGGTGAATTTAGCACTGTTAGCACT
AAACTAAGCTGACAGTCACTAGGTTATATTACAGAGCAGGCTTGTGGATATGAGGGCTTTTATGTG
GGTTTTCAGTAAATCTACCTTGGAGGAAGACCTGGAGATGGGGAGTTCAGGGCTGAGCAGTGATTTCTGT
TTCAGAGTTTATAAAACCCCTCATCTACAAATCAAAGTACCTCCAAGATGCAAGTAAATGATCTTTGCT
TGGTGCCTAGTGTCTAAGAAAGTCAGCTGGGATTTTGATAGAGATTGTGTTGAATCTGTAGATTAGTTT
GGGTGTATTGCCATCTTAACATCAAGACTTCCAATCCATGGGTGTGGTGGAT**TCC**

 Inicio y termino de un intrón  Inicio y termino del exón  Inicio y termino del exón
Los triplete marcados en color rosa son posibles sitios de las mutaciones G1, G4, G6 y G7.

ANEXO 2. Codificación en AA del gen GDF9

GGATCCCCTCAGTCTTCTCCTCGGTTCCCGGCTTTCGTCGGAGCCTCAGGAAGCGGCCGAAATCGGACGGACTAAGAGTAGAAGAGCGAG
GGGCTGTCAACCTCCAGAGCTGCCTAGGGTCCGGTGTCTTGGCCGGTGGAAAGGGTCTTTGAGGCCGCGGCTGGCAGTCAACCGGA
GATTTTGTACTGTCTATGTCCAGTAAGCTGGAACCGGAATCGGCTATGGTCAGGCCCTCAGCGACCGCAAGACCCGAATCAGGGACCGGA
TCTGAGACTTCTCTTGTTCGGCCACCGGATTAGAATCCACTGGCAGGGTGTAGACTTTCCCAAGAGATAATAAAAAATGTTTCCATTTAGCC
ACAAGAGTCTTAGGTAATAGTACAGCAAGTGTAGCAGCTGTTAGTGTAGTAGGAGGGAAGAGGCAACCTCCGTCGCAGCCGGCTTC
TCCCTCACAGAGTCTGCCTGGGCGCAATGTCTATGTTGCCACTGTTCACTGCCAGGAGGAAGGCAGGAACGTTGCGTGTGAGGCGAT
TCCATTTTCGAAAGTGTCTTCTTAAAGGATACTGTCTGTACAGCTGACTGACTTTTCCACTGTATGCAACGTTGTCTGTAATG
TTTTTTTCATGGAATGTCTGGCCATGTGTAATCTAGGACTAACGTTTTCATTCAGCAGTTTGGGTGTGTTTATAACCCCTCCCTGGCAGAT
CCGAGCCAGGGAGGCTTGGCAGACAATGAACTTAAAAATACCAGTATACCTCGGTTTTATCAGCCTGGGTACTGCACAGACTGGTCTG
TATCAGGTAAGTATATTAGCTTCTTAGTGTACCCATGTCTCATTATCTGAAACATAATCTTAACTGATCTTAGCTCAGAGGCA
AGAACATAAATACTTATACAGGTAAGAACAAAAATACCTAGCAAAATCTCCACCATTGAGTGATTAATAAAAAAGCAACCTTTCATTT
ATTTCTAGTACCTGAAACGCTTTAAACCTTCAATTAAGATGATGCAATGATGAGCAGCCAAATAAAGGCACCAAGGTATTA
TACTTTAAAGTGTGATGATTAATGTGATGCTCTCTTTTAAAGCATATTGCAGTATTCGAATGATATCTTAAAGGCTGCGAG
AATAGGCAAAATAGCAGTCTCTGCTCTCTGGAATCTCAATTCAGTGTGAAATTTCTCTCACCTCCAATCAACATGCAGTAATAA
ATATTTAAGCACTGGAAGTGGGAGAAGTGGTACAGATCCAGGGAGAAGAGTAAACCAATACCATAAGTTGCATACAAACAGATCTGG
GTATCATCAATGATGATGTTTCCCATGCCTTCAAGTTTTCAGCAAGCATCTAGGAACATTTAAAAATCTTAATCTCTCTCAAG
AAATCGGCGCTTTTTTTTTTAAAGATCACTCCTTGTAGCCTTTCAGCTACATAGTACATTAAGTAAAGGATTTTAAATAAATGC
CAGGGAAAGGAAAGGAAACTATATGGCCAAGTAAATCTGAATCTAATTAGGACAACTGAATGAATAGGGTGTGTGACGTGATAAA
AATATCCACAGCTAAGCATCTTAAGTCTGATTACA**GAAATGAACCTAGCCACCCAC**ACACCTAAAGTTTTAAAGAGCAACCG
AGGCTCTTCTGGTTTTTAGGAAGAAGACTGGTATGGGAAATGTGTTCTTGCTAATTTCCAAGCCATG**CGCTTCCCAACAATTC**
M A L P N K F
TTCCTTTGGTTTTGCTGCTTTCCTGGCTGTGTTTTCTATTAGCCTTGATTCTCTGCCTTCTAGGGGAGAAGCTCAGATTGTAGCTAGG
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
ACTGCGTTGGAATCTGAGGCTGAGACTTGGTCTTGTCTGAACATTTAGTGGGAGACACAGACTGGTCTCCTTTCCCTCTCTTAGAG
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
GTTCTGTATGATGGCCAGGGGAACCCCGAGGCTGCAGCCAGATGACAGAGCTTT**GCCT**TACATGAAGAGGCTCTATAAGGCATACGCT
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
ACCAAGGAGGGGACCCCTAAATCCAACAGACGCCACCTTACAACACTGTTCCGCTCTCACCCCTGTCTAGCAGCAGCAAGCAGCTCCT
T K 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
GGGACCTGGCGCAGGTGTGTAGGAGCAGATTGGTAAATGGGTGGAGGGAAGAAAGACCTTTTTGCATTTCACTTACATAAAGGAG
G D L A A
TTGGCCCTGCTCCTGACTTGCATTTTACTTTGCATGGTACTCAATATCCAAACAAACCTGGTGTGATCTTACTTACTGTTTATTCCT
AATG**GCCTCATGGGTTGATGTAGGCT**AAATCTCTTGTCTAGAAGAGATTTAATGGCCTTAAACCTGGGAAGAGTGTCTGGAGGTTAGC
ATCTTGTCCAGGGTACAAAATCAAGACTGTAAAAAAGGTATTTGACTTCGTTGCATATTCTTTCTAGTCTACCAATGTTGGCCTGGA
CATGAACCTACAGTACCTCTTTCAGCTGTTAGTGTGCTTTAGTAAACAGGATGTTTTCCACGTTTGTGCTTTCTGTGAGAGGAAAC
TGAAGTCCCTATGTGGAACAGTATGATCACCCCTACAAGGACAATGTGTTAATCAACAATCTTGTGTGTGTGAGAGAGATGGGAGCAGTGT
ATTTAAAAAGAAAAAAGTATATTCATTAGCTCGTACTTACAGAAAACCTTCTAACCCAGCAGGTCATTTGTGGCTATCTTAAAC
CCTTCTCCTTCTTACAGTCTGTTTTGTTACAGTGCCTTTAGAGCTTCCATTTGTTGTGCTCAAGTGTCCAAATTAAGCTTAGAG
AAGTACTTTTTCTTTATTGATTCGCCGTAAGAACTTAGAATGTTTTCTTAAACAGCCTGGCAAGTGTCTTTTGATAGTTTTCTCTTA
AAGACTTTCCAAGAGAAAATACGTCTTCTTTTAGCTTCTCTTTGTTGCGCAACTTAATAAGATTCTAAAACCTCAAATATAA
TGATTTCCCTTTTAAATCCCAACAAAGCTATCTGAATTTCTGGTGTATCCAGCAGTAAAGTGTGGGACTTAGATGTGGTACAGATAAC
TTGCTTTTCTTTTAAACCCCTTACCCACCTGACGTTTAAAGCTTGAAGATTTGGGGAGAAAAGGACAGAAAGCATTCTGAGGTACT
GATTCCTTGATTGACTTCTGTTACATATGGCATTACTGTTGGATTGTTTTCTTCTCAGGAACCTTCCATCAGTGGATCTGCTGTTT
G T F P S V D L L F
AACCTGGATCGTGTACTGTTGTGGAACATTTATTCAAGTCACTTGTGCTGTATACTTCAACAACTCCATTTCTTTCCCTTCTCTGTT
N L D R V T V V E H L F K S V L L Y T F N N S I S F P F P V
AAATGTATATGCAACCTGGTGATAAAAGAGCCAGAGTTTCTAGCAAGACTCTCCCTAGAGCTCCATACTCATTTACCTATAACTCACAG
K C I C N L V I K E P E F T S A K T L P R A P Y S F T Y N S Q
TTTTGAATTTAGAAAGAAATACAATGGATGGAGATTGATGTAGCGGCTCTCTTGGAGCCTCTGGTGGCCTCCCACAAGAGGAATATTAC
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
ATGCTGTAAATTTTACATGTGCGGAGAGACCAGCTGCAGCATCTTCAGCGCGGACAGCCTGTTAACATGACTCTTCTCGTAGCGCC
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
TCACTGCTTTGTATCTGAACGACACAAGTGTCTCAGGCTTTTACAGGTGGCATTCCCTCCACCTAAAAGGAAGCCTTACAGGGTCTCT
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 G Q G P
GACCAGAAGAGGGCTACTGCTACCCCGTGGGAGAAGAAGCTGCTGAGGGTGAAGATCGTCCCGTCCAGCAGACGACGAGCAGGAGT
D Q K R G L S A Y P V G E E A A E G V R S S R H R R D Q E S
GCCAGCTCTGA**AT**TGAAGAAGCCTCTGGTCCAGCTTCACTCAATCTGAGTGAATACTTCAAACAGTTTCTTTTTCCCAAGATGAATGT
A S S E L K K P L V P A S V N L S E Y F K Q F L F P Q N E C
GAGTCCATGACTTTAGACTTAGCTTTAGTCACTGAGTGGGACAACGGATT**G**TGGCCCAACAAATACAACTCCGATAGTGTAAA
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
GGGACTTCCAGGGCGGTGACATCGGTATGGCTCTCCGGTTCACACCATGGTGCAGAACATCATCATGAGAACTTGACTDCTA
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 C D S S
GTGCCAAGACCATCTGTGTACCTGCCAAGTATAGCCCTTTAGTGTGTTTTGGCCATCGAGCCTGATGGCTCAATCGCTTATAAAGAAAT
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
CCTGTCTATGCCTTTGGGAGGAAGTTTCATGTGTCAAATCTCTGACTGTACGACTGTGTGTGTGTGTAAGGAGGAGCCTGTATAGATTA
GCATATTCTGTGGCATCTATCAATGTAAGGGATAACAGCTGCCTTCCTCATGGCCAAATGTTTAAATGAAATGTATTTCTTTTGGAGAAC
TTTGAATTTTTTCCCAAGTATTCTTTTTTCTTTTTGTAGGAGTCTTCTTTTTGATGTAAGAAAATTTAAAACTTAATTAGCATAAAT
CTTGAGTGAATTCAGTCTAGACAATCAGAGTGTATAGTCTTATTTAATGGAGGAATAAATTCCTGTGAGTGGCATAAATTTCTG
TGTGCGGTTTTAATTGAAGATTTGCTTTTAAATGGTTATTTGAGAGGGAGAGGAAGTGTGTCTAAAAGCTAGTCTTTACTCAATTTACTA
TCCCTTTTTCAGAGTTAGAGAGACTAACTCTCTACCTAAATTAGACTAGAGAGTATACAATATATTGGGCTTCCCTGGTGGCTCAGTGGT
AAAGAATCTGCCTGCCAATGCAGTAGATGTAGGTTCAACCACTGGAGAAGGAGATGGCAACCCATCTAGTGTCTTACCTGGCAAACCCC
ACGCACCGAGAAAACCTGGCAGGCTGTATAGTCCATGGGGTCACAAAAGAGTCAGGCACGACTTAGCACTAAACAACATACACTATAAC
CCATTTCTGTGTGTAGTGTAGTGGTACTAACTCTGCACCTTAGATGGCTTTATTTAAAGGAAACAGCCTTGCAAATTTTCCCAAGAAAT
TGCAGATTTAAGATTTTTTAAAAACAGTTTTATCCTTTGTATATTTAAACTCTGAACCTTTGGAAGGCGGTCAAGAAGCGTTTTTGT
TTTTTTTTTCTTTGGTTTTGCTGCTTTCCCTCAGCTCCCATCACTCCACCCCTGCAGGTTTTTTCCAGGTGAATTTAGCACTGTTAGC
ACTAAACTAAGCTGACAGTCACTAGGTTATATTACAGAGCAGGCTTGTGGATATGAGGGCTTTTATGTGGGTTTTTCAAGTAAATCTAC
CTTGAGGAAGACCTGGAGATGGGAGTTTCAAGGCTGAGCAGTGATTTCTGTTTCAGAGTTTATAAAACCCTCATCTACAAATCAAAGTA
CCTCCAAGATGCAAGTAAATGATCTTTGCTTGGTGCCTAGTGTCTAAGAAAGTCAGCTGGGATTTTGATAGAGATTGTGTTGAATCTGTA
GATTAGTTTGGGGTGTATTGCCATCTTAACATCAAGACTTCCAATCCATGGGTGTGGTGGATCC

GDF9 1F (GAATTGAACCTAGCCCACCCAC) y GDF9 1R (AGCCTACATCAACCCATGAGGC)

GDF9 2BF (AGATTGATGTGACGGCTCCT) y GDF9 2BR (CTCCCAAAGGCATAGACAGG)

GCGC>>>Sitio de restricción de la enzima *HhaI*

Las bases en color verde son los sitios en donde hay posibles mutaciones (G1, G4, G6 Y G7).

ANEXO 3. Verificación del ADN genómico en ovinos

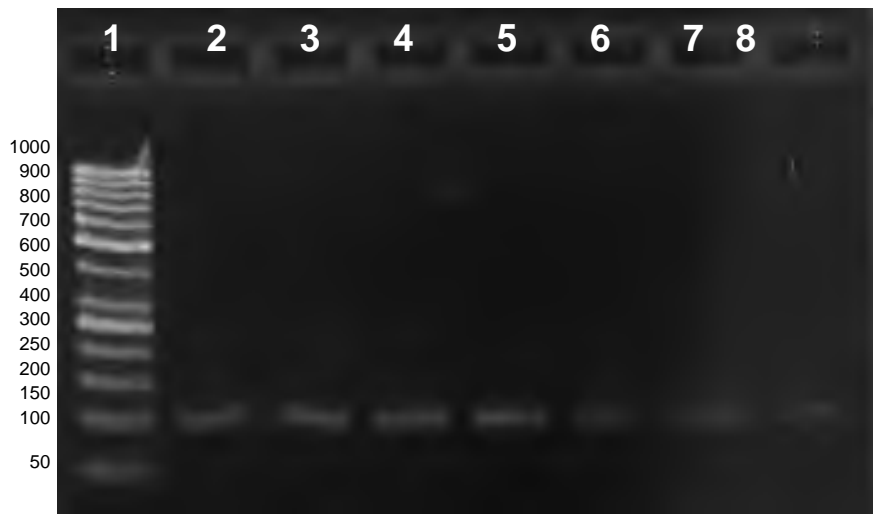


Figura 31. Verificación de los productos de qPCR en gel de agarosa al 3% para la mutación G1 (R87H) con un tamaño de 94bp. Carril 1: Marcador de peso. Carril 2-4: Controles sintéticos. Carril 5-8: Muestras de ovino

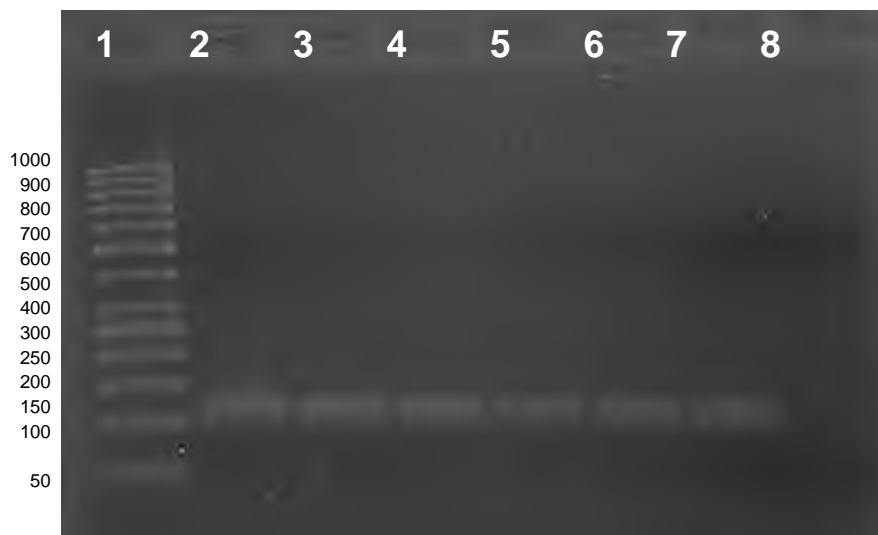


Figura 32. Verificación de los productos de qPCR en gel de agarosa al 3% para la mutación G4 (E241K) con un tamaño de 97bp. Carril 1: Marcador de peso. Carril 2-4: Controles sintéticos. Carril 5-7: Muestras de ovino. Carril 8: Control Negativo.

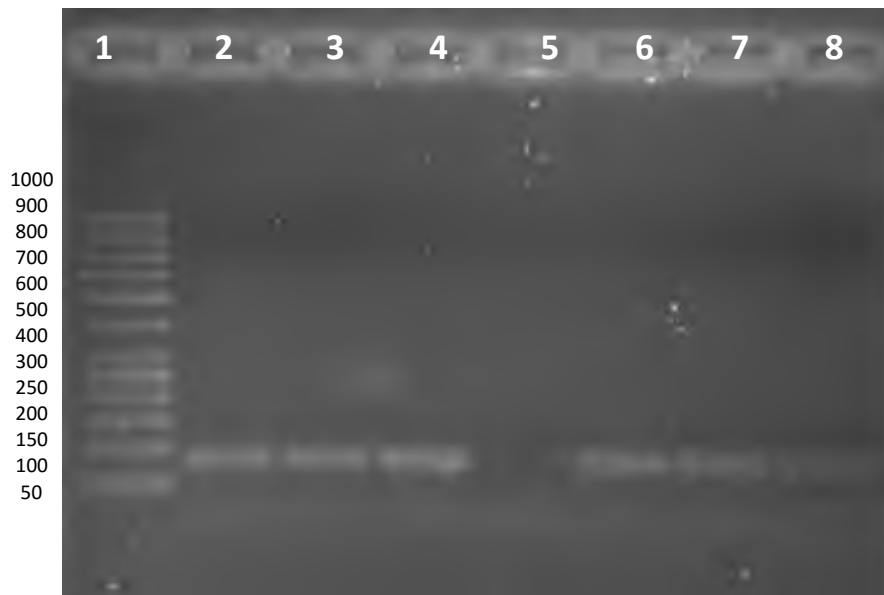


Figura 33. Verificación de los productos de qPCR en gel de agarosa al 3% para la mutación G6 (V332I) con un tamaño de 96bp. Carril 1: Marcador de peso. Carril 2-4: Controles sintéticos. Carril 5: Control Negativo. Carril 6-8: Muestras de ovino.

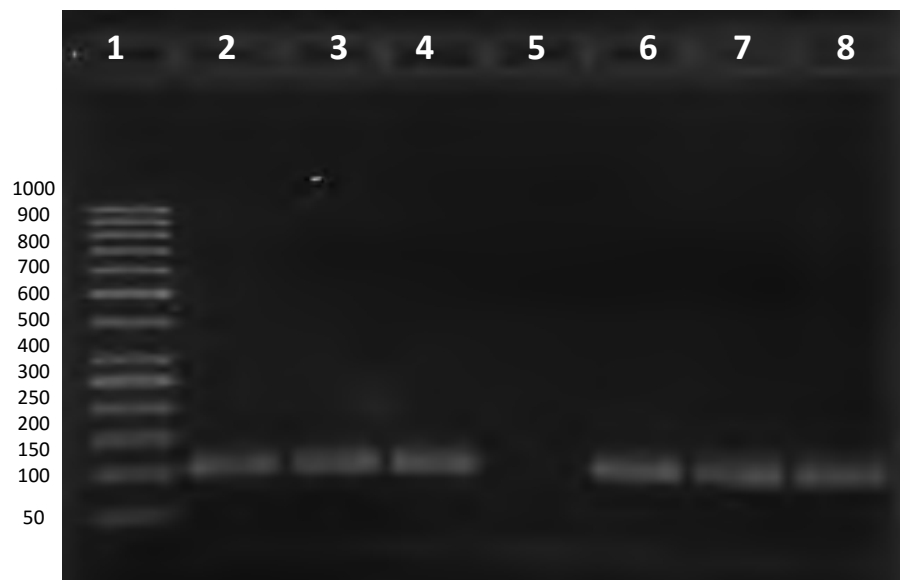


Figura 34. Verificación de los productos de qPCR en gel de agarosa al 3% para la mutación G7 (V371M) con un tamaño de 99bp. Carril 1: Marcador de peso. Carril 2-4: Controles sintéticos. Carril 5: Control Negativo. Carril 6-8: Muestras de ovino.

ANEXO 4. Combinación del ADN genómico en ovinos

Tabla 14. Polimorfismos G1, G2, 64 Y G6 existentes en el gen GDF9 en ovinos de pelo: Kathadin

	Polimorfismos del gen GDF9 en la raza ovina: Kathadin											
	G1 (CAC/CGC)			G2 (AAA/GAA)			G4 (ATT/GTT)			G6 (ATG/GTG)		
Raza Kathadin (163)	AA	GG	AG	AA	GG	AG	AA	GG	AG	AA	GG	AG
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
30												
31												
32												
33												
34												
35												
36												
37												
38												
39												
40												
41												
42												
43												
45												
46												
47												
48												
49												
50												
51												
52												
54												
55												
56												
57												
58												
60												
61												

	AA	GG	AG	AA	GG	AG	AA	GG	AG	AA	GG	AG
63												
64												
65												
66												
67												
72												
73												
74												
75												
76												
77												
78												
79												
80												
81												
82												
83												
84												
85												
86												
87												
88												
89												
90												
91												
92												
93												
94												
95												
96												
97												
98												
99												
100												
101												
102												
103												
104												
105												
106												
107												
108												
109												
110												
111												
112												
113												
114												

	AA	GG	AG	AA	GG	AG	AA	GG	AG	AA	GG	AG
115		GG			GG	AG		GG	AG		GG	
116		GG			GG			GG			GG	
117		GG			GG			GG			GG	
118		GG			GG			GG			GG	
119		GG				AG		GG				
120		GG				AG		GG				
121		GG							AG		GG	
122		GG						GG				
123		GG							AG			
124		GG				AG		GG				
125		GG			GG				AG		GG	
126		GG			GG		AA				GG	
127		GG				AG	AA				GG	
128		GG					AA				GG	
129									AG		GG	
130												
131												
132												
133									AG			
134											GG	
135												
136												
137												
138		GG						GG			GG	
139		GG			GG			GG			GG	
140								GG				
141		GG				AG		GG			GG	
142		GG						GG			GG	
143		GG						GG			GG	
144		GG						GG			GG	
145		GG						GG			GG	
146		GG						GG			GG	
147								GG			GG	
148		GG				AG		GG			GG	
149		GG						GG			GG	
150		GG						GG			GG	
151		GG						GG			GG	
152		GG						GG			GG	
153		GG						GG			GG	
154		GG						GG			GG	
155		GG						GG			GG	
156		GG						GG			GG	
157		GG						GG			GG	
158		GG						GG			GG	
159		GG									GG	
160		GG							AG		GG	
161		GG							AG			
162		GG							AG		GG	

	AA	GG	AG	AA	GG	AG	AA	GG	AG	AA	GG	AG
163*												
165												
167												
171												
172												
177												
179												
181												
182												
183												
184												
191												
194												
197												
198												
199												
200												
222												
233												
234												
240												
246												
247												
249												
254												
257												
262												
270												
271												
273												
Total	0	133	0	0	61	33	23	96	31	0	113	0

Tabla 15. Polimorfismos G1, G2, 64 Y G6 existentes en el gen GDF9 en ovinos de pelo: Pellibuey

Polimorfismos del gen GDF9 en la raza ovina: Pellibuey												
Pelibuey (34)	G1 (CAC/CGC)			G2 (AAA/GAA)			G4 (ATT/GTT)			G6 (ATG/GTG)		
	AA	GG	AG	AA	GG	AG	AA	GG	AG	AA	GG	AG
9												
10												
11												
12												
13												
14												
15												
16												
17												
18												
19												
20												
21												
22												
23												
24												
25												
26												
27												
28												
29												
44												
53												
59												
186												
195												
201												
202												
224												
243												
252												
253												
305												
308												
Total	0	20	0	0	21	13	3	25	7	0	15	0

Tabla 16. Polimorfismos G1, G2, G4 Y G6 existentes en el gen GDF9 en ovinos de pelo: Dorper

Polimorfismos del gen GDF9 en la raza ovina: Dorper												
Dorper (36)	G1 (CAC/CGC)			G2 (AAA/GAA)			G4 (ATT/GTT)			G6 (ATG/GTG)		
	AA	GG	AG	AA	GG	AG	AA	GG	AG	AA	GG	AG
62	AA	GG	AG	AA	GG	AG	AA	GG	AG	AA	GG	AG
68												
69												
70												
71												
166												
168												
176												
204												
206												
207												
208												
210												
212												
216												
220												
221												
223												
225												
229												
230												
232												
236												
237												
238												
239												
242												
248												
251												
255												
256												
259												
264												
265												
267												
269												
Total		36		0	28	3	2	33	1		36	

Tabla 17. Polimorfismos G1, G2, 64 Y G6 existentes en el gen GDF9 en ovinos de pelo: Black Belly

	Polimorfismos del gen GDF9 en la raza ovina: Black Belly											
	G1 (CAC/CGC)			G2 (AAA/GAA)			G4 (ATT/GTT)			G6 (ATG/GTG)		
Black Belly (17)	AA	GG	AG	AA	GG	AG	AA	GG	AG	AA	GG	AG
164												
178												
180												
188												
190												
192												
193												
196												
211												
215												
219												
226												
231												
235												
261												
290												
295												
Total		17		0	16	1	0	17	0		17	

Tabla 18. Polimorfismos G1, G2, 64 Y G6 existentes en el gen GDF9 en ovinos de pelo: Cruzas

	Polimorfismos del gen GDF9 en la raza ovina: Cruzas											
	G1 (CAC/CGC)			G2 (AAA/GAA)			G4 (ATT/GTT)			G6 (ATG/GTG)		
Cruzas	AA	GG	AG	AA	GG	AG	AA	GG	AG	AA	GG	AG
KT/DP (17)												
169												
214												
217												
218												
227												
241												
244												
245												
250												
203												
205												
209												
260												
263												

	AA	GG	AG	AA	GG	AG	AA	GG	AG	AA	GG	AG
266												
268												
272												
KT/BB (14)												
170												
173												
174												
175												
189												
228												
258												
291												
298												
303												
304												
307												
309												
321												
KT/PB (3)												
274												
293												
318												
PB/BB (20)												
288												
289												
292												
294												
296												
297												
299												
300												
301												
302												
305												
306												
310												
311												
312												
313												
314												
319												
320												
322												
DP/BB (1)												
213												
Total	0	55	0	0	33	11	0	55	0	0	55	7