

POLIMORFISMOS DE LA PROTEÍNA 15 MORFOGÉNICA ÓSEA (BMP15) Y SU RELACIÓN CON EL TIPO DE PARTO EN LA OVEJA PELIBUEY

POLYMORPHISMS OF BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 15 (BMP15) AND ITS RELATION TO LAMBING TYPE IN THE PELIBUEY EWE

H. Javier Argüello-Hernández¹, César Cortez-Romero^{1,2*}, R. Isabel Rojas-Martínez³, O. Lourdes Segura-León⁴,
J. Guadalupe Herrera-Haro¹, Juan Salazar-Ortiz^{1,5}, Jaime Gallegos-Sanchez¹

¹Ganadería. ³Fitopatología. ⁴Entomología y Acarología. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. ²Campus San Luis Potosí. Colegio de Postgraduados. 78600. Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí. (ccortez@colpos.mx) ⁵Campus Córdoba. Colegio de Postgraduados. 94500. Córdoba, Veracruz.

RESUMEN

La proteína 15 morfogénica ósea (BMP15), también conocida como factor 9B de crecimiento y diferenciación (GDF9B), es miembro de la superfamilia de factores β de crecimiento (TGF β) y su expresión en el ovocito es esencial para el desarrollo y crecimiento folicular. Polimorfismos en el gen BMP15 están asociados con el aumento de tasa ovulatoria o prolificidad en algunas razas de ovinos. Los objetivos del presente estudio fueron determinar los polimorfismos FecX^G, FecX^L y FecX^H con una mutación de una sola base (SNP) en el gen BMP15, y estimar la asociación de los tres polimorfismos con el tipo de parto en ovejas Pelibuey. En 253 ovejas Pelibuey adultas en edad reproductiva se tomaron muestras sanguíneas de la vena yugular para determinar los SNPs, de acuerdo con la mejor aptitud de producción probable (MPPA) de prolificidad. Mediante la técnica tetraprimer ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction), se determinaron por primera vez los polimorfismos en las ovejas Pelibuey. De las 253 ovejas se usaron 1050 partos, donde los genotipos homocigoto silvestre (CC) y mutado (TT) del polimorfismo FecX^G con 45 % y 43 %, respectivamente, y el homocigoto silvestre (GG) y mutado (AA) del polimorfismo FecX^L con 66 % y 29 %, respectivamente, se asociaron con un número mayor de partos dobles ($p \leq 0.01$). En el polimorfismo FecX^H sólo se encontró el genotipo CC con 52 % de parto doble ($p \leq 0.01$). En conclusión, los polimorfismos FecX^G y FecX^L del gen BMP15 fueron determinados por primera vez en ovejas Pelibuey, y están asociados con un número mayor de tipo de parto doble.

ABSTRACT

Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15), also known as Growth and Differentiation Factor 9B (GDF9B), is a member of the superfamily of Transforming Growth Factor β (TGF β) and its expression in the oocyte is essential for follicular development and growth. Polymorphisms in the BMP15 gene are associated to the increase in ovulation rate or prolificacy in some sheep breeds. The objectives of this study were to determine the FecX^G, FecX^L and FecX^H polymorphisms with a mutation of a single base (SNP-single nucleotide polymorphisms) on the BMP15 gene, and to estimate the association of the three polymorphisms with the lambing type in Pelibuey sheep. Blood samples were taken from the jugular vein of 253 adult Pelibuey ewes in reproductive age to determine the SNPs, according to the most probable producing ability (MPPA) in prolificacy. Through the tetraprimer ARMS-PCR technique (Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction), the polymorphisms were determined for the first time in Pelibuey sheep. Of the 253 ewes, 1050 births were used, where the wild (CC) and mutated (TT) homozygous genotypes of polymorphism FecX^G with 45 % and 43 %, respectively, and the wild (GG) and mutated (AA) homozygous genotype of polymorphism FecX^L with 66 % and 29 %, respectively, were associated to a higher number of double lambing ($p \leq 0.01$). In polymorphism FecX^H only CC genotype was found, with 52 % double lambing ($p \leq 0.01$). In conclusion, polymorphisms FecX^G and FecX^L of the BMP15 gene were determined for the first time in Pelibuey ewes, and they are associated to a higher number of double lambing.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: abril, 2013. Aprobado: diciembre, 2013.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 48: 53-69. 2014.

Keywords: polymorphisms, BMP15, ARMS-PCR, sequentiation, lambing type, Pelibuey.

Palabras clave: polimorfismos, BMP15, ARMS-PCR, secuenciación, tipo de parto, Pelibuey.

INTRODUCCIÓN

La proteína 15 morfogénica ósea (BMP15, Bone Morphogenetic Protein 15) llamada también factor 9B de crecimiento y diferenciación (FecX o GDF9B, Growth Differentiation Factor 9B), está relacionada estrechamente con el factor 9 de crecimiento y diferenciación (GDF9 o FecG); ambos específicos de la superfamilia TGF β (Transforming Growth Factor β) y esenciales para la foliculogénesis ovárica temprana en la oveja (McNatty *et al.*, 2006). En ovejas heterocigotas aumenta la tasa de ovulación, pero las homocigotas son infértiles debido a un fallo ovárico primario (Hanrahan *et al.*, 2004; Bodin *et al.*, 2007). El receptor de las células de la granulosa que regula la respuesta de BMP15 no está identificado, pero una mutación en el receptor BMP15 en la oveja Boorola es responsable del aumento en la tasa de ovulación (McNatty *et al.*, 2006). El gen BMP15 se ubica en el cromosoma X con una secuencia completa de codificación de 1179 nucleótidos contenidos en dos exones, separados por un intrón de aproximadamente 5.4 Kb (Galloway *et al.*, 2000). Este gen tiene seis mutaciones que afectan la prolificidad: FecX^G y FecX^B (Hanrahan *et al.*, 2004), FecX^H y FecX^I (Galloway *et al.*, 2000), FecX^L (Bodin *et al.*, 2007) y FecX^R (Monteagudo *et al.*, 2009). El sistema de la proteína morfogénica ósea (BMP), al cual pertenece BMP15, tiene una función fundamental en la foliculogénesis modulando la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa y de la teca, en respuesta a la estimulación por gonadotropinas. La mutación induce una maduración precoz de los folículos ováricos al aumentar su sensibilidad a la hormona folículo estimulante (FSH). Como consecuencia, en las ovejas portadoras de la mutación se produce la ovulación y luteinización de numerosos folículos maduros de menor tamaño, con una sensibilidad precoz a la LH, lo que conduce a una mayor tasa de ovulación (Galloway *et al.*, 2000; McNatty *et al.*, 2006; Scaramuzzi *et al.*, 2011). Las principales razas de ovejas de pelo son Pelibuey y Black Belly, y son una fuente importante para el abastecimiento de carne en México (Segura *et al.*, 1996; Dickson *et al.*, 2004). Las razas de pelo se han popularizado por su rusticidad, precocidad, fertilidad y adaptación a diferentes situaciones

INTRODUCTION

The Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15), also called Growth and Differentiation Factor 9B (FecX or GDF9B), is closely related with the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9 or FecG); they are both specific of the superfamily TGF β (Transforming Growth Factor β) and essential to the early ovary folliculogenesis in ewes (McNatty *et al.*, 2006). In heterozygous ewes, it increases the ovulation rate, but homozygous are infertile due to a primary ovarian failure (Hanrahan *et al.*, 2004; Bodin *et al.*, 2007). The receptor on the granulosa cells that regulate the response to BMP15 has not been identified, but a mutation on the BMP15 receptor in Boorola sheep is responsible for the increase in ovulation rate (McNatty *et al.*, 2006). The BMP15 gene is located on chromosome X with a complete codification sequence of 1179 nucleotides contained in two exons, separated by an intron of approximately 5.4 Kb (Galloway *et al.*, 2000). This gene has six mutations that affect prolificacy: FecX^G and FecX^B (Hanrahan *et al.*, 2004), FecX^H and FecX^I (Galloway *et al.*, 2000), FecX^L (Bodin *et al.*, 2007) and FecX^R (Monteagudo *et al.*, 2009). The system of the bone morphogenetic protein (BMP), to which the BMP15 belongs, has a fundamental function in the folliculogenesis by modulating the proliferation and differentiation of cells of the granulosa and the theca, in response to stimulation by gonadotropins. The mutation induces an early maturation of ovarian follicles by increasing their sensitivity to the follicle stimulating hormone (FSH). As consequence, the ovulation and luteinization of several mature follicles of smaller size is produced in ewes that carry the mutation, with an early sensitivity to the LH, leading to a higher rate of ovulation (Galloway *et al.*, 2000; McNatty *et al.*, 2006; Scaramuzzi *et al.*, 2011). The primary hair sheep breeds are Pelibuey and Black Belly, and they are an important source for meat supply in Mexico (Segura *et al.*, 1996; Dickson *et al.*, 2004). Hair breeds have become popular because of their rusticity, precocity, fertility and adaptation to different situations of intensive or extensive management (González-Reyna *et al.*, 1991). The Pelibuey breed is rustic and with prolificacy values of 1.16 to 2.20 (Segura *et al.*, 1996; Dickson *et al.*, 2004). The increase in prolificacy is

de manejo intensivo o extensivo (González-Reyna *et al.*, 1991). La raza Pelibuey es rústica y con valores de prolificidad de 1.16 a 2.20 (Segura *et al.*, 1996; Dickson *et al.*, 2004). El aumento de la prolificidad es una vía para mejorar la competitividad de la producción, con énfasis en la tasa de ovulación, considerando factores ambientales y genéticos principalmente con la participación de un conjunto de genes de pequeño efecto (poligen) y por la acción de genes mayores con un gran efecto sobre la tasa de ovulación. Así, el gen BMP15 en ovinos aumenta la tasa de ovulación en alrededor de un óvulo extra y el tamaño de la camada en 0.6 corderos por parto. Este gen es conservado y su polimorfismo influye para que los animales sean prolíficos, no prolíficos y de partos simples (McNatty *et al.*, 2006).

En la literatura revisada no se encontraron estudios sobre genes relacionados con tasa ovulatoria y prolificidad en ovinos Pelibuey. Por tanto, la hipótesis del presente estudio fue que los polimorfismos FecX^G, FecX^L y FecX^H del gen BMP15 están presentes y asociados con el tipo de parto en la oveja Pelibuey. Los objetivos fueron determinar los polimorfismos FecX^G, FecX^H y FecX^L con una mutación de una sola base (SNP) en el gen BMP15 y estimar la asociación de los tres polimorfismos con el tipo de parto en ovejas adultas Pelibuey.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio

El estudio se realizó con datos de registros de ovejas Pelibuey adultas del Rancho “El Tesoro”, ubicado en el km 19.3 de la ciudad de Campeche hacia Edzna, Campeche, a 19° 35' N y 90° 20' O, y a una altitud de 15 m (INEGI, 1990).

Características de las ovejas

Los datos son de 253 ovejas adultas con edades de 4 años 5 meses hasta 10 años 9 meses, que presentaron las mejores características fenotípicas y genéticas de la raza Pelibuey, avaladas mediante un registro de la AMCO (Asociación Mexicana de Criadores de Ovinos) y de acuerdo al análisis de la mejor aptitud de producción probable (MPPA) en prolificidad.

Mejor aptitud de producción probable (MPPA)

La MPPA se usó para evaluar la prolificidad de las 253 ovejas en relación al tamaño de la camada y al número de camadas de

a path to improving competitiveness in production, with an emphasis in the ovulation rate, taking into account environmental and genetic factors primarily from the participation of a set of genes of small effect (polygene) and from the action of larger genes with a great effect on the ovulation rate. Thus, the BMP15 gene in sheep increases the ovulation rate in around one extra ovule, and the size of the litter in 0.6 lambs per lambing. This gene is conserved and its polymorphism influences for animals to be prolific, not prolific and of single births (McNatty *et al.*, 2006).

In the literature reviewed, no studies were found about genes related with the ovulation rate and prolificacy in Pelibuey sheep. Therefore, the hypothesis for this study was that polymorphisms FecX^G, FecX^L and FecX^H of the BMP15 gene are present and they are associated with the type of lambing in the Pelibuey ewe. The objectives were to determine the FecX^G, FecX^H and FecX^L polymorphisms with a mutation of a single base (SNP) on the BMP15 gene, and to estimate the association of the three polymorphisms with the lambing type in adult Pelibuey ewes.

MATERIALS AND METHODS

Location of the study

The study was performed with data from records of adult Pelibuey ewes from “El Tesoro” Ranch, located on km 19.3 from the city of Campeche towards Edzna, Campeche, at 19° 35' N and 90° 20' W, and an altitude of 15 m (INEGI, 1990).

Characteristics of the ewes

The data are from 253 adult ewes with ages of 4 years 5 months to 10 year 9 months, which presented the best phenotypic and genetic characteristics of the Pelibuey breed, guaranteed by a registry from the AMCO (*Asociación Mexicana de Criadores de Ovinos*, Mexican Association of Sheep Breeders), and according to the most probable producing ability (MPPA) in prolificacy.

Most probable producing ability (MPPA)

The MPPA was used to evaluate the prolificacy of the 253 ewes in relation to the size of the litter and the number of litters from the individual observation, compared to those from the flock selected (Herrera *et al.*, 2003), based on the productivity of the fifth to tenth lambing per ewe, for a total of 1050 births.

la observación individual, comparadas con las del rebaño seleccionado (Herrera *et al.*, 2003), basada en la productividad del quinto al décimo parto por oveja, para un total de 1050 partos.

Recolección y conservación de muestras

Las muestras sanguíneas se recolectaron de la vena yugular de 253 ovejas usando tubos vacutainer de tapa lila (Vacutainer, Hemogar®, EE.UU.) con anticoagulante K2 ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Los tubos se almacenaron a 4 °C para su uso posterior.

Preparación de las muestras para PCR

Extracción de ADN para los polimorfismos

Para determinar los polimorfismos del gen BMP15, se realizó la extracción de ADN de las 253 muestras sanguíneas usando las instrucciones del fabricante con el kit QIAGEN (QIAamp® DNA Blood, catálogos 51104 y 51106; QIAGEN®, Alemania).

Extracción de ADN para los exones

Para verificar la presencia de los polimorfismos en el exón 1 o 2, se realizó la extracción de ADN en cinco muestras sanguíneas de ovejas prolíficas y cinco no prolíficas, seleccionadas del análisis del MPPA de las 253 ovejas, según la metodología descrita por Reineke *et al.* (1998).

Procedimiento de la PCR para la determinación de los polimorfismos

La amplificación de los polimorfismos FecX^G, FecX^H y FecX^L del gen BMP15 se realizó con la técnica tetraprimer-ARMS (Sistema de Amplificación Refractario de Mutaciones)-PCR descrita por Ye *et al.* (2001). Se usaron dos pares de cebadores (Polley *et al.*, 2009) para cada polimorfismo (Cuadro 1).

La técnica ARMS-PCR se realizó con 25 µL de reacción preparada con 2.5 µL de MgCl₂ (30 mM); 2.5 µL de amortiguador de reacción 10X (KCl 500 mM, Tris-HCl pH 8.3 100 mM, gelatina 100 µg mL⁻¹, Tritón 1 %, 1.5 mg mL⁻¹, BSA; Bio TecMol®, México); 1 µL de mezcla de dNTPs (sales de sodio de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, cada uno a 10 mM en agua a pH 7.5; Promega®, EE. UU.); 1.5 µL de cada cebador (10 pmol µL⁻¹); 1.5 µL de enzima ADN polimerasa (amplificasa; 5 U, unidades µL⁻¹; amplificasa®); 1 µL de agua esteril (agua inyectable, PiSA®, México) y 10 µL de ADN (aproximadamente una media de 140 ng). Las condiciones de amplificación para cada polimorfismo fueron las siguientes: una desnaturalización a 94 °C por 4 min,

Collection and conservation of samples

The blood samples were collected from the jugular vein of 253 ewes using vacutainer tubes with purple caps (Vacutainer, Hemogar®, USA) with anticoagulant K2 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The tubes were stored at 4 °C for their later use.

Preparation of samples for PCR

DNA extraction for polymorphisms

To determine the polymorphisms of the BMP15 gene, DNA extraction was performed from the 253 blood samples using the manufacturer's instructions with the QIAGEN kit (QIAamp® DNA Blood, catalogues 51104 and 51106; QIAGEN®, Germany).

DNA extraction for the exons

To verify the presence of polymorphisms in the exon 1 or 2, DNA extraction was performed from blood samples from five prolific and five non-prolific ewes, selected from the MPPA analysis of the 253 ewes, according to the methodology described by Reineke *et al.* (1998).

PCR procedure for the determination of polymorphisms

The amplification of polymorphisms FecX^G, FecX^H and FecX^L of the BMP15 gene was performed with the tetraprimer-ARMS (Amplification Refractory Mutation System)-PCR technique described by Ye *et al.* (2001). Two pairs of primers (Polley *et al.*, 2009) were used for each polymorphism (Table 1).

The ARMS-PCR technique was performed with 25 µL of reaction prepared with 2.5 µL of MgCl₂ (30 mM); 2.5 µL of 10X reaction buffer (KCl 500 mM, Tris-HCl pH 8.3 100 mM, gel 100 µg mL⁻¹, Triton 1 %, 1.5 mg mL⁻¹, BSA; Bio TecMol®, México); 1 µL of dNTPs mixture (sodium salts of dATP, dCTP, dGTP and dTTP, each one at 10 mM in water at pH 7.5; Promega®, USA); 1.5 µL of each primer (10 pmol µL⁻¹); 1.5 µL of polymerase DNA enzyme (amplificase; 5 U, units µL⁻¹; amplificase®); 1 µL of sterile water (injectable water, PiSA®, Mexico) and 10 µL of DNA (approximately a mean of 140 ng). The conditions for amplification for each polymorphism were the following: one denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 32 cycles (denaturation at 94 °C for 30 s, annealing: FecX^G, 56 °C for 30 s; FecX^H, 58 °C for 30 s or FecX^L, 55 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s), and a final extension of 72 °C

Cuadro 1. Secuencias de polimorfismos usados para amplificar el fragmento del gen BMP15 con la técnica de Tetra-ARMS-PCR. Las secuencias de oligonucleótidos se basaron en el gen BMP15 ovino (AH009593) con sus respectivas posiciones.

Table 1. Sequences of polymorphisms used to amplify the fragment of gene BMP15 with the Tetra-ARMS-PCR technique. The oligonucleotide sequences were based on the sheep BMP15 gene (AH009593) with its corresponding positions.

Pol. [†]	Secuencia (5'-3') [‡]	Tamaño producto PCR (pb)	Ne [§]	PCR (alineamiento)
FecX ^G	IS: 363CTTCTTGTACTGTATTTCAATGACAATC391	CC (Silv.): 102, TT (Mut.): 112, TC o CT: 102 y 112	C/T	56 °C (32 ciclos por 30 s)
	ISA: 417GAGAGGTTTGGTCTTCTGAACACTATA391			
	ES: 306AAGAGGTAGTGAGGTTCTTTGAGTTCT331			
	EAS: 463AGAGAGAGAGGGTCTTTTCTGTGTA438			
FecX ^H	IS: 519GGAGCATGATGGGCCCTGAAAGTACCC544	CC (Silv.): 203, TT (Mut.): 248, CT o TC: 203 y 248	C/T	58 °C (32 ciclos por 30 s)
	IAS: 573GCTGACTTGAAAGGGTGGAGGGAACAATA544			
	ES: 326AGTTCTGTGGCATGGCACTTTCATCAT353			
	EAS: 720CACCAGCTCACTGACAAGGTCTGTGATG693			
FecX ^L	IS: 606TGCTCCCCATCTCTATACCCCAAACTAATA635	GG (Silv.): 252, AA (Mut.): 204, GA o AG: 252 y 204	A/G	55 °C (32 ciclos por 30 s)
	IAS: 662TGTAGTACCCGAGGACATACCTCCCTGAC635			
	ES: 411ACCTCTCCCTAAAGGCCCTGAAAGAGTTT438			
	EAS: 808ACAAGATACTCCCATTTGCCTCAATCAG781			

[†]Polimorfismo. [‡]IS: interno sentido; IAS: interno antisentido; ES: externo sentido; EAS: externo antisentido. [§]Nucleótido específico. Silv.: silvestre. Mut.: mutado. (Galloway *et al.*, 2000; Hanrahan *et al.*, 2004; Bodin *et al.*, 2007) ♦ [†]Polymorphism. [‡]IS: internal sense; IAS: internal antisense; ES: external sense; EAS: external antisense. [§]Specific nucleotide. Wi: wild. Mut.: mutated. (Galloway *et al.*, 2000; Hanrahan *et al.*, 2004; Bodin *et al.*, 2007).

seguido de 32 ciclos (desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento: FecX^G, 56 °C por 30 s; FecX^H, 58 °C por 30 s o FecX^L, 55 °C por 30 s, y extensión a 72 °C por 30 s), y una extensión final de 72 °C por 7 min, en un termociclador (Tc-512; Techne®). El producto amplificado por ARMS-PCR para cada polimorfismo fue: FecX^G homocigoto silvestre CC (-/-; 102 pb), mutado TT (+/+; 112 pb), y heterocigoto CT o TC (-/+ o +/-; 102 pb y 112 pb) (Hanrahan *et al.*, 2004); FecX^H homocigoto silvestre CC (-/-; 203 pb), mutado TT (+/+; 248 pb) y heterocigoto CT o TC (-/+ o +/-; 203 pb y 248 pb) (Galloway *et al.*, 2000). Por último, FecX^L homocigoto silvestre GG (-/-; 252 pb), mutado AA (+/+; 204 pb) y heterocigoto GA o AG (-/+ o +/-; 252 pb y 204 pb) (Bodin *et al.* (2007). Luego se verificó el producto amplificado por PCR de las muestras en una cámara vertical (Modelo MVG-216-33; C.B.S Scientific CO®, EE. UU.) usando gel de poliácridamida al 8 % (22 mL de poliácridamida; acrilamida-bisacrilamida 29:1, p/p, al 40 % p/v), 11 mL de amortiguador TBE 10X (Tris Borato-EDTA), 77 mL de agua destilada estéril, 65 µL de TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine; SIGMA®, EE. UU.) y 440 µL al 25 % de (persulfato de amonio, p/v; SIGMA®, EE. UU.). En cada pozo se depositó un volumen final de 3 µL: 2 µL de producto de PCR y 1 µL del amortiguador de carga II usando como amortiguador de corrida TBE 1X y 1.5 µL del marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder; Thermo Scientific®, EE.UU.). Las condiciones de la electroforesis fueron 247 V por 90 min para los tres polimorfismos. Finalizada la electroforesis, los resultados fueron evaluados en tres pasos: 1) tinción y lavado del gel, con ácido acético glacial al 10 % en agitación por 25 min, seguido por inmersión en agua destilada por 6 min; por último, inmersión en solución de tinción (1 g AgNO₃; 1.5 mL formaldehído en un 1 L de agua destilada) por 30 min; 2) revelado de los polimorfismos, se usó solución reveladora (dilución de 60 g de Na₂CO₃ en 2 L de agua destilada) mantenida en refrigeración a 6 °C y, antes de usarse, se agregaron 3 mL al 37 % de formaldehído y 400 µL a 10 mg mL⁻¹ de tiosulfato de sodio (modificado de Sambrook *et al.*, 1994); 3) fotodocumentación, se usó el programa Digital Science 1D V.2.0.3. (Kodak®) y un transiluminador de luz blanca (TLW-20; UVP®, EE. UU.) para usar en el análisis de las frecuencias.

Procedimiento de la PCR para la identificación de los exones 1 y 2

Para la amplificación del exón 1 (AF236078) y el exón 2 (AF236079) del gen BMP15 (Hanrahan *et al.*, 2004), se usó la técnica de PCR punto final. Cada exón empleó un par diferente de cebadores (Cuadro 2).

La reacción usada de 25 µL se preparó con 2.5 µL de MgCl₂ (30 mM); 2.5 µL de amortiguador de reacción 10X, KCl 500 mM, Tris-HCl pH 8.3 100 mM, gelatina 100 µg mL⁻¹,

for 7 min, in a thermocycler (Tc-512; Techne®). The product amplified by ARMS-PCR for each polymorphism was: FecX^G wild CC (-/-; 102 pb), mutated TT (+/+; 112 pb) homozygous, and CT or TC (-/+ or +/-; 102 pb and 112 pb) heterozygous (Hanrahan *et al.*, 2004); FecX^H wild CC (-/-; 203 pb), mutated TT (+/+; 248 pb) homozygous, and CT or TC (-/+ or +/-; 203 pb and 248 pb) heterozygous (Galloway *et al.*, 2000). Lastly, FecX^L wild GG (-/-; 252 pb), mutated AA (+/+; 204 pb) heterozygous, and GA or AG (-/+ or +/-; 252 pb and 204 pb) heterozygous (Bodin *et al.* (2007). Then, the product amplified by PCR from the samples was verified in a vertical chamber (Model MVG-216-33; C.B.S Scientific CO®, USA) using polyacrylamide gel at 8 % (22 mL of polyacrylamide; acrylamide-bisacrylamide 29:1, p/p, at 40 % p/v), 11 mL of TBE 10X buffer (Tris Borato-EDTA), 77 mL of sterile distilled water, 65 µL of TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine; SIGMA®, USA) and 440 µL at 25 % of (ammonium persulfate, p/v; SIGMA®, USA). A final volume of 3 µL was placed in each well: 2 µL of PCR product and 1 µL of the loading II buffer using as running buffer TBE 1X and 1.5 µL of the molecular weight marker (GeneRuler 1 kb DNA Ladder; Thermo Scientific®, USA). The conditions for electrophoresis were 247 V for 90 min for the three polymorphisms. Once the electrophoresis was finalized, the results were evaluated in three steps: 1) gel stain and wash, with glacial acetic acid at 10 % in agitation for 25 min, followed by immersion in distilled water for 6 min; lastly, immersion in stain solution (1 g AgNO₃; 1.5 mL formaldehyde in 1 L of distilled water) for 30 min; 2) developing of polymorphisms, developing solution was used (dilution of 60 g Na₂CO₃ in 2 L of distilled water) kept under refrigeration at 6 °C and, before using it, 3 mL at 37 % of formaldehyde and 400 µL at 10 mg mL⁻¹ of sodium tiosulfate (modified from Sambrook *et al.*, 1994); 3) photodocumentation, the Digital Science 1D V.2.0.3. (Kodak®) software was used and a white light transiluminator (TLW-20; UVP®, USA) for the analysis of frequencies.

PCR procedure for identifying exons 1 and 2

For the amplification of exon 1 (AF236078) and exon 2 (AF236079) of the BMP15 gene (Hanrahan *et al.*, 2004), the final point PCR technique was used. Each exon used a different pair of primers (Table 2).

The reaction used of 25 µL was prepared with 2.5 µL of MgCl₂ (30 mM); 2.5 µL of 10X reaction buffer, KCl 500 mM, Tris-HCl pH 8.3 100 mM, gel 100 µg mL⁻¹, Triton 1 %, 1.5 mg mL⁻¹ BSA; Bio TecMol®, México); 1 µL of dNTPs (sodium salts of dATP, dCTP, dGTP and dTTP, each one at 10 mM in water at pH 7.5; Promega®, USA); 1.5 µL of each primer (10 pmol µL⁻¹); 1.5 µL of polymerase DNA enzyme (amplificase, 5 U, units µL⁻¹; amplificase®, México); 1 µL of sterile water (injectable water,

Cuadro 2. Secuencias de los exones 1 (AF236078) y 2 (AF236079) del gen BMP15 ovino usados para verificar la presencia de los polimorfismos mediante la secuenciación.**Table 2. Sequences of exons 1 (AF236078) and 2 (AF236079) of the sheep BMP15 gene used to verify the presence of polymorphisms through sequentiation.**

Exón	Mutación	Secuencia (5'-3') [†]	Tamaño producto PCR (pb)	PCR (alineamiento)
1	B-13	S: CATGCTGCCTTGTCCAC	325	56 °C (30 ciclos por 50 s)
	B-28	AS: AGGCAATGTGAAGCCTGACA		
	B-25	S: CAG TTT GTA CTG AGC AGG TC		
2	B-4	AS: TTC TTG GGA AAC CTG AGC TAG C	857	58 °C (30 ciclos por 50 s)

[†]S: sentido, AS: antisentido. Hanrahan *et al.* (2004) ♦ [†]S: sense, AS: antisense. Hanrahan *et al.* (2004).

Tritón 1 %, 1.5 mg mL⁻¹ BSA; Bio TecMol®, México); 1 µL de dNTPs (sales de sodio de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, cada uno a 10 mM en agua a pH 7.5; Promega®, EE.UU.); 1.5 µL de cada cebador (10 pmol µL⁻¹); 1.5 µL de enzima ADN polimerasa (amplificasa, 5 U, unidades µL⁻¹; amplificasa®, México); 1 µL de agua estéril (agua inyectable, PiSA®, México); y 13 µL de ADN (aproximadamente con media de 140 ng). Las condiciones del ciclo térmico para cada exón fueron: 1) exón 1, desnaturalización a 94 °C por 4 min, luego 30 ciclos (desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento: exón 1, 56 °C por 50 s; 2) exón 2, 58 °C por 50 s, y extensión a 72 °C por 1 min 30 s, y una extensión final de 72 °C por 7 min. El producto amplificado por PCR para el exón 1 (325 pb) y exón 2 (857 pb) se verificó en gel de agarosa al 1.4 % (1.4 g de agarosa y 100 mL de buffer TBE 1X; Tris Borato-EDTA) por medio de una electroforesis (Sambrook *et al.*, 1994), en una cámara modelo horizon 58 (cámara de electroforesis; Life Technologies®). En cada pozo se depositó un volumen final 18 µL (4 µL del amortiguador de carga II y 14 µL de producto de PCR) usando como amortiguador de corrida TBE 1X. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 1 µg mL⁻¹ durante 30 min y 1.5 µL de marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder; Thermo Scientific®, EE. UU.). Las condiciones de electroforesis fueron 88 V por 105 min para el exón 1 y de 50 min para el exón 2. Los resultados se evaluaron en el fotodocumentador Modelo Gel Doc 2000 (Bio Rad®) de luz ultravioleta y las imágenes se capturaron por computadora (Quantityone; Bio Rad®) para identificar los productos a purificar, según las instrucciones del kit QIAGEN (MinElute Gel Extraction Kit; QIAGEN®, Alemania), las cuales se enviaron a la empresa MICRO GEN® (Corea) para su secuenciación. Cada muestra se verificó visualmente para eliminar falsos positivos.

Secuenciación de los exones

La secuenciación del producto de PCR purificado de los exones 1 y 2 se realizó según las especificaciones de la empresa (MICROGEN INC®, Corea): se colocaron 10 µL del producto

PiSA®, México); and 13 µL of DNA (approximately with a mean of 140 ng). The conditions for the thermal cycle for each exon were: 1) exon 1, denaturation at 94 °C for 4 min, then 30 cycles (denaturation at 94 °C for 1 min, annealing: exon 1, 56 °C for 50 s; 2) exon 2, 58 °C for 50 s, and extension at 72 °C for 1 min 30 s, and a final extension of 72 °C for 7 min. The product amplified by PCR for exon 1 (325 pb) and exon 2 (857 pb) was verified in agarose gel at 1.4 % (1.4 g of agarose and 100 mL of TBE 1X buffer; Tris Borato-EDTA) through electrophoresis (Sambrook *et al.*, 1994), in a chamber model horizon 58 (electrophoresis chamber; Life Technologies®). In each well a final volume of 18 µL was placed (4 µL of loading II buffer and 14 µL of the PCR product) using as a running buffer TBE 1X. The gels were stained with ethidium bromide at a final concentration of 1 µg mL⁻¹ for 30 min and 1.5 µL of molecular weight marker (GeneRuler 1 kb DNA Ladder; Thermo Scientific®, USA). The conditions of electrophoresis were 88 V for 105 min for exon 1 and 50 min for exon 2. The results were evaluated by photo documenting with Model Gel Doc 2000 (Bio Rad®) of ultraviolet light and the images were captured by computer (Quantityone; Bio Rad®) to identify the products that would be purified, according to the manufacturer's instructions from kit QIAGEN (MinElute Gel Extraction Kit; QIAGEN®, Germany), which were sent to the MICRO GEN® (Korea) company for their sequentiation. Each sample was visually verified to eliminate false positives.

Sequentiation of the exons

The sequentiation of the purified PCR product of exons 1 and 2 was performed according to the specifications by the company (MICROGEN INC®, Korea): 10 µL of the product were placed in Eppendorf 1.5 mL tubes, to obtain a good reading of the sequences used to identify mutations FecX^G, FecX^L and FecX^H.

Statistical analysis of frequencies

To determine polymorphisms FecX^G, FecX^L and FecX^H, the genotypic and allelic frequencies of the 253 ewes sampled

purificado en tubos Eppendorf de 1.5 mL, para obtener una buena lectura de las secuencias usadas para identificar las mutaciones $FecX^G$, $FecX^L$ y $FecX^H$.

Análisis estadístico de frecuencias

Para determinar los polimorfismos $FecX^G$, $FecX^L$ y $FecX^H$ se evaluaron las frecuencias genotípicas y alélicas de las 253 ovejas muestreadas. Después de asignar el genotipo de cada oveja, se estimó mediante la prueba de ajuste del equilibrio de Hardy-Weinberg para las frecuencias genotípicas y las frecuencias alélicas (Crow, 1999), comparándose mediante la prueba de Ji cuadrada.

Análisis estadístico de la distribución de los partos asociada a los polimorfismos

La asociación de las frecuencias genotípicas de cada polimorfismo con la distribución del tipo de parto de las 253 ovejas con los 1050 partos, se estimó mediante la prueba de ajuste del equilibrio de Hardy-Weinberg (Crow, 1999), comparándose mediante la prueba de Ji cuadrada.

Análisis de secuencias

El análisis genómico de las secuencias obtenidas en las cinco ovejas prolíficas y cinco no prolíficas, se realizó con el programa MEGA 5.05 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis 5.05; Mega®) para buscar los polimorfismos en los exones. Un alineamiento (ClustalW 1.6) se realizó para ubicar los polimorfismos entre las secuencias obtenidas, y después se realizó otro alineamiento de las secuencias obtenidas de las ovejas Pelibuey con las secuencias del gen BMP15 de otros ovinos reportadas en el banco de genes (número de acceso AF236078, AF236079 y AF268477).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estimación de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen BMP15

Las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos $FecX^G$, $FecX^L$ y $FecX^H$ evaluadas individualmente en 253 ovejas adultas Pelibuey, fueron registradas. Las frecuencias genotípicas del polimorfismo $FecX^G$ fueron similares entre genotipos homocigotos mutado TT (0.43; +/+, 112 pb) y silvestre CC (0.45; -/-, 102 pb). Pero hubo una gran diferencia entre los homocigotos TT y CC en comparación con el heterocigoto (0.12) TC (+/-; 112 pb) o CT (-/+; 102 pb) ($p \leq 0.01$). Las frecuencias alélicas

were evaluated. After assigning the genotype to each ewe, it was estimated through Hardy-Weinberg adjustment equilibrium test for the genotype frequencies and the allele frequencies (Crow, 1999), comparing them through the Chi-square test.

Statistical analysis of the distribution of lambings associated to polymorphisms

The association of genotype frequencies of each polymorphism with the distribution of type of lambing of the 253 ewes with the 1050 lambings was estimated through the Hardy-Weinberg adjustment equilibrium test (Crow, 1999), comparing them through the Chi-square test.

Sequence analysis

The genomic analysis of sequences obtained in the five prolific and five non-prolific ewes was performed with the MEGA 5.05 software (Molecular Evolutionary Genetics Analysis 5.05; Mega®), to search for polymorphisms in the exons. An alignment (ClustalW 1.6) was performed to locate the polymorphisms among the sequences obtained, and later another alignment of the sequences obtained from Pelibuey ewes was performed with the sequences from the BMP15 gene of other sheep reported in the gene bank (access number AF236078, AF236079 and AF268477).

RESULTS AND DISCUSSION

Estimation of the genotypic and allelic frequencies of polymorphisms of the BMP15 gene

The genotypic and allelic frequencies of polymorphisms $FecX^G$, $FecX^L$ and $FecX^H$ evaluated individually in 253 adult Pelibuey ewes were recorded. The genotypic frequencies of polymorphism $FecX^G$ were similar between mutated TT (0.43; +/+, 112 pb) and wild CC (0.45; -/-, 102 pb) homozygous genotypes. However, there was a great difference between homozygous TT and CC, in comparison with the heterozygous (0.12) TC (+/-; 112 pb) or CT (-/+; 102 pb) ($p \leq 0.01$). The allelic frequencies were similar in the genotype TT and CC ($p > 0.05$) (Table 3; Figure 1). In contrast, the genotypic frequencies of polymorphism $FecX^L$ were different between the mutated homozygous AA (0.29; +/+, 204 pb), wild homozygous GG (0.66; -/-, 252 pb) and heterozygous (0.05) GA (-/+, 252 pb) or AG (+/-, 204 pb) genotypes. The relevance of the wild homozygous GG ($p \leq 0.01$)

fueron similares en el genotipo TT y CC ($p>0.05$) (Cuadro 3; Figura 1). En cambio, las frecuencias genotípicas del polimorfismo $FecX^L$ fueron diferentes entre homocigoto mutado AA (0.29; +/+, 204 pb), homocigoto silvestre GG (0.66; -/-, 252 pb) y heterocigoto (0.05) GA (-/+, 252 pb) o AG (+/-, 204 pb). Se observó la relevancia del homocigoto silvestre GG ($p\leq 0.01$). Las frecuencias alélicas fueron distintas entre genotipo AA y GG ($p\leq 0.01$) (Cuadro 3, Figura 1). Para el polimorfismo $FecX^H$ no se reporta la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas, ya que sólo se presentó el homocigoto silvestre CC (-/-; 203 pb) (Figura 1).

En este estudio se determinaron por primera vez los polimorfismos $FecX^G$ y $FecX^L$ en ovejas adultas Pelibuey, polimorfismos reportados en las razas de lana Lacaune, Belclare y Cambridge (Davis *et al.*, 2006; Bodin *et al.*, 2007). Sin embargo, el polimorfismo $FecX^G$ no se identificó en la raza de lana iraní Baluchi (Moradband *et al.*, 2011) ni en la raza Cele Black (Hongcai *et al.*, 2010); ni tampoco el polimorfismo $FecX^H$ en la raza tunisina Barbarina (Borni *et al.*, 2011). Similar a lo reportado por estos dos últimos autores, en este estudio con la raza Pelibuey, no se encontró la mutación en el polimorfismo $FecX^H$, la cual afecta la tasa de ovulación y fertilidad descrita en la raza Romney (Galloway *et al.*, 2000).

Distribución de los partos asociada a los polimorfismos

La MPPA en las 253 ovejas Pelibuey fue comparada con la frecuencia genotípica de cada polimorfismo.

was observed. The allelic frequencies were different between genotype AA and GG ($p\leq 0.01$) (Table 3, Figure 1). For polymorphism $FecX^H$ the distribution of genotypic and allelic frequencies is not reported, since only the wild homozygous CC (-/-; 203 pb) was present (Figure 1).

In this study, polymorphisms $FecX^G$ and $FecX^L$ were determined for the first time in adult Pelibuey ewes; these polymorphisms are reported in the wool breeds Lacaune, Belclare and Cambridge (Davis *et al.*, 2006; Bodin *et al.*, 2007). However, the polymorphism $FecX^G$ was not identified in the Iranian wool breed Baluchi (Moradband *et al.*, 2011) or in the Cele Black breed (Hongcai *et al.*, 2010); neither was polymorphism $FecX^H$ in the Tunisian breed Barbarina (Borni *et al.*, 2011). Similar to what was reported by the last two authors, in this study with the Pelibuey breed, the mutation in polymorphism $FecX^H$, which affects the ovulation rate and fertility described in the Romney breed, was not found (Galloway *et al.*, 2000).

Distribution of lambings associated to polymorphisms

The MPPA in the 253 Pelibuey ewes was compared with the genotypic frequency of each polymorphism. The association of the distribution of lambings with the genotypic frequencies of polymorphism $FecX^G$ was similar in genotype TT and genotype CC, but there was a huge difference between homozygous TT and CC in comparison to the heterozygous TC or CT ($p\leq 0.01$) (Table 4). The distribution of the

Cuadro 3. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos $FecX^G$ y $FecX^L$ en el gen BMP15 de ovejas Pelibuey.

Table 3. Genotypic and allelic frequencies of polymorphisms $FecX^G$ and $FecX^L$ in the Pelibuey sheep BMP15 gene.

Polimorfismo	Genotipo	Núm. Obs. (animales)	Frec. Genot.	Frec. alélica
$FecX^G$	TT (+/+)†	110	0.43 a	0.49 a
	TC ó CT (+/-)ó(-/+)‡	30	0.12 b	
	CC (-/-)†	113	0.45 a	0.51 a
	Total	253	1.00	1
$FecX^L$	AA (+/+)†	73	0.29 a	0.31 a
	GA o AG (+/-) o (-/+)‡	12	0.05 b	
	GG (-/-)†	168	0.66 c	0.69 b
	Total	253	1.00	1

Valores con diferente literal en una columna, dentro de cada polimorfismo, son diferentes. Equilibrio Hardy-Weinberg (χ^2 , $p\leq 0.01$); †heterocigoto; ‡homocigoto ♦ Values with different letters in a column, within each polymorphism, are different. Hardy-Weinberg equilibrium (χ^2 , $p\leq 0.01$); †heterozygous; ‡homozygous.

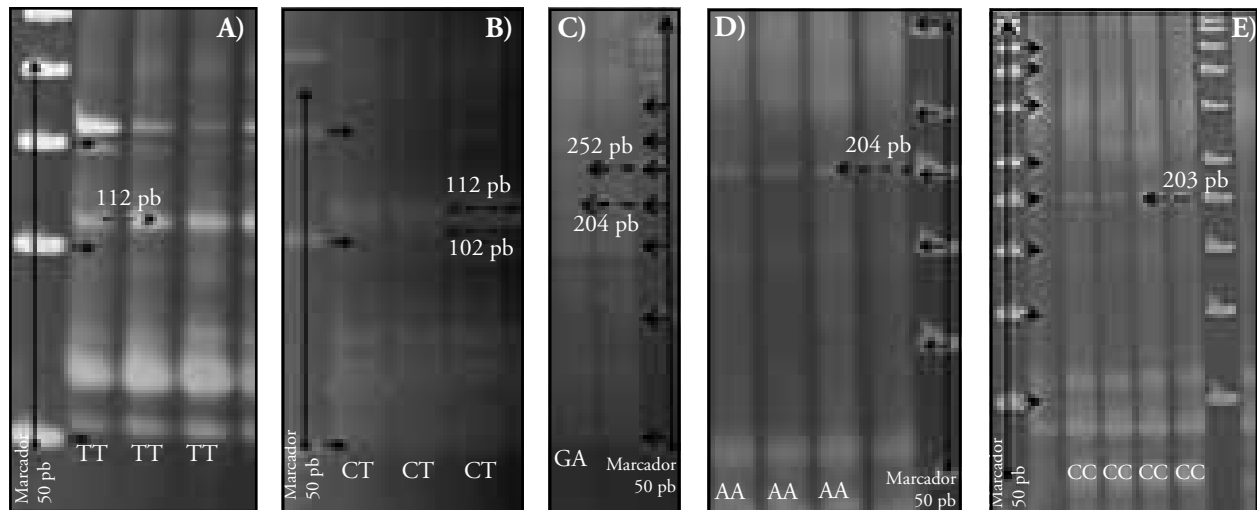


Figura 1. Gel de poliácridamida al 8 % mostrando el resultado de la tetraprimer ARMS-PCR: A) y B) polimorfismo $FecX^G$, Homocigoto mutado T/T (+/+; 112pb) y heterocigoto C/T o T/C (-/+ o +/-; 102 y 112 pb); C) y D) polimorfismo $FecX^L$, homocigoto silvestre AA (-/-; 204 pb) y heterocigoto CA o AG (-/+ o +/-; 252 pb y 204 pb); E) polimorfismo $FecX^H$, homocigoto silvestre CC (-/-; 203 pb), marcador de 50 pb.

Figure 1. Polyacrilamide gel at 8 % showing the results of tetraprimer ARMS-PCR: A) and B) polymorphism $FecX^G$, mutated homozygous T/T (+/+; 112pb) and heterozygous C/T or T/C (-/+ or +/-; 102 and 112 pb); C) and D) polymorphism $FecX^L$, wild homozygous AA (-/-; 204 pb) and heterozygous GA or AG (-/+ or +/-; 252 pb and 204 pb); E) polymorphism $FecX^H$, wild homozygous CC (-/-; 203 pb), 50 pb marker.

La asociación de la distribución de los partos con las frecuencias genotípicas del polimorfismo $FecX^G$, fue similar en el genotipo TT y genotipo CC, pero hubo una gran diferencia entre los homocigotos TT y CC en comparación con el heterocigoto TC o CT ($p \leq 0.01$) (Cuadro 4). La distribución de los 1050 partos fue 2 % para parto triple, 52 % en parto doble y 46 % en parto simple. El parto doble fue el tipo de parto con mayor porcentaje dentro de cada genotipo: el genotipo homocigoto mutado fue 52 % de 452 partos, el genotipo heterocigoto fue 52 % de 126 partos y el homocigoto silvestre 51 % de 472 partos ($p \leq 0.01$) (Cuadro 4).

En cambio, la asociación de la distribución de los partos con las frecuencias genotípicas del polimorfismo $FecX^L$ fue diferente en el genotipo AA, genotipo GG y genotipo TC o CT ($p \leq 0.01$). La distribución de los 1050 partos fue 2 % parto triple, 46 % parto simple y 51 % partos dobles. El parto doble fue el tipo de parto con mayor porcentaje dentro de cada genotipo: el genotipo homocigoto mutado fue 51 % de 304 partos, el genotipo heterocigoto fue 52 % de 52 partos y el homocigoto silvestre 51 % de 694 partos ($p \leq 0.01$) (Cuadro 5).

Para el último polimorfismo $FecX^H$ no se estimaron las frecuencias, ya que sólo presentó el genotipo

1050 lambings was 2 % for triple lambing, 52 % for double lambing and 46 % for single lambing. The double lambing was the type of lambing with highest percentage within each genotype: the mutated homozygous genotype was 52 % out of 452 lambings, the heterozygous genotype was 52 % out of 126 lambings and the wild homozygous 51 % out of 472 lambings ($p \leq 0.01$) (Table 4).

In contrast, the association of the distribution of lambings with genotypic frequencies of polymorphism $FecX^L$ was different in genotype AA, genotype GG and genotype TC or CT ($p \leq 0.01$). The distribution of the 1050 lambings was 2 % triple lambing, 46 % single lambing and 51 % double lambing. The double lambing was the type of lambing with highest percentage within each genotype: the mutated homozygous genotype was 51 % out of 304 lambings, the heterozygous genotype was 52 % out of 52 lambings and the wild homozygous 51 % out of 694 lambings ($p \leq 0.01$) (Table 5).

For polymorphism $FecX^H$ the frequencies were not estimated, since only the wild homozygous CC (-/-; 203 pb) genotype was present, out of 1050 lambings: 486 single lambings (46 %), 539 double lambings (52 %) and 25 triple lambings (2 %) ($p \leq 0.01$). The association of the distribution of lambings with

Cuadro 4. Distribución de los partos asociada a las frecuencias genotípicas del polimorfismo FecX^G en el gen BMP15 de ovejas Pelibuey.**Table 4. Distribution of lambings associated to the genotypic frequencies of polymorphism FecX^G in Pelibuey sheep BMP15 gene.**

Genotipo	Frecuencia genotípica	Simple	Doble	Triple	Asociación de las frecuencias (Número y porcentaje)
TT (+/+)†	0.43	209	232	11	452
		0.46 a	0.52b	0.02c	43 %
TC o CT (+/-) o (-/+)‡	0.12	58	65	3	126
		0.46 a	0.52b	0.02c	12 %
CC (-/-)†	0.45	219	242	11	472
		0.46 a	0.51b	0.02c	45 %
Total	1.00	486	539	25	1050
		0.46	0.52	0.02	100 %

Valores con diferente literal en una fila son diferentes. Equilibrio Hardy-Weinberg (χ^2 , $p \leq 0.01$); †homocigotos; ‡heterocigoto; simple; doble; triple. Total de partos de las ovejas ♦ Values with different letters in a row are different. Hardy-Weinberg equilibrium (χ^2 , $p \leq 0.01$); heterozygous; homozygous; single; double; triple. Total lambings by the ewes.

homocigoto silvestre CC (-/-; 203 pb) de 1050 partos: 486 partos simples (46 %), 539 partos dobles (52 %) y 25 partos triples (2 %) ($p \leq 0.01$). La asociación de la distribución de los partos con las frecuencias alélicas para el polimorfismo FecX^G fue similar ($p > 0.05$) en el genotipo TT (0.49; 514 partos) y genotipo CC (0.51; 536 partos); para el polimorfismo FecX^L, fue diferente en el genotipo AA (0.31; 326 partos) y genotipo GG (0.69; 724 partos) ($p \leq 0.01$).

Las mutaciones FecX^G, FecX^L y FecX^H muestran un comportamiento similar en tasa de ovulación y prolificidad de acuerdo al genotipo; es decir, el homocigoto

the allelic frequencies for polymorphism FecX^G was similar ($p > 0.05$) in genotype TT (0.49; 514 lambings) and genotype CC (0.51; 536 lambings); for polymorphism FecX^L, it was different in genotype AA (0.31; 326 lambings) and genotype GG (0.69; 724 lambings) ($p \leq 0.01$).

Mutations FecX^G, FecX^L and FecX^H show a similar behavior in ovulation rate and prolificacy according to genotype; that is, the mutated homozygous is sterile with hypoplastic ovaries, in wool breeds Cambridge, Belclare, Lacaune and Romney (Galloway *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2006; Bodin

Cuadro 5. Distribución de los partos asociada a las frecuencias genotípicas del polimorfismo FecX^L en el gen BMP15 de ovejas Pelibuey.**Table 5. Lambing distribution associated to the genotypic frequencies of polymorphism in FecX^L the Pelibuey sheep BMP15 gene.**

Genotipo	Frecuencia genotípica	Simple	Doble	Triple	Asociación de las frecuencias (Número y porcentaje)
AA (+/+)†	0.29	141	156	7	304
		0.46 a	0.51b	0.02c	29 %
GA o AG (+/-) o (-/+)‡	0.05	24	27	1	52
		0.46 a	0.52b	0.02c	5 %
GG (-/-)†	0.66	321	356	17	694
		0.46 a	0.51b	0.02c	66 %
Total	1.00	486	539	25	1050
		0.46	0.52	0.02	100 %

Valores con diferente literal en una fila son diferentes. Equilibrio Hardy-Weinberg (χ^2 , $p \leq 0.01$); †homocigotos; ‡heterocigoto; simple; doble; triple. Total de partos de las ovejas ♦ Values with different letters in a row are different. Hardy-Weinberg equilibrium (χ^2 , $p \leq 0.01$); homozygous; heterozygous; single; double; triple. Total lambings by the ewes.

mutado es estéril con ovarios hipoplásicos, en las razas de lana Cambridge, Belclare, Lacaune y Romney (Galloway *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2006; Bodin *et al.*, 2007). Pero el genotipo homocigoto mutado en ovejas adultas Pelibuey es fértil para el polimorfismo $FecX^G$ y para el $FecX^L$, con 43 y 29 % del total de partos, respectivamente. Además, el análisis de las frecuencias genotípicas en la determinación de los polimorfismos $FecX^G$ y $FecX^L$, muestra una diferencia significativa de partos dobles, 52 y 51 % para los homocigotos mutados TT y AA (X^2 , $p \leq 0.01$). Esto se puede explicar, según Scaramuzzi *et al.* (2011), probablemente porque el gen BMP15 esté involucrado en un complejo con otros genes de la misma familia, como el GDF9 de la tasa de ovulación en las razas Belclare y Cambridge (Hanrahan *et al.*, 2004) y tiene un comportamiento similar al BMP15 (McNatty *et al.*, 2006); muestra un incremento de tasa ovulatoria para heterocigotos, mientras que para homocigotos mutados hay esterilidad con ovarios disfuncionales, pero principalmente al receptor 1B de la BMPR-1B. Éste contrasta con BMP15 y GDF9, ya que el genotipo homocigoto mutante presenta una mayor ovulación, 5-9 folículos, en comparación con 1-2 del genotipo homocigoto silvestre. Esta fertilidad en los homocigotos mutados de la raza Pelibuey, similar al BMPR-1B, se puede deber probablemente a que el homocigoto mutante del BMP15 afecta el desarrollo temprano del ovocito, debido a la respuesta precoz del folículo y de las células de la granulosa a la FSH y LH, que provoca la ovulación y luteinización de numerosos folículos maduros de menor tamaño por la sensibilidad precoz a la LH, dando como resultado, una mayor tasa de ovulación (McNatty *et al.*, 2006; Scaramuzzi *et al.*, 2011). La respuesta favorable en este estudio con los homocigotos mutados para $FecX^G$ y $FecX^L$ al no mostrar esterilidad, se podría deber también a la selección realizada por el productor del rebaño, considerando sólo las ovejas más prolíficas, partos dobles para el pie de cría. En un estudio en el mismo rebaño de ovejas Pelibuey, De Lucas *et al.* (2012) reportan un índice de prolificidad promedio de 1.77, con 1.40 al primer parto; 1.67 a los 2 a 4 años; 1.75, a los 5 a 7 años; y 1.8 de los 8 a 10 años; valores relativamente cercanos a dos corderos por parto.

Los resultados en este estudio muestran una frecuencia significativa en los partos dobles para los homocigotos silvestres y mutados, y para los heterocigotos

et al., 2007). However, the mutated homozygous genotype in Pelibuey adult ewes is fertile for the $FecX^G$ and $FecX^L$ polymorphisms, with 42 and 29 % of the total lambings, respectively. Also, the analysis of genotypic frequencies in the determination of polymorphisms $FecX^G$ and $FecX^L$ shows a significant difference of double lambings, 52 and 51 % for mutated homozygous TT and AA (X^2 , $p \leq 0.01$). This can be explained, according to Scaramuzzi *et al.* (2011) probably because the BMP15 gene is involved in a complex with other genes of the same family, such as GDF9 in the ovulation rate of breeds Belclare and Cambridge (Hanrahan *et al.*, 2004), which has a similar behavior to BMP15 (McNatty *et al.*, 2006); an increase in ovulation rate is shown for heterozygous, while for mutated homozygous there is sterility with dysfunctional ovaries, although mainly to the 1B receptor of the BMPR-1B. This contrasting with BMP15 and GDF9, since the mutated homozygous genotype presented a higher ovulation, 5-9 follicles, in comparison to 1-2 of the wild homozygous genotype. This fertility in the mutated homozygous of the Pelibuey breed, similar to BMPR-1B, can be due probably to the fact that the mutant homozygous of the BMP15 affects the early development of the oocyte, because of the early response of the follicle and the granulosa cells to FSH and LH, provoking the ovulation and luteinization of numerous mature follicles of smaller size from the early sensibility to the LH, resulting in a higher ovulation rate (McNatty *et al.*, 2006; Scaramuzzi *et al.*, 2011). The favorable response in this study with mutated homozygous for $FecX^G$ and $FecX^L$ when not showing sterility could also be due to the selection carried out by the producer of the flock, taking into account only the most prolific ewes, double lambings for the breeding stock. In a study with the same Pelibuey sheep flock, De Lucas *et al.* (2012) report an average index of prolificacy of 1.77, with 1.40 at the first lambing; 1.67 at 2 to 4 years; 1.75 at 5 to 7 years; and 1.8 at 8 to 10 years; these values are relatively close to two lambs per lambing.

The results from this study show a significant frequency in double lambings for wild and mutated homozygous, and for heterozygous (X^2 , $p \leq 0.01$). This trend to obtain more double lambings, in contrast with triple lambings, is convenient and desirable for the producer (Laviña, 2012), because ewes support raising two lambs, physiologically and anatomically.

(X^2 , $p \leq 0.01$). Esta tendencia para obtener más partos dobles, en contraste con partos triples, es conveniente y deseable para el productor (Laviña, 2012), porque las ovejas soportan fisiológica y anatómicamente, criar dos corderos. En ovejas Aragonesa, con la distribución de partos para el polimorfismo $FecX^R$ del gen BMP15, el genotipo heterocigoto presentó un mayor porcentaje en partos triples (Laviña, 2012). Por el contrario, en este estudio, para el polimorfismo $FecX^G$ y para $FecX^L$, los genotipos heterocigotos CT o TC y GA o AG presentaron 2 % de partos triples en 452 partos ($p \leq 0.01$) y 2 % en 52 partos ($p \leq 0.01$). En el caso del gen GDF9, para el índice de prolificidad con el polimorfismo $FecX^G$ en la raza Small Tailed (Chu *et al.*, 2006) hay un aumento de 0.55 para genotipos heterocigotos; en cambio, los homocigotos mutados (TT) son estériles. Un genotipo homocigoto mutado puede indicar esterilidad en razas Romney, Belclare, Lacaune y Cambridge (Davis *et al.*, 2006; Bodin *et al.*, 2007), pero no necesariamente en otras razas. Así, en el genotipo mutado Fec^{SI} en la raza Santa Inés para el gen GDF9 (Silva *et al.*, 2010), es posible que esta mutación no produzca un efecto drástico en la disminución de la actividad de la proteína madura, lo cual permite que en ovejas homocigotas E/E no exista una pérdida total de la acción del GDF9. Esta situación podría suceder con el gen BMP15 en la oveja Pelibuey, en la cual el efecto de los polimorfismos con el genotipo homocigoto mutado del gen BMP15 no causa esterilidad como en otras razas evaluadas.

Evaluación de las secuencias

El análisis de las secuencias es importante en estudios moleculares para mutaciones puntuales. En la presente investigación, los resultados con el análisis y alineamiento de las secuencias del exón 1 y exón 2 representados en los electroferogramas o gráficas de alineación de secuencias, no mostraron variación de la base nucleotídica en la posición, donde los tres polimorfismos presentan las mutaciones mencionadas ($FecX^G$, Figura 2; $FecX^L$, Figura 3; $FecX^H$, Figura 4). No obstante, el alineamiento de las secuencias permitió confirmar la ubicación de las mutaciones de los polimorfismos, $FecX^G$, $FecX^L$ y $FecX^H$, en el exón 2. La falta de claridad en los electroferogramas por suposición de líneas, como lo ocurrido en el estudio de la secuencias del Pelibuey, pueden deberse a

In Aragonesa ewes, with the distribution of lambings for polymorphism $FecX^R$ of the BMP15 gene, the heterozygous genotype presented a higher percentage in triple lambings (Laviña, 2012). On the contrary, in this study, for polymorphism $FecX^G$ and $FecX^L$, the heterozygous CT or TC and GA or AG genotypes presented 2 % of triple lambings in 452 lambings ($p \leq 0.01$) and 2 % in 52 lambings ($p \leq 0.01$). In the case of gene GDF9, for the prolificacy index with polymorphism $FecX^G$ in the Small Tailed breed (Chu *et al.*, 2006), there is an increase of 0.55 for heterozygous genotypes; instead, mutated (TT) homozygous are sterile. A mutated homozygous genotype can indicate sterility in Romney, Belclare, Lacaune and Cambridge breeds (Davis *et al.*, 2006; Bodin *et al.*, 2007), but not necessarily in other breeds. Thus, in the mutated genotype Fec^{SI} in the Santa Inés breed for gene GDF9 (Silva *et al.*, 2010), it is possible that this mutation does not produce a drastic effect on the decrease of activity of the mature protein, allowing for there to not be a total loss of the action of GDF9 in homozygous E/E ewes. This situation could happen with the BMP15 gene in Pelibuey ewes, where the effect of the polymorphisms with the mutated homozygous genotype of the BMP15 gene does not cause sterility as in other breeds evaluated.

Evaluation of the sequences

The analysis of the sequences is important in molecular studies for punctual mutations. In this study, the results with the analysis and alignment of the sequences of exon 1 and exon 2, represented in the electropherograms or sequence alignment graphs, did not show variation of the nucleotide base in the position, where the three polymorphisms present the mutations mentioned ($FecX^G$, Figure 2; $FecX^L$, Figure 3; $FecX^H$, Figure 4). However, the alignment of the sequences allowed confirming the location of the mutations of the polymorphisms, $FecX^G$, $FecX^L$ and $FecX^H$, on exon 2. The lack of clarity in the electropherograms from supposition of lines, as what happened in the study of the Pelibuey sequences, can be due to the insufficient amount of DNA, causing a signal that is too low or the contamination of the DNA by some impure or degraded primer.

la insuficiente cantidad de ADN causando una señal demasiado baja o a la contaminación del ADN por algún cebador mal purificado o degradado.

CONCLUSIONES

Los polimorfismos $FecX^G$ y $FecX^L$ del gen BMP15 fueron determinados por primera vez en la oveja Pelibuey. De los 1050 partos de las 253 ovejas muestreadas, sólo los genotipos homocigotos de dichos polimorfismos se relacionaron con el mayor número de corderos en las ovejas Pelibuey, por tener un mayor número de tipo de parto doble, dado que el genotipo heterocigoto tuvo poca influencia en la variable tipo de parto o prolificidad. Esto probablemente se debe al criterio de selección del productor en el área de estudio, quien usa como pie de cría las hembras

CONCLUSIONS

Polymorphisms $FecX^G$ and $FecX^L$ of the BMP15 gene were determined for the first time in Pelibuey sheep. Out of the 1050 lambings from the 253 ewes sampled, only the homozygous genotypes of the polymorphisms were related with the higher number of lambs in Pelibuey ewes, for having a higher number of the double lambing type, since the heterozygous genotype had little influence on the variable lambing type or prolificacy. This is probably due to the selection criterion of the producer in the study area, who uses the most prolific females as breeding stock, from double lambings. Instead, for polymorphism $FecX^H$ only the wild homozygous genotype was present. The number of prolific ewes studied was limited, so that in order to confirm the effect of

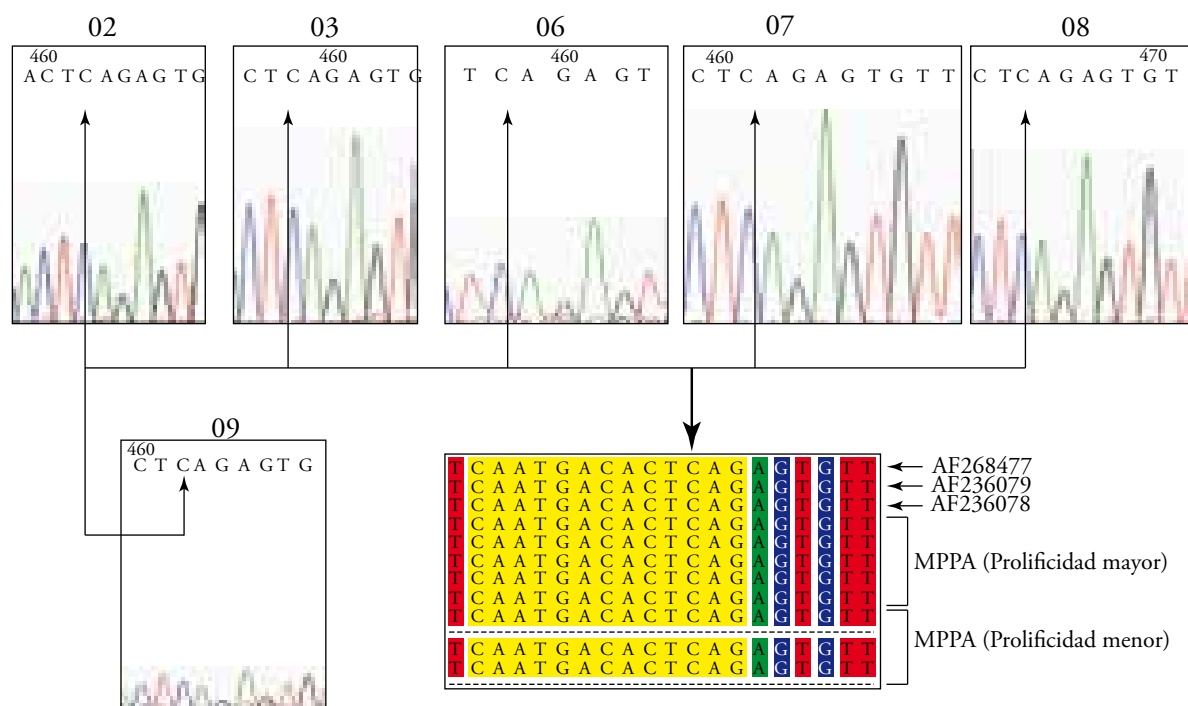


Figura 2. Alineamiento de secuencias del polimorfismo $FecX^G$. Búsqueda de la variación (cambio C por T) en la base nucleotídica, comparando los animales más prolíficos (llave roja) y menos prolíficos (llave morada), con otras secuencias del banco de genes (flechas azules). Los guiones seguidos en el alineamiento se debe a un corte en las secuencias para su correcta comparación en el alineamiento. La flecha roja en los electroferogramas muestra la ubicación de la posible variación en SNP (polimorfismo de un solo nucleótido). Se muestran líneas superpuestas para la observación 06.

Figure 2. Sequence alignment of polymorphism $FecX^G$. Search for variation (C for T change) on the nucleotide base, comparing the most prolific animals (higher prolificacy key) with the least prolific (lower prolificacy key), with other sequences from the gene bank (horizontal arrows). The dashes followed in the alignment are due to a cut in the sequences for their correct comparison in the alignment. The vertical large arrow in the electropherograms shows the location of the possible variation in SNP (single nucleotide polymorphism). Superposed lines are shown for observation 06.

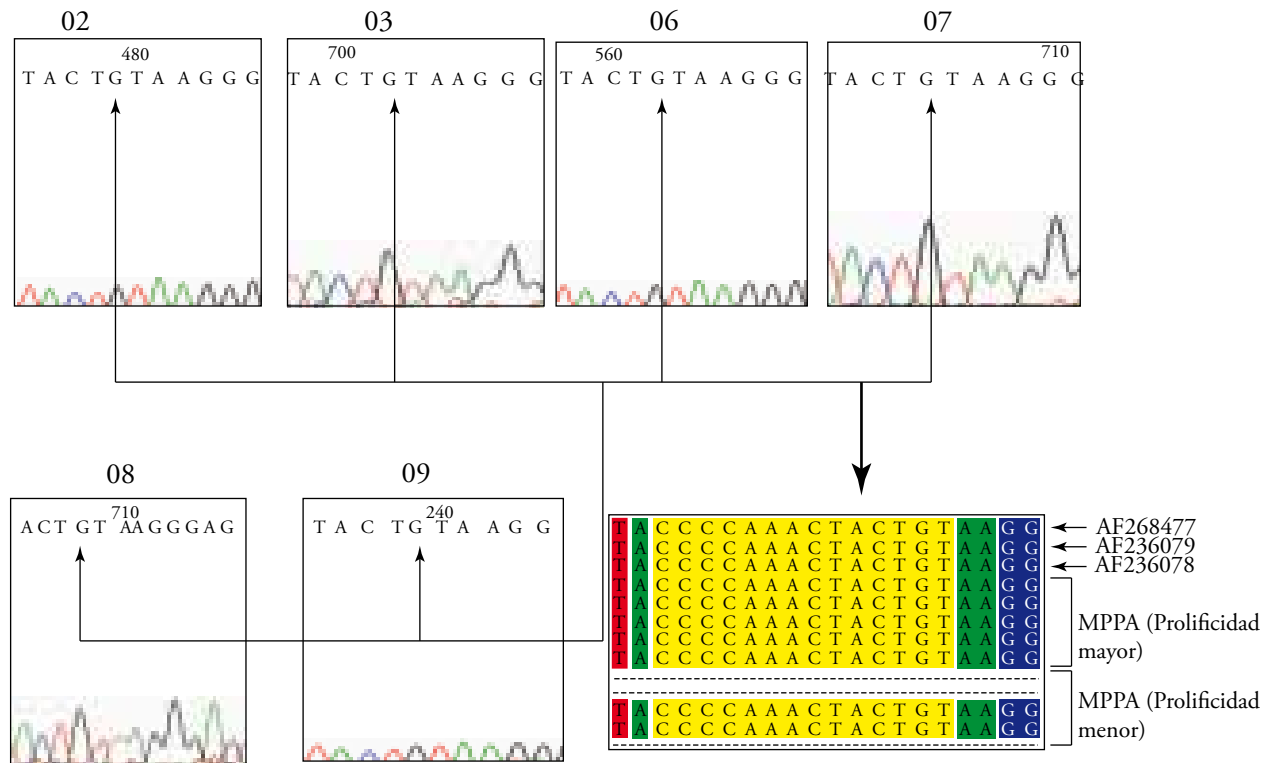


Figura 3. Alineamiento de secuencias del polimorfismo FecX^L. Búsqueda de la variación (cambio G por A) en la base nucleotídica, comparando los animales más prolíficos (llave roja) y menos prolíficos (llave morada), con otras secuencias del banco de genes (flechas azules). Los guiones seguidos en el alineamiento se debe a un corte en las secuencias para su correcta comparación en el alineamiento. La flecha roja en los electroferogramas muestra la ubicación de la posible variación SNP (polimorfismo de un nucleótido simple). Se muestra líneas superpuestas para la observación 08, 03 y 07.

Figure 3. Sequence alignment of polymorphism FecX^L. Search for variation (G for A change) on the nucleotide base, comparing the most prolific animals (higher prolificacy key) with the least prolific (lower prolificacy key), with other sequences from the gene bank (horizontal arrows). The dashes followed in the alignment are due to a cut in the sequences for their correct comparison in the alignment. The vertical large arrow in the electropherograms shows the location of the possible variation in SNP (single nucleotide polymorphism). Superposed lines are shown for observation 03, 07 and 08.

más prolíficas, de partos dobles. En cambio, para el polimorfismo FecX^H sólo se presentó el genotipo homocigoto silvestre. El número de ovejas prolíficas estudiadas fue limitado, por lo que para confirmar el efecto de los homocigotos TT y CC asociados a un número mayor de partos, en especial partos dobles, se debe usar un número mayor de hembras de otras regiones del país con registros de partos, usar el análisis de MPPA, buscar mutaciones en otros genes con efecto en la variable tipo de parto o prolificidad, estudiar la sensibilidad del folículo y las células de la granulosa a la FSH y LH en hembras portadoras y no portadoras de la mutación.

the TT and CC homozygous associated to a higher number of lambings, especially double lambings, a higher number of females from other regions of the country should be used, with lambings records, using the MPPA analysis, seeking mutations in other genes with effects on the variable lambingtype or prolificacy, studying the sensitivity of the follicle and the granulosa cells to FSH and LH in females that carry and do not carry the mutation.

—End of the English version—

—*—

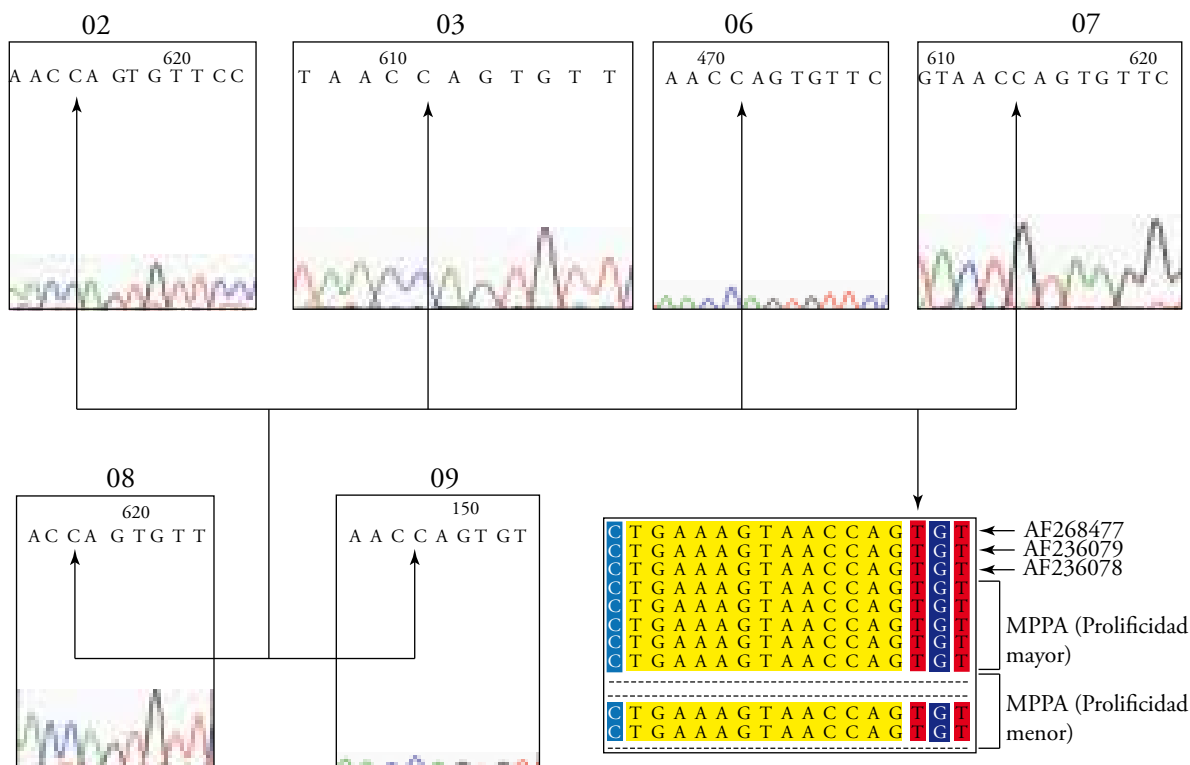


Figura 4. Alineamiento de secuencias del polimorfismo $FecX^H$. Búsqueda de la variación (cambio C por T) en la base nucleotídica, comparando los animales más prolíficos (llave roja) y menos prolíficos (llave morada), con otras secuencias del banco de genes (flechas azules). Los guiones seguidos en el alineamiento se debe a un corte en las secuencias para su correcta comparación en el alineamiento. La flecha roja en los electroferogramas muestra la ubicación de la posible variación SNP (polimorfismo de un nucleótido simple).

Figure 4. Sequence alignment of polymorphism $FecX^H$. Search for variation (C for T change) on the nucleotide base, comparing the most prolific animals (higher prolificacy key) with the least prolific (lower prolificacy key), with other sequences from the gene bank (horizontal arrows). The dashes followed in the alignment are due to a cut in the sequences for their correct comparison in the alignment. The vertical large arrow in the electropherograms shows the location of the possible variation in SNP (single nucleotide polymorphism).

AGRADECIMIENTOS

El primer autor recibió apoyo económico para sus estudios de postgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Este estudio se realizó en el laboratorio de Fisiología de la Interacción Planta Patógeno -Vector- del área de Fitopatología y fue financiado con recursos provenientes de los campus San Luis Potosí y Montecillo, del Fideicomiso para la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del Colegio de Postgraduados (Modalidad financiamiento a proyectos de investigación de tesis 2011) y de la Línea Prioritaria de Investigación LPI-5 (Biotecnología Microbiana, Vegetal y Animal).

LITERATURA CITADA

- Bodin, L., E., Pasquale, S., Fabre, M., Bontoux, M., Morget, P., Persani, and P. Mulsant. 2007. A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. *Endocrinology* 148: 393-400.
- Borni, J., B. Sonia, and D. M. Nauer. 2011. Study for identification $FecX^I$ and $FecX^H$ mutations in Tunisian Barbarine sheep. *ROAVS* 1(2): 112-115.
- Chu, M. X., Z. H. Liu, C. L. Jiao, Y. Q. He, L. Fang, S. C. Ye, G. H. Chen, and J. Y. Wang. 2006. Mutations in BMPR-IB and BMP15 genes are associated with litter size in Small Tailed Han Sheep (*Ovis aries*). *J. Anim. Sci.* 85: 598-603.

- Crow, J. F. 1999. Hardy, Weinberg and language impediments. *Genetics* 152(3): 821-5.
- Davis, G. H., L. Balakrishnan, I. K. Ross, T. Wilson, S. M. Galloway, and B. M. Lumsden. 2006. Investigation of the Booroola (FecB) and Inverdale (FecX(I)) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. *Anim. Reprod. Sci.* 92(1-2): 87-96.
- De Lucas, T. J., R. M. Pérez, y F. O. Salvador. 2012. Parámetros reproductivos en ovinos de la raza Pelibuey. *SEOC 2012 PROD 252-O*. 386 p.
- Dickson, L., H. G. Torres, R. D. Aubeterre, y O. García. 2004. Factores que influyen en el intervalo entre partos y la prolificidad de un hato de carneros Pelibuey en Venezuela. *Rev. Cub. Ciencia Agríc.* 38: 13-17.
- Galloway, S. M., K. P. McNatty, L. M. Cambridge, M. P. Laitinen, J. L. Juengel, T. S. Jokiranta, R. J. McLaren, K. Luiro, K. G. Dodds, G. W. Montgomery, A. E. Beattie, G. H. Davis, and O. Ritvos. 2000. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genet.* 25: 279-283.
- Gonzalez-Reyna, A., J. Valencia, W. Foote, and B. D. Murphy. 1991. Hair sheep in Mexico: reproduction in the pelibuey sheep. *Anim. Breed. Abstr.* 59: 509-524.
- Hanrahan, J. P., S. M. Gregan, P. Mulsant, M. Michael, G. H. Davis, R. Powell and S. M. Galloway. 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*). *Biol. Reprod.* 70: 900-909.
- Herrera, H. J. G., C. F. Lemus, y S. A. Barrera. 2003. *Mejoramiento Genético Animal un Enfoque Aplicado*. 1a. ed. Colegio de Postgraduados, Estado de México, México. 151 p.
- Hongcai, S., J. Bai, Z. Niu, Muniresha, L. Fen, and B. Jia. 2010. Study on candidate gene for fecundity traits in Xingjiang Cele black sheep. *Afr. J. Biotechnol.* 9(49): 8498-8505.
- I.N.E.G.I. 1990. VI Censo, Estado de Campeche. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México.
- Laviña, G. A. 2012. Identificación de la delección FecXR del gen Ovino BMP15 en la raza Aragonesa: su implicación en la mejora genética de la prolificidad y su difusión en la cabaña ganadera. Tesis Doctoral. Farmacología y Fisiología. Departamento de Farmacología y Fisiología, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.
- McNatty, K. P., N. L. Hudson, P. Smith, and J. L. Juengel. 2006. The effects of superovulating sheep with mutations in either the activina-like kinase (ALK6) or bone morphogenetic protein (BMP15) genes on ovulation rate and embryo production. *J. Reprod. Develop.* 52: S39-S43.
- Monteagudo, L. V., R. Ponz, T. M. Tejedor, A. Laviña, and I. Sierra. 2009. A 17 bp deletion in the bone morphogenetic protein 15 (BMP15) gene is associated to increased prolificacy in the rasa Aragonesa sheep breed. *Anim. Reprod. Sci.* 110: 139-146.
- Moradband, F., G. Rahimi, and M. Gholizadeh. 2011. Association of polymorphisms in fecundity genes of GDF9, BMP15 and BMP15-1B with litter size in Iranian Baluchi sheep. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 24 (9): 1179 – 1183.
- Polley, S., S. De, S. Batabyal, R. Kaushik, P. Yadav, J. Singh A., S. Chattopadhyay, S. Pan, B. Brahma, T. K. Datta, and S. L. Goswami. 2009. Polymorphism of fecundity genes (BMP1B, BMP15 and GDF9) in the Indian prolific Black Bengal goat. *Small Rumin. Res.* 85: 122-129.
- Reineke, A., C. P. Karlovsky, and W. P. Zebitz. 1998. Preparation and purification of DNA from insects for AFLP analysis. *Insect Mol. Biol.* 7: 95-99.
- Sambrook, J., F. E. Fritsch, and T. Maniatis. 1994. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Scaramuzzi, R. J., D. T. Baird, B. K. Campbell, M. A. Driancourt, J. Dupont, J. E. Fortune, R. B. Gilchrist, G. B. Martin, K. P. McNatty, A. S. McNeilly, P. Monget, D. Monniaux, C. Viñoles, and R. Webb. 2011. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reprod. Fertility Develop.* 23: 444-467.
- Segura, J. C., L. Sarmiento, and O. Rojas. 1996. Productivity of Pelibuey and Blackbelly ewes in Mexico under extensive management. *Small Ruminant Res.* 21: 57-62.
- Silva, B. D., E. A. Castro, C. J. Souza, S. R. Paiva, R. Sartori, M. M. Franco, H. C. Azevedo, T. A. Silva, A. M. Vieira, J. P. Neves, and E. O. Melo. 2010. A new polymorphism in the growth and differentiation factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. *Anim. Genet.* 42: 89-92.
- Ye, S., S. Dhillon, X. Ke, A. R. Collins, and I. N. Day. 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 29: e88-e98.