

# Genes con efecto mayor sobre la fertilidad de ovejas. Revisión

## Genes with major effect on fertility in sheep. Review

Carlos Luna Palomera<sup>a</sup>, Rogelio Alejandro Alonso Morales<sup>b</sup>

### RESUMEN

El estudio genético en razas de ovejas que naturalmente presentan altas tasas de ovulación (TO) y de prolificidad, ha permitido detectar la participación de varios genes. Entre ellos están los relacionados a la superfamilia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (BMPR1B, GDF9 y BMP-15), así como de otros genes con efecto mayor, tales como el "distal-less homeobox 3" (Fecl), el receptor de estrógenos (ESR), el receptor de prolactina (PRLR) y el de las inhibinas (INHA y INHB). Sin embargo, las ovejas homocigotas para la mayoría de las variantes alélicas en BMP-15 o GDF9 son estériles, por lo que es importante el entendimiento de las bases genéticas y moleculares de estos polimorfismos, para su uso en programas racionales de mejoramiento genético con énfasis en la prolificidad. El polimorfismo en el gen de la melatonina (MTNR1) se ha asociado con la no estacionalidad reproductiva en ovejas. La selección en varias razas de ovejas para estas características ha reducido significativamente el anestro estacional, mostrando actividad reproductiva durante la primavera y el verano. Sin embargo, parece ser que estos genes en algunas razas pueden estar interactuando aditivamente, y una variante alélica en una raza puede no aparecer en otra, o bien dos al mismo tiempo, por lo que son variados los mecanismos genéticos que afectan la tasa ovulatoria y prolificidad.

**PALABRAS CLAVE:** Genes de fecundidad, BMP-15, BMPR1B, ALK6, ESR, Inhibina, MTNR1, PRLR.

### ABSTRACT

The genetic study on sheep breeds with naturally high ovulation rate (OR) and prolificacy, has allowed to detect the participation of several genes. Among them there are the ones related to the transforming growth factor-beta superfamily (BMPR1B, GDF9 and BMP-15), as well as to other genes with major effect, such as the distal-less homeobox 3' (Fecl), estrogen receptor (ESR), prolactin receptor (PRLR) and inhibin receptor (INHA and INHB). However, sheep homozygous for the majority of the allelic variants in BMP-15 or GDF9 are sterile, for which it is important the understanding of the genetic and molecular basis of these polymorphisms, for their use in rational programs of genetic improvement on prolificacy. Polymorphism in the melatonin gene (MTNR1) has been associated with non-reproductive seasonality in sheep. Selecting several sheep breeds for these characteristics has significantly reduced the seasonal anoestrus, showing reproductive activity during spring and summer. It seems that these genes in some breeds may be interacting additively and an allelic variant in a breed may not be present in other, or two be present at the same time; therefore, the understanding of the genetic mechanisms that affect ovulation rate and prolificacy are important for the selection of reproductive traits.

**KEY WORDS:** Fecundity genes, BMP-15, BMPR1B, ALK6, ESR, Inhibin, MTNR1, PRLR.

### INTRODUCCIÓN

La oveja es una especie diversa con gran variabilidad genética en características fisiológicas, fertilidad y el desarrollo muscular,

### INTRODUCTION

Sheep is a domestic species with high genetic variability of physiological characteristics, fertility and muscular development and has become an

Recibido el 21 de mayo de 2012. Aceptado el 28 de septiembre de 2012.

<sup>a</sup> División Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Av. Universidad S/N, Zona de la Cultura, Col. Magisterial, Villahermosa, 86040 Tabasco, México. carlos.luna@ujat.mx. Correspondencia al primer autor.

<sup>b</sup> Departamento de Genética y Bioestadística. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México.

y se ha constituido en un importante modelo experimental en el estudio de los genes que controlan estos mecanismos<sup>(1)</sup>. Sin embargo, poblaciones no seleccionadas que incluyen a las locales y nativas, están amenazadas y sufren erosión genética<sup>(1)</sup>. Algunas razas son portadoras de muchas variantes y es una buena razón para su conservación y estudio. La fertilidad en las hembras está influida en gran medida por la tasa ovulatoria (TO), definida por el número de ovocitos liberados durante un ciclo reproductivo; estos responden a su vez a un complejo 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, el ovocito y las células somáticas adyacentes controlados genéticamente<sup>(2-9)</sup>.

Recientemente se han encontrado variaciones importantes en la tasa de ovulación. Estas variantes genéticas en las ovejas se nombran como Fec (de fecundidad) y a los diferentes alelos se les asigna adicionalmente una letra significativa. Así, FecB se refiere al alelo que aumenta la fertilidad en la raza Booroola. Se han identificado polimorfismos en genes específicos como en el gen GDF-9 (growth differentiation factor-9) llamado también FecG<sup>(10,11)</sup>, en el gen BMP15 (bone morphogenetic protein 15) o FecX<sup>(2,10,12,13)</sup>, así como en el gen ALK-6 que produce la proteína activin-like kinase<sup>(6,14)</sup>. Igualmente, se han identificado polimorfismos en el receptor tipo IB de la proteína morfogénica de hueso (BMPR-IB), conocido como FecB<sup>(14-18)</sup>.

Este conjunto de genes tienen un efecto mayor en la regulación de la tasa de ovulación y fertilidad, y sus polimorfismos se han estudiado ampliamente en varias razas ovinas<sup>(3,7,19)</sup>. El estudio de estos genes ha dado luz al conocimiento y a la exploración de las vías biológicas implicadas en el control de la ovulación en mamíferos en general<sup>(20)</sup>.

Se han encontrado genes candidatos que pueden impactar positivamente la prolificidad y

important experimental model in the study of genes that control these mechanisms<sup>(1)</sup>. However, non-selected populations that include local and native ones are endangered and suffer genetic erosion<sup>(1)</sup>. Some breeds are carriers of many genetic variants, thus is a good reason for their conservation and study. Fertility in ewes is largely influenced by ovulation rate (OR), defined as the number of oocytes released during a reproductive cycle; these, in turn, respond to a genetically controlled complex exchange of endocrine signalling between the pituitary gland and the ovary, associated with paracrine and autocrine signalling, as well as signalling factors in the follicular cells, oocyte and adjacent somatic cells<sup>(2-9)</sup>.

Recently, important variations in the ovulation rate have been found. These genetic variations in sheep are named as Fec (fecundity) and to the different alleles a significant letter is additionally assigned. Therefore, FecB refers to the allele that increases fertility in the Booroola breed. Polymorphisms in specific genes such as: GDF-9 gene (growth differentiation factor-9) also known as FecG<sup>(10,11)</sup>, BMP15 gene (bone morphogenetic protein 15) or FecX<sup>(2,10,12,13)</sup>, as well as in ALK-6 gene that produces activin-like kinase protein have been identified<sup>(6,14)</sup>. Likewise, polymorphisms in bone morphogenetic protein receptor type-IB (BMPR-IB), known as FecB have been identified<sup>(14-18)</sup>.

This set of genes has major effect on the regulation of ovulation rate and fertility and their polymorphisms have been widely studied in several sheep breeds<sup>(3,7,19)</sup>. The study of these genes sheds light on the knowledge and exploration of biological routes involved in the control of ovulation in mammals in general<sup>(20)</sup>.

Candidate genes that could have a positive impact on prolificacy and fertility in ewes have been found. The inhibin alpha gene (INHA) has been proposed as a gene with major effect on prolificacy, some alleles in goats increase litter size<sup>(21,22)</sup>. The inhibin beta gene (INHB) has also been proposed as gene with major effect

## GENES CON EFECTO MAYOR SOBRE LA FERTILIDAD DE OVEJAS. REVISIÓN

fertilidad en ovejas. El gen de la inhibina alfa (INHA) ha sido propuesto como gen con efecto mayor sobre la prolificidad, algunos alelos en cabras incrementan el tamaño de la camada<sup>(21,22)</sup>. El gen de la inhibina beta (INHB), también se ha propuesto con efecto mayor sobre prolificidad e incrementa el tamaño de camada en algunas razas de ovejas<sup>(23)</sup>.

Se ha encontrado variación en los genes para receptores de melatonina (MTNR1) y prolactina (PRLR), involucrados en el control de la estacionalidad reproductiva, lo que puede permitir la implementación de programas de selección intensiva ligada a marcadores moleculares fuera de épocas reproductivas<sup>(24,25)</sup>. Probablemente estos genes pueden estar implicados en la variabilidad estacional reportada en ovinos de pelo en México.

El estudio en conjunto de estos genes y sus mecanismos genéticos a nivel molecular permitirá comprender la forma como participan en la regulación de la prolificidad y fertilidad.

El propósito de este trabajo es hacer un recuento de los principales genes identificados, que participan en el control de la tasa de ovulación, la prolificidad y la estacionalidad reproductiva en la oveja, así como describir los mecanismos genéticos que están actuando a nivel molecular.

#### *Control genético de la tasa ovulatoria y prolificidad*

La variación en la fertilidad, prolificidad y tasa ovulatoria se ha observado en diferentes razas ovinas, lo cual está genéticamente regulado por un conjunto de genes con acción mayor o aditiva, los cuales pertenecen a la súper familia de los factores de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ )<sup>(2)</sup>. Los cambios en las secuencias de los alelos en los genes, incluyen cambios en un nucleótido por otro, que llevan a su vez a cambios en la secuencia de aminoácidos. lo cual influye en la función de la proteína debido a cambios en sus actividades y plegamiento. Así mismo, se han descrito en estos genes

on prolificacy, since it increases litter size in some sheep breeds<sup>(23)</sup>.

Variation in genes for melatonin receptors (MTNR1) and prolactin (PRLR), involved in the control of the reproductive seasonality have been found, which can allow the implementation of intensive selection of programs linked to molecular markers outside the reproductive seasonality<sup>(24,25)</sup>. Probably, these genes may be involved in the seasonal variability reported in hair sheep in Mexico.

The comprehensive study of these genes and their genetic mechanisms at molecular level, will allow the understanding of the way they participate in the regulation of prolificacy and fertility.

The objective of this study was to account the main genes identified, which participate in the control of ovulation rate, prolificacy and reproductive seasonality in sheep, as well as to describe the genetic mechanisms operating at molecular level.

#### *Genetic control of ovulation rate and prolificacy*

Variability in fertility, prolificacy and ovulation rate has been observed in different sheep breeds, which is genetically regulated by a set of genes with major or additive action that belong to the transforming growth factor-beta superfamily (TGF- $\beta$ )<sup>(2)</sup>. Sequence changes in alleles include changes in one nucleotide by other, which lead to sequence changes in amino acids, having an influence in protein function due to changes in their activities and folding. Likewise, indel and nonsense mutations in these genes have been described<sup>(26,27)</sup>. Other type of sequence changes may affect the levels of gene expression or RNA stability<sup>(18,19)</sup>.

The main mutations or polymorphisms that increase the ovulation rate and affect fertility are localized in BMP-15 gene (Inverdale, Hanna, Belclare, Cambridge and Lacaune breeds), BMPR-1B receptor (Booroola breed) and GDF-9

indeles y mutaciones sin sentido<sup>(26,27)</sup>. Otro tipo de cambios en la secuencia pueden afectar los niveles de expresión génica o la estabilidad del ARN<sup>(18,19)</sup>.

Las principales mutaciones o polimorfismos que incrementan la tasa de ovulación y afectan la fecundidad se ubican en el gen BMP-15 (razas Inverdale, Hanna, Belclare, Cambridge y Lacaune), el gen del receptor BMPR-IB (raza Booroola) y el gen GDF-9; adicionalmente al parecer hay otros genes implicados que se abordarán en los apartados siguientes de esta revisión.

### **Gen de la proteína morfogénica de hueso (BMP-15)**

También conocido como inverdale (Fec X<sup>I</sup>), fue uno de los primeros genes reportados con efecto mayor sobre la tasa de ovulación en ovejas Romney<sup>(2,28)</sup>. El locus FecX<sup>I</sup> se encuentra localizado en una región a 10 centimorgans (cM) del centro del cromosoma X. La secuenciación del gen ovino muestra ser similar a la del humano (~80 %), ratón (~76 %) y rata (~75 %), siendo de una longitud de 1,179 pb contenida en dos exones<sup>(3)</sup>.

La proteína BMP-15 actúa a través de una cascada de proteínas señaladoras (vía Smad), que son responsables de un enorme rango de comportamientos fisiológicos a nivel celular, incluyendo el desarrollo y maduración de ovocitos<sup>(9,29-31)</sup>. Los efectos biológicos de los BMPs son mediados por receptores celulares de superficie específicos tipo I y tipo II, estructuralmente similares; ambos poseen actividad serina/treonina cinasa intrínseca, cuya estimulación inicia cascadas de señalización intracelular que regulan eventos transcripcionales esenciales para la proliferación y la diferenciación celular<sup>(32)</sup>. Existen dos receptores BMP tipo I, el BMPR-IA (o ALK-3) y BMPR-IB (o ALK-6), y de los receptores tipo II sólo se ha identificado el BMPR-II. Los receptores BMP tipo I y II se unen al ligando, pero la señal de transducción por el receptor BMP, requiere la formación de un complejo heterodimérico entre ambos

gene; additionally, there are other genes involved which are dealt in the following sections.

### **Bone morphogenetic protein 15 (BMP-15)**

Also called inverdale (FecX<sup>I</sup>), was one of the first genes reported with major effect on ovulation rate in Romney sheep<sup>(2,28)</sup>. FecX<sup>I</sup> locus is localized in a region at 10 centimorgans (cM) of the X chromosome centre. The sequence of sheep gene shows to be similar to that of human (~80 %), mouse (~76 %) and rat (~75 %), with a length of 1,179 bp contained in two exons<sup>(3)</sup>.

The BMP-15 protein acts through a cascade of signalling proteins (Smad pathway), which are responsible of a wide range of physiological behaviours at the cellular level, including growth and maturation of oocytes<sup>(9,29,31)</sup>. The biological effects of BMPs are mediated by specific cell surface type I and type II receptors, structurally similar; both possess serine/threonine intrinsic kinase activity, whose stimulation initiates intracellular signalling cascades that regulate transcriptional events essential for cellular proliferation and differentiation<sup>(32)</sup>. There are two type I BMP receptors: BMPR-IA (or ALK-3) and BMPR-IB (or ALK-6) and of type II receptors, only BMPR-II has been identified. The type I and II BMP receptors bind to a ligand, but the signal transduction for BMP receptor requires the formation of a heterodimeric complex between both receptors. Once the BMPR-ligand complex is formed, type II receptor, which has constitutive kinase activity, phosphorylates and activates type I receptor, which at its moment triggers BMP signalling events. Messenger RNA (mRNA) of BMPs and its receptors have been localized in mammalian oocytes<sup>(9)</sup>.

In this process, Smad molecular signalling of BMP at intracellular level plays a very important role; female double knockout Smad1 and Smad5 mice are infertile and demonstrate metastatic tumours in granulosa cells<sup>(33)</sup>. In Chinese Hu sheep breed, the abundance of mRNAs within

## GENES CON EFECTO MAYOR SOBRE LA FERTILIDAD DE OVEJAS. REVISIÓN

receptores. Una vez formado el complejo BMPR-ligando, el receptor tipo II, el cual tiene actividad cinasa constitutiva, fosforila y activa al receptor tipo I, el cual en su momento dispara los eventos de señalización BMP. El ARN mensajero (ARNm) de BMPs y sus receptores han sido localizados en ovocitos de mamíferos<sup>(9)</sup>.

En este proceso las moléculas Smad señalizadoras a nivel intracelular de BMP cumplen una función muy importante; en ratones Knockout las hembras doble condición Smad1 y Smad5 son infértiles y desarrollan tumores metastásicos en las células de la granulosa<sup>(33)</sup>. En ovejas chinas de la raza Hu, la abundancia de ARNm de Smad4 en los folículos antrales es mayor en ovejas con alta prolificidad (HF) comparada con ovejas de baja prolificidad (LF), lo cual sugiere que la diferencia puede estar asociada con la tasa de ovulación, y atribuido al hecho de que Smad4 es un par común esencial tanto para la vía TGF- $\beta$ /activina como para BMP<sup>(9,34)</sup>.

Los cambios nucleotídicos en el gen BMP-15 producen un incremento de al menos 1.0 en la tasa ovulatoria y 0.6 en el tamaño de camada<sup>(2,33)</sup>, asociado a una mayor sensibilidad de los folículos a la FSH; sin embargo, la BMP-15 se expresa en el ovocito de varias especies y es un gen candidato para el fenotipo asociado con el tamaño de camada en ovejas<sup>(3,35)</sup>.

El cambio del alelo FecX<sup>H</sup> consiste en una transición de una citosina (C) por una timina (T) en el nucleótido 67 (C67T) de la región codificante para el péptido maduro (aminoácido 291 del péptido no procesado), que introduce un codón de paro prematuro en la secuencia (Cuadro 1), lo cual muy probablemente resulta en una pérdida de la función de la BMP-15 en los homocigotos para esta variante FecX<sup>H</sup><sup>(3)</sup>.

El cambio de base en el gen FecX<sup>I</sup> consiste en una transversión de una sola T por adenina (A) en la posición 92 (T92A) del gen, resultando en la sustitución de una valina por un ácido aspártico en una región altamente conservada

Smad4 in antral follicles is greater in sheep with high prolificacy (HF) than in sheep with low prolificacy (LF), which suggests that this difference may be associated with ovulation rate and attributed to the fact that Smad4 is an essential common factor either for via the TGF- $\beta$ /activin pathway or for BMP<sup>(9,34)</sup>.

Nucleotide changes in BMP-15 gene produce an increase of at least 1.0 in ovulation rate and 0.6 in litter size<sup>(2,33)</sup>, associated with higher follicle sensitivity to FSH; the BMP-15 gene is expressed in the oocyte of several species and is a candidate gene for the phenotype associated with litter size in sheep<sup>(3,35)</sup>.

Nucleotide change of FecX<sup>H</sup> allele consists in a transition of one cytosine (C) to thymine (T) in the nucleotide 67 (C67T) of the mature peptide-encoding region (amino acid 291 of the unprocessed peptide), which introduces a premature stop codon in the sequence (Table 1), which probably results in a loss of BMP-15 function in homozygous for this FecX<sup>H</sup> variant<sup>(3)</sup>. A base change in FecX<sup>I</sup> gene consists in a transversion of a single T to adenine (A) in gene position 92 (T92A), resulting in the substitution of valine to aspartic acid in a highly conserved region of the protein<sup>(35)</sup>. This change seems to weaken BMP-15 ability to form dimers and interferes with the biological action of BMP-15 in sheep homozygous for this FecX<sup>I</sup> variant<sup>(3)</sup>. A base change in FecX<sup>G</sup> allele is a transition of a C to a T in nucleotide 718 (C718T) and introduces a premature stop codon in amino acid 239 of the unprocessed protein<sup>(7)</sup> (Table 1) and presumably results in the complete loss of BMP-15 function<sup>(35,36)</sup>. The variation introduces a change from arginine to histidine, which substitute a basic charged polar group by other and it occurs in a position before the cut site in the mature peptide, invariably affecting the activity of the mature protein<sup>(37)</sup>.

A single nucleotide polymorphism in FecX<sup>B</sup> gene consist of a transition of a G to T in nucleotide 1100 (G1100T), substituting serine for isoleucine at amino acid position 367 of the unprocessed

Cuadro 1. Genes reportados con efecto mayor en la fecundidad y tasa de ovulación en ovinos

Table 1. Genes reported with major effect on fertility and ovulation rate in sheep

Name of phenotype	Gene (chromosome)	Allele Allele	Base change	Mutation position at the mature propeptide/peptide	Reported breed	Reference
Inverdale	BMP15 (X)	FecX <sup>I</sup>	C-T	V299D/V31D	Romney	Galloway <i>et al.</i> (2)
Hanna	BMP15 (X)	FecX <sup>H</sup>	C-T	Q291Stop/Q23Stop	Romney	Galloway <i>et al.</i> (2)
Belclare	BMP15 (X)	FecX <sup>B</sup>	G-T	S367I/S99I	Belclare	Hanrahan <i>et al.</i> (10)
Galway	BMP15 (X)	FecX <sup>G</sup>	C-T	T239Stop/No	Belclare, Cambridge, Moghani, Ghezel	Hanrahan <i>et al.</i> (10); Barzegari <i>et al.</i> (36)
Lacaune linked to X	BMP15 (X)	FecX <sup>L</sup>	G-A	C321Y/C53Y	Lacaune	Bodin <i>et al.</i> (12)
Aragonesa	BMP15 (X)	FecX <sup>R</sup>	-	-	Aragonesa	Martínez-Royo <i>et al.</i> (39); Monteagudo <i>et al.</i> (13)
Lacaune	Lacaune (11)	FecL	-	-	Lacaune	Drouilhet <i>et al.</i> (20)
High fertility	GDF9 (5)	FecG <sup>H</sup>	C-T	S395F/S77FR87H, E241K, V332I, V371M	Belclare, Cambridge, Garole	Hanrahan <i>et al.</i> (10); Polley <i>et al.</i> (47)
Embrapa	GDF9 (5)	FecG <sup>E</sup>	-	-	Santa Inés	Silva <i>et al.</i> (11)
Booroola	ALK6 (6)	FecB <sup>B</sup>	A-G	Q249R	Merino, Garole, Javanese, Hu, Han	Mulsant <i>et al.</i> (15); Souza <i>et al.</i> (16); Wilson <i>et al.</i> (14); Davis <i>et al.</i> (17); Davis <i>et al.</i> (36)

de la proteína<sup>(35)</sup>. Este cambio parece debilitar la habilidad de la BMP-15 para formar dímeros, e interfiere con la acción biológica de la BMP-15 en ovejas homocigotas para esta variante FecX<sup>I</sup>(3).

El cambio de base en el alelo FecX<sup>G</sup> es una transición de una C por T en el nucleótido 718 (C718T), e introduce un codón de paro prematuro en el aminoácido 239 de la proteína no procesada<sup>(7)</sup> (Cuadro 1), y presumiblemente resulta en pérdida completa de la función del BMP-15<sup>(35,36)</sup>. La variante introduce un cambio de una arginina por una histidina, la cual sustituye un grupo polar cargado básico con otro, y ocurre en una posición antes del sitio de corte en el péptido maduro, e invariablemente afecta la actividad de la proteína madura<sup>(37)</sup>.

El polimorfismo sencillo en el gen FecX<sup>B</sup> también es una transición de una G por T en el nucleótido 1100 (G1100T), sustituyendo una serina por una isoleucina en la posición 367 del aminoácido del péptido no procesado (aminoácido 99 de la proteína madura, Cuadro 1)<sup>(7)</sup>.

El cambio de base en el gen FecX<sup>L</sup> afecta al gen BMP-15, y se ha demostrado que segrega

peptide (amino acid 99 of the mature protein) (Table 1)<sup>(7)</sup>.

The allele FecX<sup>L</sup> has been demonstrated that segregates in Lacaune sheep population increasing (2.0) ovulation rate. This allele (Table 1) consists in a change from amino acid cysteine to tyrosine at position 53, responsible of a dramatic alteration in the processing of BMP-15 peptide<sup>(37)</sup>.

In the Aragonesa breed<sup>(38)</sup>, FecX<sup>R</sup> allele consists in 17 base-pair deletion (bp) that leads to an alteration in the sequence of amino acids, introducing a premature stop codon, for which the mature peptide is not synthesized. This alteration increases prolificacy in heterozygous sheep with 2.66 lambs per lambing, in comparison with 1.36 lambs per lambing in ewes without mutation (Table 2), but in homozygous ewes it causes infertility because of primary ovarian failure<sup>(13,38,39)</sup>. Therefore, selection of females with this type of polymorphism increases twin or multiple births in heterozygous, but it also increases the probability of homozygous, resulting freemartin lambs and therefore sterile<sup>(39-41)</sup>. The homozygous ewes present small and flattened ovaries with follicles that

## GENES CON EFECTO MAYOR SOBRE LA FERTILIDAD DE OVEJAS. REVISIÓN

en la población de ovejas Lecaune incrementando la tasa ovulatoria en cerca de 2.0. Este alelo (Cuadro 1) consiste en un cambio de un aminoácido cisteína por una tirosina en la posición 53, responsable de una alteración dramática en el procesamiento del péptido BMP-15<sup>(37)</sup>.

En la raza Aragonesa<sup>(38)</sup>, el alelo FecX<sup>R</sup> consiste en una delección de 17 pares de bases (pb) que lleva a una alteración en la secuencia de aminoácidos, introduciendo un codón de paro prematuro, por lo que no se sintetiza el péptido maduro. Esta alteración incrementa la prolificidad en ovejas heterocigotas con 2.66 corderos por parto, comparada con 1.36 corderos por partos en hembras sin la mutación (Cuadro 2), pero en las ovejas homocigotas causa esterilidad debido a fallas ováricas primarias<sup>(13,38,39)</sup>. Por lo tanto, la selección de hembras con este tipo de polimorfismos incrementa la tasa de partos gemelares o múltiples en heterocigotas, pero también incrementa la probabilidad de homocigotos, resultando en corderas freemartins y por tanto estériles<sup>(39-41)</sup>. Las ovejas homocigotas presentan ovarios pequeños y aplanados con folículos que no se desarrollan hasta la etapa de folículos primarios<sup>(2,10,6,38)</sup>, lo que resulta en completa infertilidad<sup>(10,13)</sup>.

Por otra parte, ya se han iniciado estudios para evaluar las ventajas potenciales que ofrece el uso estratégico de ovejas con estas mutaciones en la producción de corderos, asociado a estrategias de manejo reproductivo y nutricionales<sup>(42,43)</sup>, las cuales ofrecen beneficios potenciales en la producción de corderos.

Recientemente se han reportan alelos del gen BMP-15 en las raza Aragonesa en España, las denominadas cola grasa de Malasia (razas Afshari, Baluchi, Makui y Mehraban) y en las razas Banpalas y del valle de Kashmir en la India, asociados a mayor prolificidad en las ovejas heterocigotas<sup>(39,42-46)</sup>.

Por tanto, la proteína madura BMP-15 es un factor clave en la determinación de la tasa de

do not develop into primary follicles<sup>(2,6,10,38)</sup>, resulting in complete infertility<sup>(10,13)</sup>.

On the other hand, studies are starting to evaluate potential advantages that offer strategic use of ewes with these mutations in the production of lambs, associated with reproductive management and nutritional strategies<sup>(42,43)</sup>, which offer potential benefits in lamb production.

Recently, alleles of BMP-15 gene have been reported in Aragonesa breed in Spain, known as Malaysian fat-tailed sheep (Afshari, Baluchi, Makui and Mehraban breeds) and in Banapala breed and from Kashmir Valley, India, associated with higher prolificacy in heterozygous sheep<sup>(39,42-46)</sup>.

Therefore, BMP-15 mature protein is a key factor in the determination of ovulation rate and mammalian fertility<sup>(47)</sup> and in heterozygous ewes with any type of polymorphism of BMP-15 gene (FecX<sup>I</sup>, FecX<sup>H</sup>, FecX<sup>G</sup>, FecX<sup>B</sup>, FecX<sup>L</sup> and FecX<sup>R</sup>), it has been reported that there is high ovulation rate in comparison with those having wild type gene<sup>(6,13,38-40)</sup>.

### Activin-like kinase gene (ALK6)

Also known as bone morphogenetic protein receptor type IB (BMPRI<sup>B</sup>) and Booroola (FecB)<sup>(14-17,33)</sup>. It was one of the first loci reported with major effect on ovulation rate in Merino sheep<sup>(41)</sup>, having an additive effect. The increase in ovulation rate in FecB<sup>B</sup> carriers, is physiologically associated with higher FSH levels and with precocious maturation of great number of antral follicles, which are smaller in comparison with the wild type<sup>(6)</sup>.

The FecB allele has been reported in the most prolific breeds in the world, such as the Australian Booroola Merino<sup>(16)</sup>; Garole Indian<sup>(17)</sup>, whose gene has shown high degree of polymorphism<sup>(48)</sup>; Javanese Indonesia<sup>(17)</sup> and in Small Tail Han and Hu sheep in China<sup>(18)</sup> The litter size and ovulation rate in sheep increases with the ALK6 gene copy number<sup>(7)</sup>. Sheep that inherit a

ovulación y fertilidad de mamíferos<sup>(47)</sup> y, en ovejas heterocigotas con cualquier tipo de polimorfismo del gen BMP-15 (FecX<sup>L</sup>, FecX<sup>H</sup>, FecX<sup>G</sup>, FecX<sup>B</sup>, FecX<sup>L</sup> y FecX<sup>R</sup>), se ha documentado existe una alta tasa de ovulación, comparadas con las del gen tipo silvestre<sup>(6,13,38-40)</sup>.

**Gen activin-like kinasa (ALK6)**

También conocido como receptor tipo IB de la proteína morfogénica de hueso (BMPRII), y Booroola (FecB)<sup>(14-17,33)</sup>. Fue uno de los primeros locus reportados con efecto mayor sobre la tasa ovulatoria en ovejas Merino<sup>(41)</sup>, cuyo efecto es aditivo. El incremento en la tasa de ovulación en portadoras FecB<sup>B</sup>, fisiológicamente está asociado con mayores concentraciones FSH y con una maduración precoz de un gran número de folículos antrales, los cuales son de menor tamaño en comparación con el tipo silvestre<sup>(6)</sup>.

El alelo FecB se ha reportado en algunas de las razas más prolíficas en el mundo, tal como el Merino Booroola Australiano<sup>(16)</sup>, Garole Indian<sup>(17)</sup> cuyo gen ha mostrado un alto grado de polimorfismo<sup>(48)</sup>, Javanese Indonesia<sup>(17)</sup> y en ovejas Small-Tailed de las razas Han y Hu en China<sup>(18)</sup>. El tamaño de camada y la tasa

Booroola gene copy from their parents produce 1.5 additional ovules and give an extra lamb per lambing (Table 2). Homozygous sheep produce three extra ovules, resulting in 1.5 additional lambs per lambing<sup>(7)</sup>.

BMPs can bind to type II receptor (BMPRII) and activate BMP type I receptor (BMPRIA and BMPRII). It has been reported that these receptors and their ligands are present in bovine, porcine and ovine follicles and play an important role in the development and functionality of the follicle<sup>(49-51)</sup>. The signalling molecules participate synchronously with others affecting the phenotype of the ovulation rate via the BMP/Smad pathway and other related molecules (GDF9, TGF-βRI) have demonstrated to have close relationship in the prolificacy of Hu breed ewes<sup>(9)</sup>.

The polymorphism in the BMPRII gene (change from adenine to guanine at position 746 of the nucleotide sequence of the gene) is significantly associated with the hyperprolificacy phenotype in Booroola ewes (FecB). However, Xu *et al.*<sup>(9)</sup> report ewes of low fertility (LF) with BMPRII polymorphism, which suggests that other factors can participate inhibiting the phenotypic

Cuadro 2. Efecto de las variantes génicas en la tasa de ovulación (OR) en ovejas

Table 2. Effect of genetic variants on ovulation rate (OR) in ewes

Gene	Breed	Name	Chromosome	Effect on OR	
				1 copy	2 copies
ALK6	Merino, Javanese, Thin-tail, Garole, Hu, Han	Booroola (FecB <sup>B</sup> )	6	+1.5	3.0
BMP15	Romney,	Inverdale/Hanna	X	+1.0	-
	Belclaire	(FecX <sup>L</sup> /FecX <sup>H</sup> )	X	+1.0	-
	Belcalre,	Belclaire (FecX <sup>B</sup> )	X	+0.7	-
	Cambrige	Galway (FecX <sup>G</sup> )	X	+1.5	-
	Lacaune	Lacaune (FecX <sup>L</sup> )X	X	+1.5	-
GDF9	Aragonesa	Aragonesa (FecX <sup>R</sup> )			
	Berclaire,	High fertility	5	+1.4	-
	Cambrige,	(FecG <sup>H</sup> )			
-	Garole		5	+0.12	+1.0
	Santa Inés	FecG <sup>E</sup>			
-	Lacaune	Lacaune (FecL <sup>L</sup> )	11	+1.5	3.0

Compiled from Davis <sup>(33)</sup>, Bodin *et al.* <sup>(37)</sup>, Notter <sup>(24)</sup>, Monteagudo *et al.* <sup>(13)</sup>, Drouilhet *et al.* <sup>(20)</sup>, Silva *et al.* <sup>(11)</sup>



## GENES CON EFECTO MAYOR SOBRE LA FERTILIDAD DE OVEJAS. REVISIÓN

de ovulación en ovejas incrementan con el número de copias para el gen *ALK6*<sup>(7)</sup>. Las ovejas que heredan una copia del gen *Booroola* de sus padres producen cerca de 1.5 óvulos más, y dan un cordero extra por parto (Cuadro 2). Las ovejas homocigotas producen cerca de tres óvulos extras, resultando en 1.5 corderos más por parto<sup>(7)</sup>.

Los BMPs pueden unirse al receptor tipo II (BMPRII) y activar al receptor BMP tipo I (BMPRIA y BMPRIB). Se ha reportado que estos receptores y sus ligandos están presentes en folículos de bovinos, porcinos y ovinos, y que juegan un extenso rol en el desarrollo y funcionalidad del folículo<sup>(49-51)</sup>. Las moléculas señalizadoras participan sincronizadamente con otras para afectar el fenotipo de la tasa de ovulación vía BMP/Smad, y otras moléculas relacionadas (*GDF9*, *TGF-βRI*), han demostrado tener una cercana relación en la prolificidad de ovejas de la raza *Hu*<sup>(9)</sup>.

El polimorfismo en el gen *BMPRIB* (cambio de adenina por guanina en la posición 746 de la secuencia nucleotídica del gen) está significativamente asociado con el fenotipo de hiperprolificidad en ovejas *Booroola* (*FecB*). Sin embargo, *Xu et al*<sup>(9)</sup> reportan ovejas de baja fertilidad (LF) con el polimorfismo *BMPRIB*, lo que sugiere que otros factores pueden participar inhibiendo la expresión del fenotipo del alelo *BMPRIB*, lo cual fue asociado a mayor abundancia de RNA mensajero (RNAm) de receptores *BMPRIB* y *BMPRII* en los folículos antrales de ovejas altamente fértiles (HF).

### Gen del factor de diferenciación del crecimiento (*GDF9*)

También conocido como *FecG*, y se encuentra en el cromosoma 5 de la oveja<sup>(19)</sup>. El punto de cambio en la secuencia nucleotídica identificado en la oveja *Belclare* (*FecG<sup>H</sup>*) resulta en un aminoácido no conservado en una región que se piensa interactúa con el receptor ligador de dominio tipo 1<sup>(6)</sup>.

El gen autosomal *GDF9* tiene un patrón de herencia sobre dominante, su rol esencial es

expression of *BMPRIB* allele, which was associated with great abundance of mRNAs within *BMPRIB* and *BMPRII* receptors in antral follicles of highly fertile ewes (HF).

### Growth differentiation factor gene (*GDF9*)

Also known as *FecG* is found in sheep chromosome 5<sup>(19)</sup>. The point of change in the nucleotide sequence identified in the *Belclare* sheep (*FecG<sup>H</sup>*) it has been described a mutation which results in an amino acid non-conserved change in a region that is thought to interact with type 1 receptor ligand-binding domain<sup>(6)</sup>.

Alleles of the autosomal *GDF9* gene has an overdominant inheritance pattern, its main role is to control follicular growth by its influence in the granulosa cell function<sup>(10,35)</sup>. In homozygous with *GDF9* allele, the ovarian development from the preantral stage to follicular growth is different to the wild type<sup>(6)</sup>. The animals homozygous for this allele do not ovulate and are infertile, while heterozygous animals, the average ovulation rate is 2, in comparison with those of wild type (Table 1); therefore, the advantage in fertility, prolificacy and ovulation rate is only for heterozygous<sup>(33,36)</sup>.

Recently, *Silva et al*<sup>(11)</sup>, in *Santa Inés* breed ewes with a history of twin and triplet births, describe, for the first time, the single nucleotide polymorphism (SNP) of *GDF9* gene, called *FecG<sup>E</sup>* (*Embrapa*), which does not produce sterility in homozygous females. This gene increases ovulation rate in homozygous in 82 % of the corpus luteum number (CLs), average of 2.22 CLs per ewe and 96.3 % in multiple births in comparison with heterozygous (E/+ ) and the wild type (Table 2). This allele marks an additive effect different to that of the over-dominance of *FecG<sup>H</sup>* and *FecX* alleles described until recently and with fertile oocytes in E/E genotypes, marking a new physiological action for *GDF9* gene.

Although in some hyperprolific ewes there are no reports of polymorphisms in *GDF9* gene, it has been found that the genetic products of

controlando el crecimiento folicular por su influencia en la función de la célula de la granulosa<sup>(10,35)</sup>. En los homocigotos con el alelo GDF9 el desarrollo ovárico desde la etapa preantral hasta la de crecimiento folicular es diferente al del tipo silvestre<sup>(6)</sup>. Los animales homocigotos para este alelo no ovulan y son infértiles, mientras que en los animales heterocigotos la tasa de ovulación promedio es de 2 comparados con las de tipo silvestre (Cuadro 1), por lo que la ventaja en fertilidad, prolificidad y tasa ovulatoria es sólo para los heterocigotos<sup>(33,36)</sup>.

Recientemente, Silva *et al.*<sup>(11)</sup> en ovejas de raza Santa Inés con antecedentes de partos gemelares y trillizos, describen por primera vez el polimorfismo de nucleótido sencillo (SNP) del gen GDF9, denominado FecG<sup>E</sup> (Embrapa), que no produce esterilidad en las hembras homocigotas. Este gen incrementa la tasa ovulatoria en homocigotos en 82 % del número de cuerpos lúteos (CLs), promedio de 2.22 CLs por oveja, y 96.3 % en partos múltiples comparada con las heterocigotas (E/+) y el tipo silvestre (Cuadro 2). Este alelo marca un efecto aditivo diferente al de sobredominancia de los alelos FecG<sup>H</sup> y FecX descritos hasta hace poco, y con ovocitos fértiles en los genotipos E/E, marcando una nueva acción fisiológica para el gen GDF9.

Aunque en algunas ovejas hiperprolíficas no se reportan los polimorfismos en el gen GDF9, se ha encontrado que los productos genéticos de BMPRII y TGF- $\beta$ RI están involucrados en el control negativo de la señalización del GDF9<sup>(52)</sup>, con diferencias significativas en los niveles de ARNm de GDF9, BMPRII y TGF- $\beta$ RI en los folículos antrales en ovejas HF y LF<sup>(9)</sup>.

### Gen Lacaune (FecL)

Es un gen autosómico recesivo identificado en la raza Francesa Lacaune de línea cárnica y lechera. El locus FecL se encuentra en el cromosoma 11 ovino, entre un intervalo de 2.1 cM entre los marcadores DLX3 y BM17132<sup>(20)</sup>, o entre los marcadores BM17132 y FAM117A

BMPRII and TGF-RI are involved in the negative control of GDF9 signalling<sup>(52)</sup>, with significant differences in mRNA levels of GDF9, BMPRII and TGF- $\beta$ RI in antral follicles in HF and LF ewes<sup>(9)</sup>.

### Lacaune (FecL) gene

The FecL is a recessive autosomal gene identified in French Lacaune dairy and meat sheep breed. It is found in ovine chromosome 11, between an interval of 2.1 cM between DLX3 and BM17132 markers<sup>(20)</sup> or between BM17132 and FAM117A markers of the same chromosome, which corresponds to a syntenic block of 1.1 megabases also present in human chromosome 17. This segment contains 20 genes<sup>(53)</sup>.

The FecL allele is responsible of an alteration associated with the processing of BMP15 peptide<sup>(37)</sup>. In contrast with all Fec genes identified and involved in OR regulation related to the system of BMP signalling<sup>(7)</sup>, none of the 20 genes of FecL locus correspond to known ligands, receptors, antagonists or signalling molecules of the BMP or TGF $\beta$  system<sup>(20)</sup>.

High throughput sequencing strategy of long-range PCR fragments spanning the locus of FecLL carrier and non-carrier ewes defined a new fecundity gene named B4GALNT2, encoding a glycosylation enzyme that is not related to the BMP family. The high prolificacy of Lacaune sheep was explained by overexpression of B4GALNT2 in the ovary leading to atypical glycosylation of inhibin<sup>(54)</sup>.

The influence of FecL<sup>L</sup> on OR is additive, increasing 1.5 ovules with a copy and 3.0 ovules with two copies of the allele (Table 2). Initially, it was thought that in meat sheep the ovulation rate was under genetic control of FecL gene<sup>(12)</sup>, but subsequently allele FecX<sup>L</sup> was identified, which affects BMP15 gene and it has been demonstrated that it segregates in the same population, increasing ovulation rate in 2.0 ovules.

## GENES CON EFECTO MAYOR SOBRE LA FERTILIDAD DE OVEJAS. REVISIÓN

del mismo cromosoma, lo cual corresponde a un bloque sinténico de 1.1 megabases presente también en el cromosoma 17 humano. Este segmento contiene 20 genes<sup>(53)</sup>.

El cambio en la secuencia de ADN en este alelo resulta en un cambio del aminoácido cisteína por una tirosina en la posición 53 (Cuadro 1), responsable de una alteración asociada al procesamiento del péptido BMP15<sup>(37)</sup>. A diferencia de todos los genes Fec identificados e implicados en la regulación de la TO pertenecientes al sistema de señalización BMP<sup>(7)</sup>, ninguno de los 20 genes del locus FecL corresponden a ligandos conocidos, receptores, antagonistas o moléculas señalizadoras del sistema BMP o TGFβ<sup>(20)</sup>.

Una estrategia de secuenciación masiva de fragmentos de PCR largos que cubren el locus FecL en ovejas portadoras y no-portadoras definió un nuevo gene implicado en fecundidad llamado B4GALNT2, el cual codifica para una enzima de glicosilación que no está relacionada a la familia de los BMP. La elevada fertilidad de las ovejas Lacaune se explica por a sobreexpresión de B4GALNT2 en el ovario llevando a una glicosilación atípica de la inhibina<sup>(54)</sup>.

La influencia de FecL en la TO es aditiva, incrementando 1.5 óvulos con una copia y 3.0 óvulos con dos copias del alelo (Cuadro 2). Inicialmente se pensaba que en ovejas de carne la tasa de ovulación estaba bajo control genético de gen FecL<sup>(12)</sup>, pero posteriormente se identificó el alelo FecX<sup>L</sup>, el cual afecta al gen BMP15, y que se demostró segregarse en la misma población, incrementando la tasa ovulatoria en cerca de 2.0 óvulos.

Estudios del efecto simultáneo de los locus FecX<sup>L</sup> y FecL sobre la tasa ovulatoria en ovejas<sup>(20)</sup> muestran (Cuadro 3) que en la ausencia de la mutación FecX<sup>L</sup>, una copia del alelo FecL incrementa la TO en cerca de 1.5 óvulos, y dos copias del FecL incrementan la TO en 3.0. Este hallazgo confirma el efecto aditivo en la TO entre estos alelos. Por otra parte, una copia

Studies of the simultaneous effect of FecX<sup>L</sup> and FecL on ovulation rate in ewes<sup>(20)</sup> show (Table 3) that in the absence of FecX<sup>L</sup> mutation, a copy of FecL allele increases OR around 1.5 ovules and two copies of FecL increases OR in 3.0. This finding confirms the additive effect on OR between these alleles. On the other hand, a copy of a mutant FecX<sup>L</sup> allele increases OR in 1.9 ovules. When they are simultaneously present in double heterozygous stage, both mutations increase OR in 2.9 ovules. Therefore, those ewes carriers of mutation in FecL and FecX loci have higher OR than those with only one mutation<sup>(20)</sup>.

New physiological pathways involved in the regulation of ovulation rate by FecL gene have been found. The most important differences between homozygous ewes (L/L) and the wild type (+/+) lie in the ovarian phenotype and endocrine profiles. Studies conclude that: 1) the number of medium follicles (3.5 and 5.5 mm) and large ( $\geq 6$  mm) was greater in L/L ewes and the size of the dominant follicle was 1 mm less in L/L; 2) the relationship between progesterone and testosterone levels in large follicles was higher in L/L ewes, but the relationship between progesterone and estrogens levels was lower; 3) levels of mRNA

Cuadro 3. Efecto de combinación de los alelos FecL y FecX<sup>L</sup> sobre la tasa de ovulación (OR) en ovejas Lacaune

Table 3. Effect of the combination of FecL y FecX<sup>L</sup> alleles on ovulation rate (OR) in Lacaune ewes

FecL genotype	FecX (BMP15) genotype	Mean OR	Number of evaluated ewes
+/+	FecX <sup>+</sup> / FecX <sup>+</sup>	1.47	346
L/+	FecX <sup>+</sup> / FecX <sup>+</sup>	3.14	147
L/L	FecX <sup>+</sup> / FecX <sup>+</sup>	4.61	36
+/+	FecX <sup>L</sup> / FecX <sup>+</sup>	3.38	23
L/+	FecX <sup>L</sup> / FecX <sup>+</sup>	4.39	29
L/L	FecX <sup>L</sup> / FecX <sup>+</sup>	4.80	5

FecX= Wild allele; FecX<sup>L</sup>= Alelo Lacaune allele linked to X chromosome; L = Lacaune allele linked to chromosome 11; + Wild allele.

Obtained from Drouilhet *et al.* <sup>(20)</sup>

del alelo mutante  $FecX^L$  incrementa la TO en 1.9 óvulos. Cuando están presentes simultáneamente en estado doble heterocigoto, las dos mutaciones incrementan la TO en 2.9 óvulos. Por tanto, aquellas ovejas portadoras de la mutación en los loci  $FecL$  y  $FecX$  tienen mayor TO que aquéllas con una sola mutación<sup>(20)</sup>.

Se han encontrado nuevas vías fisiológicas implicadas en la regulación de la tasa ovulatoria por el gen  $FecL^L$ . Las diferencias más importantes entre ovejas homocigotas (L/L) y de tipo silvestre (+/+) radican en el fenotipo ovárico y perfiles endocrinos. Los estudios concluyen que: a) el número de folículos medianos (3.5 y 5.5 mm) y grandes ( $\geq 6$  mm) fue mayor en ovejas L/L, y el tamaño del folículo dominante es de 1 mm menos en L/L; b) la relación entre la concentración de progesterona y testosterona en folículos grandes fue mayor en ovejas L/L, pero la relación entre progesterona y estrógenos fue menor; c) los niveles de ARNm del receptor de FSH incrementaron en las células de la granulosa de ovejas L/L<sup>(55)</sup>.

### Gen del receptor para estrógenos (ESR)

El ESR es un miembro de la súper familia de receptores nucleares del factor de transcripción ligando – activado. Se encuentra ubicado en el cromosoma 17 en bovinos y ovejas, en el 8 en cerdos y en el 4 en humanos<sup>(19)</sup>. Este gen está relacionado con el incremento en el tamaño de camada en cerdos<sup>(47)</sup>, pero en ratones knock-out el ESR muestra regulación caótica de la LH, anovulación e insensibilidad del útero a estrógenos<sup>(56)</sup>.

En ovejas este gen puede jugar un rol importante en la prolificidad<sup>(57)</sup>, ya que Bi *et al*<sup>(58)</sup> estudiando el polimorfismo del gen del ESR en ovejas hiperprolíficas Small Tail en las razas Han, Hu y German Mutton Merino, encontraron tres genotipos (AA, AB y BB) con frecuencias génicas para el alelo A de 0.846, 0.672 y 0.786, y para el alelo B de 0.154, 0.328 y 0.214, respectivamente. El polimorfismo

of FSH receptor increased in the granulosa cells of L/L ewes<sup>(55)</sup>.

### Estrogen receptor gene (ESR)

The ESR is a member of the nuclear receptor superfamily of the ligand-activated transcription factor. It is located on chromosome 17, in cattle and sheep; on 8, in pigs and on 4, in humans<sup>(19)</sup>. This gene is linked to the increase in litter size in pigs<sup>(47)</sup>, but in knockout mice, the ESR shows chaotic regulation of LH, anovulation and insensitivity of uterus to estrogens<sup>(56)</sup>.

In ewes this gene can play an important role in prolificacy<sup>(57)</sup>, since Bi *et al*<sup>(58)</sup>, while studying the ESR gene polymorphism in hyperprolific Small Tail Han, Hu and German Mutton Merino sheep breeds, found three genotypes (AA, AB and BB) with genetic frequencies for A allele of 0.846, 0.672 and 0.786 and for B allele of 0.154, 0.328 and 0.214, respectively. Polymorphism includes a change from cysteine to guanine at position 363 of the nucleotide sequence (C363G) in exon 1 of the ESR gene in Small Tail Han ewes, which were associated with 0.5 and 0.7 additional lambs in genotypes AB and BB, respectively, in comparison with AA. Therefore, ESR gene has major effect on the prolificacy of these ewes. However, although there are reports of genotypes AB and BB in other sheep breeds, polymorphism or association of this gene with prolificacy has not been found<sup>(57,59)</sup>. It is concluded that in hyperprolific sheep breeds there are different genes that control development, maturation and ovulation mechanisms that characterize this phenotype.

### Inhibin gene

Inhibin is a glycoprotein that belongs to the superfamily of the transforming growth factor- $\beta$ , which selectively inhibits FSH synthesis and secretion<sup>(60,61)</sup>. It is composed by two subunits,  $\alpha$  and  $\beta$ , linked by disulphur; two forms of inhibin, sharing an  $\alpha$  subunit (INH $\alpha$ ) but with different  $\beta$  subunits ( $\beta$ A or  $\beta$ B), have been identified<sup>(62)</sup>, resulting in  $\alpha\beta$ A inhibin (INHBA)

## GENES CON EFECTO MAYOR SOBRE LA FERTILIDAD DE OVEJAS. REVISIÓN

incluye un cambio de una cisteína por una guanina en la posición 363 de la secuencia nucleotídica (C363G) en el exón 1 del gen ESR en ovejas Small Tail Han, las cuales se asociaron con 0.5 y 0.7 corderos más en los genotipos AB y BB, respectivamente, comparadas con AA. Por lo anterior, el gen ESR tiene un efecto mayor ligado a la prolificidad de estas ovejas. Sin embargo, en ovejas de otras razas aunque se informa de genotipos AB y BB, no se ha encontrado polimorfismo o asociación de este gen con la prolificidad<sup>(57,59)</sup>. Lo anterior lleva a concluir que en las razas de ovejas hiperprolíficas existen diferentes genes que controlan los mecanismos de desarrollo, maduración y ovulación que caracterizan a este fenotipo.

### Gen de inhibina

La inhibina es una glicoproteína perteneciente a la súper familia del factor- $\beta$  de crecimiento transformante, que suprime selectivamente la síntesis y secreción de la FSH<sup>(60,61)</sup>. Está compuesta de dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , unidas por enlace disulfuro; se han identificado dos tipos de inhibinas, compartiendo una subunidad  $\alpha$  común pero con diferentes subunidades  $\beta$  ( $\beta A$  o  $\beta B$ )<sup>(62)</sup>, dando lugar a las inhibinas  $\alpha\beta A$  (INHA) y  $\alpha\beta B$  (INHBB). La subunidad  $\alpha$  se localiza en los cromosomas 2 en humanos, bovinos y ovinos, y en el 15 en cerdos; y la subunidad  $\beta A$  se localiza en los cromosomas 7 en humanos, 4 en bovinos y ovinos, y 18 en porcinos. La subunidad  $\beta B$  se localiza en los cromosomas 2 en humanos, bovinos y ovinos, y en el 12 en porcinos<sup>(19)</sup>.

El gen INHA tiene efecto aditivo significativo en la prolificidad de ovejas, y es posible que INHA, INHBA e INHBB tengan un efecto importante en el tamaño de la camada<sup>(63-65)</sup>. Por otra parte, un estudio demostró que el gen INHA muestra polimorfismo de segmentos de restricción (RFLP) detectado con la endonucleasa TaqI, siendo el alelo A asociado al tamaño de camada en ovejas<sup>(66)</sup>.

Hasta ahora no se ha documentado polimorfismo para el gen INHA en ovejas; sin embargo, en

and  $\alpha\beta B$  inhibin (INHBB). Alpha subunit is located on chromosome 2, in humans, cattle and sheep and on 15, in pigs; the subunit  $\beta A$  is located on chromosome 7, in humans; 4, in cattle and sheep and 18, in pigs. The  $\beta B$  subunit is located on chromosome 2, in humans, cattle and sheep and on 12, in pigs<sup>(19)</sup>.

The INHA gene has significant additive effect on prolificacy in ewes and it is possible that INHA, INHBA and INHBB have an important effect on litter size<sup>(63-65)</sup>. On the other hand, a study demonstrated that INHA gene shows restriction fragment length polymorphism (RFLP) detected with TaqI endonuclease, being A allele associated with litter size in ewes<sup>(66)</sup>.

So far, polymorphism for INHA gene in ewes has not been reported; however, in Matou, Nubi, Boer and Haimen goat breed populations in China<sup>(21)</sup>, it was found that INHA gene participated in prolificacy, identifying a base change from guanine to adenine at position 284 (G284A), indicating that G allele is dominantly inherited. This study demonstrated that the effect of INHA genotype on litter size was higher for GG genotype, followed by AG and AA, for which polymorphism associated with INHA gene may be involved in the control of litter size in goats.

In China, He *et al*<sup>(22)</sup>, in Haimen, Boer and Huanghuti goats, found a silent substitution from a cytosine to a thymine at position 865 (C865T) in the exon of the gene for INHA, but that does not induce amino acid change. This preliminary demonstrates that there is an association between BB genotype and oestrus during all the year in comparison with seasonal oestrus. Therefore, INHA gene can be considered a candidate gene for high prolificacy in goats.

It has been found that INHBB gene has a significant effect on litter size in some sheep breeds<sup>(63)</sup> and because of its important role in reproduction it is considered a possible candidate gene for prolificacy in sheep. In this context,

poblaciones de cabras de las razas Matou, Nubi, Boer y Haimen en China<sup>(21)</sup> se encontró la participación del gen INHA en la prolificidad, identificando un cambio de base de una guanina por una adenina en la posición 284 (G284A), indicando además que el alelo G se hereda de forma dominante. Este estudio demostró que el efecto del genotipo de INHA en el tamaño de camada fue mayor para el genotipo GG, seguido por AG y AA, por lo que el polimorfismo asociado al gen INHA puede estar involucrado en el control del tamaño de camada en cabras.

En China, He *et al.*<sup>(22)</sup> en cabras Haimen, Boer y Huanghuti encontraron un cambio silente de una cisteína por una timina en la posición 865 (C865T) en el exón del gen para INHA, pero que no induce cambio en el aminoácido. Esto preliminarmente demuestra que existe una asociación entre el genotipo BB y la presentación de estro durante todo el año comparado al estro estacional. Por tanto, el gen INHA puede ser considerado como un gen candidato para alta prolificidad en cabras.

Se ha encontrado que el gen INHBB tiene un efecto significativo sobre el tamaño de camada en algunas razas de ovejas<sup>(63)</sup>, y por su importante rol en la reproducción es considerado un posible gen candidato para la prolificidad en ovejas. Al respecto Chu *et al.*<sup>(23)</sup> estudiaron su efecto sobre la prolificidad en ovejas Small Tail de las razas Han y Hu, detectando polimorfismo dentro del exón 2 del gen INHBB. En las ovejas Hu se encontró un cambio de base de una adenina por una guanina en la posición 276 (A276G) en el exón 2 en el genotipo BB comparada con el AA, la cual no causó cambio de aminoácido, ya que estaba dentro de la región 3' de la región no transcrita (UTR) del gen INHBB. Las ovejas con genotipo BB mostraron 0.58 corderos más que aquéllas con genotipo AA, lo cual preliminarmente muestra que el gen INHBB tiene un efecto significativo en el tamaño de camada en ovejas Hu, pero no en las Small Tail Han, lo que implica que existen bases genéticas moleculares diferentes para la hiperprolificidad entre razas.

Chu *et al.*<sup>(23)</sup> studied its effect on prolificacy in Small Tail Han and Hu sheep breed, detecting polymorphism in exon 2 of INHBB gene. In Hu ewes, a base change from an adenine to guanine at position 276 (A276G) in exon 2 of BB genotype was found, in comparison with AA, which did not cause amino acid change, since it was in region 3' of the untranscribed region (UTR) of INHBB gene. The ewes with BB genotype showed 0.58 additional lambs than those with AA genotype, which preliminarily shows that INHBB gene has a significant effect on litter size in Hu ewes, but not in Small Tail Han, which means that there are different molecular genetic basis for hyperprolificacy between breeds.

### **Prolactin receptor gene (PRLR)**

Prolactin (PRL) is a polypeptide hormone of the anterior pituitary, involved in many endocrine processes essential for an adequate reproductive behaviour<sup>(69)</sup>. Its action is mediated by its receptor (PRLR), whose gene is member of the prolactin/growth hormone receptor family, which contains regions with identical sequences<sup>(70)</sup>. The PRLR gene is found on pig and sheep chromosome 16<sup>(67,68)</sup>. It has been found that this gene has greater effect on high prolificacy associated with exon 10 in Jining Grey goats<sup>(71)</sup> and in Small Tail Han breed or is linked to the gene responsible of such phenotype<sup>(34)</sup>.

In these ewes, the PRLR gene is polymorphic, with AA, AB and BB genotypes. The BB genotype showed two base changes from thymine to cytosine at position 84 (T84C) and from a thymine to guanine at position 174 of the gene (T174G) in comparison with AA genotype giving a 176 bp product. The litter size for BB genotype ranged from 0.64 to 0.75 and for AB ranged from 0.44 to 0.54 additional lambs in comparison with AA genotype, concluding that B allele is positively correlated to larger litter size in Small Tail Han sheep<sup>(34)</sup>. In relation to PRL gene and prolificacy in Small Tail Han ewes, a base change from guanine to thymine at position 63 of (G63T) gene was found, where AB genotype ewes had 0.83 additional lambs, in comparison

### Gen del receptor de prolactina (PRLR)

El gen de PRL se encuentra en el cromosoma 16 porcino y ovino<sup>(67,68)</sup>. La prolactina es una hormona polipeptídica de la pituitaria anterior, involucrada en muchos procesos endocrinos esenciales para un adecuado comportamiento reproductivo<sup>(69)</sup>. Su acción es mediada por su receptor (PRLR), cuyo gen es miembro de la familia del receptor de la hormona de crecimiento/prolactina, el cual contiene regiones con secuencias idénticas<sup>(70)</sup>. Se ha encontrado que este gen tiene un efecto mayor sobre la alta prolificidad asociado al exón 10 en cabras Jining Grey<sup>(71)</sup> y en ovejas Small Tail de raza Han, o está ligado al gen responsable de tal fenotipo<sup>(34)</sup>.

En estas ovejas el gen del PRLR es polimórfico, encontrándose los genotipos AA, AB y BB. El genotipo BB mostró dos cambios de bases de una timina por una citocina en la posición 84 (T84C), y de una timina por una guanina en la posición 174 del gen (T174G) comparado con el genotipo AA de un producto de 176 pb. El tamaño de camada para el genotipo BB fue de 0.64 a 0.75 y para AB de 0.44 a 0.54 más corderos en comparación con los genotipos AA, concluyendo que el alelo B está positivamente correlacionado a mayor tamaño de camada en ovejas Small Tail Han<sup>(34)</sup>. En relación al gen PRL y la prolificidad en ovejas Small Tail Han, se encontró un cambio de base de una guanina por una timina en la posición 63 del gen (G63T), donde las ovejas del genotipo AB tuvieron 0.83 corderos más, comparada con las homocigotas AA, lo que prueba que el locus de PRL puede estar asociado con alta prolificidad en ovejas Small Tail Han, pero es necesario confirmar este efecto con otros estudios<sup>(34)</sup>.

En el caso de las cabras Jining Grey, se detectaron polimorfismos en el gen de PRLR asociados a varios genotipos, alguno de las cuales producen cambios en aminoácidos, pero sin efecto sobre tamaño de camada. El cambio de una adenina por una guanina en el aminoácido 143 (A143G) de una de ellas, resultó en un cambio de aminoácido (metionina por

with AA homozygous, which proves that PRL locus may be associated with high prolificacy in Small Tail Han ewes, but it is necessary to confirm this effect with other studies<sup>(34)</sup>.

In the case of Jining Grey goats, polymorphism was detected in PRLR gene associated with several genotypes, some of them produce amino acid changes, but without effect on litter size. The change from adenine to guanine in amino acid 143 (A143G) of one of them, resulted in an amino acid change (methionine to valine), where FG genotype goats had 0.76 additional kids in comparison with FF, which suggests that PRLR gene has also major effect on prolificacy in goats<sup>(72)</sup>.

### Melatonin receptor A1 gene (MTNR1A)

Seasonal variation in fertility is an important limiting factor of the production efficiency in ewes. The night-time secretory patterns of melatonin, an important endocrine signalling that controls the reproductive seasonality in ewes<sup>(73)</sup>, is mediated by MTNR1A involved in the regulation of the reproductive activity<sup>(74)</sup>.

Important differences have been reported between breeds with regard to time and duration of seasonal anoestrus<sup>(75)</sup>. The Merino breed and its predecessors (Rambouillet and Dorset) show a relative long seasonal period<sup>(76)</sup> and respond particularly to the introduction of the ram (male effect) for stimulating ovulation and oestrus<sup>(77)</sup>. The European prolific breeds, such as Finish Landrace and Romanov show lesser seasonality with good behaviour in summer, in comparison with British breeds, such as Down, which show short breeding season and less response to male effect<sup>(75)</sup>.

In Mexico, Arroyo<sup>(77)</sup> has extensively documented the absence or low seasonality of hair ewes, mainly Pelibuey, characteristic surely to be associated with genetic factors, but so far they have not been studied at molecular level, to confirm if the involved genes and their frequencies correspond to the ones found by other authors<sup>(78,79)</sup> and other latitudes<sup>(80)</sup>.

valina), donde las cabras con genotipo FG tuvieron 0.76 más cabritos, comparada con las FF, lo cual sugiere que el gene PRLR también tiene un efecto mayor sobre la prolificidad en cabras<sup>(72)</sup>.

### Gen del receptor de melatonina A1 (MTNR1A)

La variación estacional en la fertilidad es un importante factor limitante de la eficiencia productiva en ovejas. Los patrones nocturnos de secreción de melatonina, una señal endocrina importante que controla la estacionalidad reproductiva en ovejas<sup>(73)</sup>, es mediada por el MTNR1A involucrado en la regulación de la actividad reproductiva<sup>(74)</sup>.

Se han registrado diferencias importantes entre razas respecto al tiempo y duración del anestro estacional<sup>(75)</sup>. En la raza Merino y sus antecesores (Rambouillet y Dorset) muestran una relativa estacionalidad larga<sup>(76)</sup> y responden particularmente a la introducción del carnero (efecto macho) para estimular la ovulación y el estró<sup>(77)</sup>. Razas europeas prolíficas tales como la Finish Landrace y Romanov muestran menor estacionalidad con buen comportamiento en verano, en contraste con razas Británicas como la Down, que muestran época corta de empadre y menor respuesta al efecto macho<sup>(75)</sup>.

En México, Arroyo<sup>(77)</sup> ha documentado extensamente la ausencia o baja estacionalidad de las ovejas de pelo principalmente Pelibuey, característica que seguramente está asociada a factores genéticos, pero que hasta el momento no se han estudiado a nivel molecular, para confirmar si los genes involucrados y sus frecuencias corresponden a las encontradas por otros autores<sup>(78,79)</sup> y en otras latitudes<sup>(80)</sup>.

Se han hecho esfuerzos para la selección de líneas con baja estacionalidad reproductiva, generalmente basadas en la fertilidad en épocas de empadre en primavera y verano. Sin embargo, bajo los sistemas de mejoramiento genético convencionales, es difícil debido a aspectos relacionados con la heredabilidad,

Efforts have been made for lineage selection with low reproductive seasonality, generally based on fertility in breeding seasons during spring and summer. However, under conventional genetic improvement systems, it is difficult because of the aspects related with heritability, time, managing system and sex limitation<sup>(25,75)</sup>. For the purpose of studying the comparative advantages that can offer in flocks with presence of genotypes associated with non-seasonality, the Virginia Polytechnic Institute worked with non-seasonal lineages (May and June) and crosses established with 50 % Dorset, 25 % Rambouillet and 25 % Finish Landrace for a generation of *inter se* mating, finding interesting results. The estimated breeding values (EBV) per year for fertility were 1.98 vs 0.61 % year<sup>-1</sup> of the selected lineage over the control (E). There was a clear effect of sheep age, resulting in higher response of adult ewes over young ewes<sup>(75)</sup>. Sheep from lineage selection had lower night-time circulant melatonin levels and high circulant PRL levels in comparison with the control ewes<sup>(81,82)</sup>. The increase in EBV in fertility was associated with declination of circulant melatonin (-2.23 pg ml<sup>-1</sup> %<sup>-1</sup>) and increase in circulant PRL (1.23 pg ml<sup>-1</sup> %<sup>-1</sup>).

Therefore, knowledge of the genes involved in the control of the reproductive seasonality linked to genetic markers, allows implementing intensive and effective selection programmes out of reproductive seasons<sup>(25)</sup> and include this advantage in commercial flocks.

Molecular characterization of sequence variants in MTNR1A sheep found by Messer *et al.*<sup>(82)</sup> and Barret *et al.*<sup>(83)</sup>, consists of a variant with eight base changes, three of them resulted in substitutions of amino acids in the receptor. Subsequently, it was confirmed that both gene forms were present in Greyface x Suffolk, Greyface x Dorset and Soay rams.

Notter *et al.*<sup>(84)</sup> estimated allelic frequency in 0.42 and 0.58 for polymorphism using *MlnI* restriction enzyme and 0.34 and 0.66 for polymorphism with *RsaI* restriction enzyme in



GENES CON EFECTO MAYOR SOBRE LA FERTILIDAD DE OVEJAS. REVISIÓN

tiempo, sistema de manejo y limitación del sexo<sup>(25,75)</sup>.

A fin de estudiar las ventajas comparativas que pueden ofrecer en rebaños con la presencia de genotipos asociados a la no estacionalidad, el Tecnológico de Virginia trabajó con líneas seleccionadas fuera de la estación de empadre (mayo y junio) y establecidas con cruza 50 % Dorset, 25 % Rambouillet y 25 % Finish Landrace por una generación de apareamientos *inter se*, encontrando resultados interesantes. Los valores de crías estimados (EBV) por año para fertilidad fueron de 1.98 vs 0.61 % año<sup>-1</sup> de la línea seleccionada sobre la control (E). Hubo un claro efecto de la edad de las ovejas, resultando en una mayor respuesta de las ovejas adultas sobre las ovejas jóvenes<sup>(75)</sup>. Las ovejas en la línea seleccionada mostraron tener menores niveles nocturnos de melatonina circulante y altos niveles de PRL circulante comparadas con las ovejas testigo<sup>(81,82)</sup>. El incremento en los EBV en fertilidad estuvieron asociados con declinación en la melatonina circulante (-2.23 pg ml<sup>-1</sup> %<sup>-1</sup>) e incremento en la PRL circulante (1.23 pg ml<sup>-1</sup> %<sup>-1</sup>).

Por lo anterior, el conocimiento de los genes involucrados en el control de la estacionalidad reproductiva ligada a marcadores genéticos, permite implementar programas de selección intensiva y eficiente fuera de épocas

ewes from non-seasonal lineages of the Virginia Polytechnic Institute (Table 4), demonstrating that the polymorphisms were not independent of that flock. The referred results revealed a substantial allelic diversity in the *MlnI* restriction site in MTNR1A in several selected breeds for minimal or no seasonality<sup>(75)</sup>.

On the other hand, Migaud *et al*<sup>(85)</sup> identified six polymorphisms in MTNR1A gene in Alpine seasonal goat breed in France and in Creole goats of Guadalupe with minimal seasonality. An amino acid change in the receptor was identified, but no differences were identified in allelic frequencies between breeds.

In a recent study conducted by Mateescu *et al*<sup>(25)</sup> in which ¾ Dorset x ¼ East Frisian ewes coming from an accelerated lambing system (STAR) were included, evaluated the MTNR1A gene, amplifying and targeting it with the *MlnI* endonuclease, allowing to identify two alleles (M and m). In a similar way, the presence of cut with *RsaI* enzyme (R and r alleles) was evaluated. The genetic frequency was 0.64 and 0.36 for polymorphism with *MlnI* enzyme (M and m alleles, respectively). The genotypic frequency was 0.43, 0.44 and 0.13 for *MM*, *Mm* and *mm* genotypes in the polymorphism identified with *MlnI* enzyme and 0.13, 0.43 and 0.44 for *RR*, *Rr* and *rr* genotypes in the polymorphism identified with *RsaI* enzyme.

Cuadro 4. Frecuencias alélicas para polimorfismos del gen MNTR1A identificados con enzimas de restricción *MlnI* y *RsaI* en algunas poblaciones ovinas

Table 4. Allelic frequencies for polymorphisms of MNTR1A gene identified by *MlnI* y *RsaI* restriction enzymes in some ovine populations

Population	Number of individuals	<i>MlnI</i>		<i>RsaI</i>	
		Allele +	Allele -	Allele +	Allele -
OOS of Virginia Tech	362	0.42	0.58	0.34	0.66
Dorset de Cornell	24	0.31	0.69	0.64	0.36
Polypay Tisdale	19	0.47	0.53	0.76	0.24
Assaf of Israel	2	0.50	0.50	0.00	1.00
Local Awassi of Israel	7	0.07	0.93	0.31	0.69
Improved Awassi of Israel	9	0.67	0.33	0.20	0.80

Obtained from Notter y Cockett <sup>(74)</sup>.

reproductivas<sup>(25)</sup> e incluir esta ventaja en rebaños comerciales.

La caracterización molecular de variantes de secuencias del MTNR1A ovino encontradas por Messer *et al.*<sup>(82)</sup> y Barret *et al.*<sup>(83)</sup>, consiste en una variante con ocho cambios de bases, tres de las cuales resultaron en sustituciones de aminoácidos en el receptor. Posteriormente se confirmó que ambas formas del gen estaban presentes en ovejas Greyface x Suffolk, Greyface x Dorset y carneros Soay.

Notter *et al.*<sup>(84)</sup> estimaron la frecuencia alélica en 0.42 y 0.58 para polimorfismo usando la enzima de restricción *MnlI*, y de 0.34 y 0.66 para polimorfismo con la enzima de restricción *RsaI* en ovejas de las líneas no estacionales del Tecnológico de Virginia (Cuadro 4), demostrando que los polimorfismos no eran independientes de aquel rebaño. Los resultados referidos revelan una diversidad alélica sustancial en el sitio de restricción *MnlI* en MTNR1A en varias razas seleccionadas para mínima o no estacionalidad<sup>(75)</sup>.

Por otra parte, Migaud *et al.*<sup>(85)</sup> identificaron seis polimorfismos dentro del gen MTNR1A en cabras estacionales de la raza Alpina en Francia, y en cabras criollas de Guadalupe con mínima estacionalidad. Se identificó un cambio de aminoácido en el receptor, pero no se identificaron diferencias en las frecuencias alélicas entre estas razas.

En un estudio reciente realizado por Mateescu *et al.*<sup>(25)</sup> en las que incluyeron ovejas  $\frac{3}{4}$  Dorset x  $\frac{1}{4}$  East Frisian provenientes de un sistema de empadre acelerado (STAR), evaluaron el gen MTNR1A, amplificándolo y digiriéndolo con la endonucleasa *MnlI*, lo que permitió identificar a dos alelos (M y m). En forma similar, se evaluó la presencia de corte con la enzima *RsaI* (alelos R y r). La frecuencia génica fue de 0.64 y 0.36 para el polimorfismo con la enzima *MnlI* (alelos M y m, respectivamente). La frecuencia genotípica fueron de 0.43, 0.44, y 0.13 para los genotipos MM, Mm y mm en el polimorfismo

The individuals with *mmRR*, *MmRr* and *MMrr* genotypes had higher frequencies than the expected under Hardy-Weimberg equilibrium (H-W), for which the considered population was not in H-W equilibrium considering both polymorphisms. Other aspect derived from this study was the relationship between open days and fertility showed by ewes with *Mm* or *MM* genotypes, which needed 136 d less for the first lambing and 124 d less between the first and second lambing compared to those with *mm* genotype. However, that difference was not observed between ewes under genotypes determined with *RsaI* enzyme. The conclusion derived from the aforementioned observations is that M allele carrier ewes conceive at younger age and show shorter intervals between the first and second lambing.

On the other hand, non-seasonal adult ewes from the Virginia Polytechnic Institute showed an average fertility between genotypes that ranged from 65.5 to 85.3 %. Ewes with at least one copy of the allele (+) in *MnlI* restriction site were 11.2 % more fertile in spring than ewes homozygous for allele (-). However, there was no effect of MTNR1A genotype on litter size<sup>(25)</sup>. The decomposition of the genotypic variance into additive and dominance in adult ewes for MTNR1A locus were 35.7 and 13.9 %<sup>(2)</sup>, respectively. The additive variance for MTNR1A marker found for fertility was 23.8 % and for the dominance effect in this locus was 9.3 %. The heritability for fertility in spring was 11 % in adults<sup>(25)</sup>, which is considered low; for which there are environmental factors associated with this characteristic.

Chu *et al.*<sup>(86)</sup> found MNTR1A marker effect on litter size in Small Tail Han ewes in China, with non-seasonal ovulatory activity. These ewes also showed high frequency for FecB variant. The ewes heterozygous for absence of *MnlI* restriction site had large litters at the second lambing in comparison with the homozygous for presence of restriction site (3.19 vs 2.25 lambs per litter<sup>-1</sup>) and large litters in comparison with the heterozygous ewes in first and second lambing.

## GENES CON EFECTO MAYOR SOBRE LA FERTILIDAD DE OVEJAS. REVISIÓN

identificado con la enzima *MnlI*, y 0.13, 0.43 y 0.44 para los genotipos RR, Rr y rr en el polimorfismo identificado con la enzima *RsaI*.

Los individuos con los genotipos *mmRR*, *MmRr* y *MMrr* tuvieron mayores frecuencias que las esperadas bajo equilibrio Hardy-Weimberg (H-W), por lo que la población considerada no se encontró en equilibrio H-W considerando ambos polimorfismos. Otro aspecto derivado de este estudio fue la relación entre días abiertos y fertilidad mostrada por las ovejas con genotipos *Mm* o *MM*, las cuales necesitaron 136 días menos para el primer parto y 124 días menos entre el primero y segundo parto en comparación con las de genotipo *mm*. Sin embargo, esa diferencia no se observó entre ovejas bajo los genotipos determinados con la enzima *RsaI*. La conclusión que se deriva de las observaciones mencionadas son que las ovejas portadoras del alelo M conciben a edades más tempranas, y muestran intervalos más cortos entre el primero y segundo parto.

Por otra parte, las ovejas adultas no estacionales del Tecnológico de Virginia, mostraron una fertilidad media entre genotipos de 65.5 a 85.3 %. Las ovejas con al menos una copia del alelo (+) en el sitio de restricción con *MnlI* fueron 11.2 % más fértiles en primavera que las ovejas homocigotas para el alelo (-). Sin embargo, no se observó efecto del genotipo MTNR1A sobre el tamaño de la camada<sup>(25)</sup>. La descomposición de la variancia genotípica en aditiva y de dominancia en ovejas adultas para el locus MTNR1A fueron de 35.7 y 13.9 %<sup>(2)</sup>, respectivamente. La variancia aditiva para el marcador MTNR1A encontrada para fertilidad fue de 23.8 % y para el efecto de dominancia en este locus fue de 9.3 %. La heredabilidad para fertilidad en primavera fue de 11 % en adultos<sup>(25)</sup>, la cual se considera baja; por lo que existen también factores medioambientales asociados a esta característica.

Chu *et al*<sup>(86)</sup> encontraron efecto de marcador MNTR1A en tamaño de camada en ovejas Small Tailed Han en China con actividad ovulatoria no

It has been demonstrated that MTNR1A gene is a promising candidate to be used in marker assisted selection with the objective to improve fertility in out-of-season breeding flocks. Nevertheless, the mechanism by which polymorphism in MTNR1A gene has an influence on out-of-season reproduction has not been established, since according to Mateescu *et al*<sup>(25)</sup> it seems that the polymorphism that gives place to phenotypic difference is not due to amino acid change. It is possible that the effect is due to regulatory sequences or other near genes linked to MTNR1A gene and it is also feasible that melatonin effect be mediated by other biochemical or hormonal messengers.

## CONCLUSIONS

The identification of populations with allelic variants that improves prolificacy, ovulation rate and fertility in general permits the application of these reproductive advantages at commercial level, as well as the use of these ewes as animal models in the study of biological and physiological processes in the reproduction field. This is leading to a better understanding of the phenomena of ovarian control of folliculogenesis and ovulation rate. The identification of alleles that participate in improving fertility by molecular methods, allows the directed selection for prolificacy and obtain greater number of weaning lambs, at the same time allows the rational planning of mating's decreasing infertility in homozygous carrier ewes.

The study and development of populations or lineages with reduced seasonality is clearly possible through selection. The identification of QTL and molecular markers can substantially increase the response to selection.

The knowledge of allele presence with effect on fertility in different breeds opens the possibility of establishing populations for the study of interactions between different locus, as well as reservoir for the introgression of these alleles to commercial populations.

estacional. Estas ovejas también mostraron tener alta frecuencia para la variante FecB. Las ovejas que fueron heterocigotas para la ausencia del sitio de restricción *MnlI* tuvieron camadas grandes en el segundo parto comparadas con las homocigotas para la presencia del sitio de restricción (3.19 vs 2.25 corderos camada<sup>-1</sup>), y camadas grandes comparada con las ovejas heterocigotas tanto en primero como en el segundo parto.

Se ha demostrado que el gen MTNR1A es un candidato promisorio para ser usado en la selección asistida por marcadores a fin de mejorar la fertilidad de los rebaños fuera de época de empadre. No obstante, el mecanismo mediante el cual el polimorfismo en el gen MTNR1A influye sobre la reproducción fuera de época aún no se ha establecido, ya que de acuerdo con Mateescu *et al.*<sup>(25)</sup> parece ser que el polimorfismo que da lugar a la diferencia fenotípica no se debe al cambio de aminoácidos. Es posible que el efecto sea debido a secuencias reguladoras u otros genes cercanos ligados al gen MTNR1A, y también es posible que el efecto de la melatonina sea mediado vía otros mensajeros bioquímicos u hormonales.

## CONCLUSIONES

La identificación de poblaciones con variantes alélicas que favorecen la prolificidad, tasa ovulatoria y fertilidad en general, está permitiendo usar estas ventajas reproductivas a nivel comercial, así como el empleo de estas ovejas como modelos en el estudio de los procesos biológicos y fisiológicos en el campo de la reproducción. Esto está permitiendo conocer mejor los fenómenos del control ovárico de la foliculogénesis y la tasa de ovulación. La identificación de los alelos que participan en el aumento de la fertilidad por métodos moleculares permite incrementar de forma dirigida la prolificidad y obtener mayor número de corderos al destete, al mismo tiempo que permite planear los cruzamientos de una forma más racional para disminuir los casos de infertilidad en ovejas homocigotas portadoras.

The use of molecular tools for the identification of polymorphism in candidate genes is a promising strategy for identification of genetic basis that may be associated with levels of ovulation rate, prolificacy and seasonality, in hair breeds used in an outstanding way under tropical conditions and that represent an important economic segment in different equatorial countries.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This review is the result of the support to the first author under the framework of Estancias Posdoctorales Vinculadas al Fortalecimiento de los Posgrados Calidad of Conacyt (96724) and Secretaría de Educación Pública through the Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP).

*End of english version*

---

El estudio y desarrollo de poblaciones o líneas con estacionalidad reducida es claramente posible a través de la selección. La identificación de QTL y marcadores moleculares puede incrementar sustancialmente la respuesta a la selección.

El conocimiento de la presencia de alelos con efecto en el aumento de la fertilidad en diferentes razas, abre la posibilidad de poder establecer poblaciones para el estudio de las interacciones entre los diferentes locus, así como reservorio para la introgresión de estos alelos a poblaciones comerciales.

El empleo de herramientas moleculares para la identificación de polimorfismos en genes candidatos, es una estrategia promisorio para identificar las bases genéticas que pueden estar asociados a los niveles de la tasa ovulatoria, prolificidad y estacionalidad, en las razas de pelo que son empleadas de forma sobresaliente

## GENES CON EFECTO MAYOR SOBRE LA FERTILIDAD DE OVEJAS. REVISIÓN

en condiciones tropicales, y que representan un segmento económico importante en diferentes países ecuatoriales.

## AGRADECIMIENTOS

Esta revisión es fruto de los apoyos al primer autor bajo el marco de Estancias Posdoctorales Vinculadas al Fortalecimiento de los Posgrados Calidad del CONACYT (96724), y de la Secretaría de Educación Pública a través del Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP).

## LITERATURA CITADA

1. FAO. The state of the world animal genetic resources for food and agriculture. Edited by Barbara Rischkowsky and Daffyd Pilling. Roma. 2007; 524 p. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/010/a1250e/a1250e00.htm>
2. Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Jennifer JL, Jokiranta S, McLaren RJ, *et al.* Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 2000;25:279-283.
3. Montgomery GW, Galloway SM, Davis GH, McNatty KP. Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction* 2001;121:843-852.
4. Knight PG, Glister C. Local roles of TGF- $\beta$  superfamily members in the control of ovarian follicular development. *Anim Reprod Sci* 2003;78:165-183.
5. Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* 2004;25:72-101.
6. McNatty KP, Smith P, Moore LG, Reader K, Lun S, Hanrahan JP, *et al.* Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate. *Mol Cell Endocrinol* 2005;234(1-2):57-66.
7. Fabre S, Pierre A, Mulsant P, Bodin L, Pasquale ED, Persani L, Monget P, Monniaux D. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reprod Biol Endocr* 2006;4:20.
8. Guo X, Wang XF. Signaling cross-talk between TGF- $\beta$ /BMP and other pathways. *Cell Res* 2009;19:71-88.
9. Xu E, Li E, Han Y, Chen L, Xie Z. Differential expression of mRNAs encoding BMP/Smad pathway molecules in antral follicles of high-and low-fecundity Hu sheep. *Anim Reprod Sci* 2010;120:47-55.
10. Hanrahan PJ, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM. 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* 2004;70:900-909.
11. Silva BDM, Castro EA, Souza CJH, Paiva SR, Sartori R, Franco MM, Azevedo HC, *et al.* 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* 2011;42(1):89-92.
12. Bodin L, San Cristobal M, Lecerf F, Mulsant P, Bibe B, Lajous D, Belloc JP, Eychenne F, Amigues Y, Elsen JM. Segregation of a major gene influencing ovulation in progeny of Lacaune meat sheep. *Genet Selec Evol* 2002;34:447-464.
13. Monteagudo LV, Ponz R, Tejedor MT, Lavina A, Sierra I. 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* 2009;110:139-146.
14. Wilson T, Wu XY, Juengel JL, Ross IK, Lumsden JM, Lord EA, Dodds KG, Walling GA, Mcewan JC, O'Connell AR, McNatty KP, Montgomery GW. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol Reprod* 2001;64:1225-1235.
15. Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, Schilber L, Monget P, Laneluc I, Pisselet C, *et al.* Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:5104-5109.
16. Souza CJ, Macdugall C, Campbell BK, Mcneilly AS, Baird DT. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPRI1B) gene. *J Endocrinol* 2001;169:R1-R6.
17. Davis GH, Galloway SM, Ross IK, Gregan SM, Ward J, Nimbkar BV, Ghalsasi PM, *et al.* DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) Mutation. *Biol Reprod* 2002;66:1869-1874.
18. Davis GH, Balkrishnan L, Ross IK, Wilson T, Galloway SM, Lumsden BM, Hanrahan JP, *et al.* Investigation of the Booroola (Fec B) and Inverdale (Fec X I) mutation in 21 prolific breeds and strains of sheep samples in 13 countries. *Anim Reprod Sci* 2006;92:87-96.
19. Montgomery GW. Genome mapping in ruminants and map locations for genes influencing reproduction. *Rev Reprod* 2000;5(1):25-37.
20. Drouilhet L, Lecerf F, Bodin L, Fabre S, Mulsant P. Fine mapping of the FecL locus influencing prolificacy in Lacaune sheep. *Anim Genet* 2009;40(6):804-12.
21. Hua GH, Chen SI, Yao HG, Wu WS, Shen Z, Chen QK, Chen L, *et al.* RFLP of INHA and its relationship to goat litter size. *Yi Chuan* 2007;29(8):972-6.
22. He Y, Ma X, Liu X, Zhang C, Li J. Candidate genes polymorphism and its association to prolificacy in Chinese goats. *J Agric Sci* 2010;2(1):88-92.
23. Chu MX, Zhuang H, Zhang Y, Jin M, Li X, Di R, Cao G, *et al.* Polymorphism of inhibin  $\alpha$ B gene and its relationship with litter size in sheep. *J Anim Sci* 2011;82:57-61.61
24. Notter DR. Genetic aspect of reproduction in sheep. *Reprod Dom Anim* 2008;43 (Suppl 2):122-128.
25. Mateescu RG, Lunsford AK, Thonney ML. Association between melatonin receptor 1A gene polymorphism and reproductive performance in Dorset ewes. *J Anim Sci*

- 2009;87:2485-2488.
26. Palmer JS, Zhao ZZ, Hoekstra C, Hayward NK, Webb PM, Whiteman DC, Martin NG, *et al.* Novel variants in growth differentiation factor 9 in mothers of dizygotic twins. *J Clin Endocr Metab* 2006;91:4713-4716.
  27. Davis GH, Mcewan JC, Fennessy PF, Dodds KG, McNatty KP. Infertility due to bilateral ovarian hypoplasia in sheep homozygous (FecXI FecXI) for the Inverdale prolificacy gene located on the X chromosome. *Biol Reprod* 1992;46:636-640.
  28. McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, *et al.* Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 cooperate to regulate granulosa cell function. *Reproduction* 2005;129:473-480.
  29. Juengel JL, Reader KL, Bibby AH, Lun S, Ross I, Haydon LJ, McNatty KP. The role of bone morphogenetic proteins 2, 4, 6 and 7 during ovarian follicular development in sheep: contrast to rat. *Reproduction* 2006;131(3):501-513.
  30. Yoshino O, McMahon HE, Sharma S, Shimasaki S. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103(28):10678-10683.
  31. Shimasaki S, Zachow RJ, Li D, Kim H, Iemura SI, Ueno N, Sampath K, Chang RJ, Erickson GF. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:7282-7287.
  32. Pangas SA, Li X, Umans L, Zwijsen A, Huylebroeck D, Gutierrez C, Wang D, Martin JF, *et al.* Conditional deletion of *Smad1* and *Smad5* in somatic cells of male and female gonads leads to metastatic tumor development in mice. *Mol Cell Biol* 2008;28(1):248-257.
  33. Davis GH. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet Sel Evol* 2005;37:S11-S23.
  34. Chu MX, Mu YL, Fang L, Ye SC, Sun SH. Prolactin receptor as a candidate gene for prolificacy of Small Tail Han sheep. *Animal Biotechnol* 2007;18(1):65-73.
  35. Galloway SM, Gregan SM, Wilson T, McNatty KP, Juengel JL, Ritvos O, Davis GH. BMP15 mutations and ovarian function. *Mol Cell Endocrinol* 2002;191:15-18.
  36. Barzegari A, Atashpaz S, Ghabili K, Nemati Z, Rustaei M, Azarbaijani R. Polymorphisms in GDF9 and BMP15 associated with fertility and ovulation rate in Moghani and Ghezel sheep in Iran. *Reprod Dom Anim* 2010;45:666-669.
  37. Bodin L, Di Pasquale E, Fabre S, Bontoux M, Monget P, Ersani L, Mulsant P. 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. *Endocrinol* 2007;148:393-400.
  38. Martínez-Royo A, Jurado JJ, Smulders JP, Martí JJ, Alabart JL, Roche A, Fantova E, *et al.* A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. *Anim Genet* 2008;39(3):294-297.
  39. Martínez-Royo A, Dervishi E, Alabart JL, Jurado JJ, Folch J, Calvo JH. Freemartinitism and FecXR allele determination in replacement ewes of the Rasa Aragonesa sheep breed by duplex PCR. *Theriogenology* 2009;72(8):1148-52.
  40. Hashimoto O, Moore RK, Shimasaki S. Posttranslational processing of mouse and human BMP-15: potential implication in the determination of ovulation quota. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(15):5426-5431.
  41. Davis GH, Montgomery GW, Allison AJ, Kelly RW, Bray AR. Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep. *NZ J Agric Res* 1982;25:525-529.
  42. Lahoz B, Alabart JL, Jurado JJ, Calvo JH, Martínez-Royo A, Fantova E, Folch J. Effect of the FecX(R) polymorphism in the bone morphogenetic protein 15 gene on natural or equine chorionic gonadotropin-induced ovulation rate and litter size in Rasa Aragonesa ewes and implications for on-farm application. *J Anim Sci* 2011;89(11):3522-30.
  43. Demmers KJ, Smaill B, Davis GH, Dodds KG, Juengel JL. Heterozygous Inverdale ewes show increased ovulation rate sensitivity to pre-mating nutrition. *Reprod Fertil Dev* 2011;23(7):866-75.
  44. Javanmard A, Azadzadeh N, Esmailzadeh AK. Mutations in bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 genes are associated with increased litter size in fat-tailed sheep breeds. *Vet Res Commun* 2011;35(3):157-67.
  45. Roy J, Polley S, De S, Mukherjee A, Batabyal S, Pan S, Brahma B, Datta TK, *et al.* Polymorphism of fecundity genes (FecB, FecX, and FecG) in the Indian Bonpala sheep. *Anim Biotechnol* 2011;22(3):151-62.
  46. Shabir M, Ganai TA. Nucleotide sequencing and DNA polymorphism studies of BMP 15 gene in Corriedale and local Kashmir valley sheep (*Ovis aries*). *Gene* 2012; 499(1):231-235.
  47. Polley S, De S, Brahma B, Mukherjee A, Vinesh PV, Batabyal S, Arora JS, Pan S, Samanta AK, Datta TK, Goswami SL. Polymorphism of BMPR1B, BMP15 and GDF9 fecundity genes in prolific Garole sheep. *Trop Anim Health Prod* 2010;42:985-993.
  49. Fatehi AN, Van Den Hurk R, Colenbrander B, Daemen AJ, Van Tol HT, Monteiro RM, Roelen BA, Bevers MM. Expression of bone morphogenetic protein2 (BMP2), BMP4 and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP2 and BMP4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. *Theriogenology* 2005;63(3):872-89.
  50. Edwards SJ, Reader KL, Lun S, Western A, Lawrence S, McNatty KP, Juengel JL. The cooperative effect of growth and differentiation factor-9 and bone morphogenetic protein (BMP)-15 on granulosa cell function is modulated primarily through BMP receptor II. *Endocrinol* 2008;149(3):1026-1030.
  51. Zhu G, Guo B, Pan D, Mu Y, Feng S. Expression of bone morphogenetic proteins and receptors in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Anim Reprod Sci* 2008;104:275-283.
  52. Mazerbourg S, Klein C, Roh J, Kaivo-Oja N, Mottershead DG, Korchynskiy O, Ritvos O, Hsueh AJ. Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5. *Mol Endocrinol* 2004;18(3):653-65.
  53. Drouilhet L, Taragnat C, Fontaine J, Duittoz A, Mulsant P, Bodin L, Fabre S. Endocrine characterization of the reproductive axis in highly prolific Lacaune sheep homozygous for the FecLL mutation. *Biol Reprod*

## GENES CON EFECTO MAYOR SOBRE LA FERTILIDAD DE OVEJAS. REVISIÓN

- 2010;82:815-824.
54. Drouilhet L, Mansanet C, Sarry J, Tabet K, Bardou P, *et al.* The Highly Prolific Phenotype of Lacaune Sheep Is Associated with an Ectopic Expression of the B4GALNT2 Gene within the Ovary. *PLoS Genet* 2013;9(9):e1003809. doi:10.1371/journal.pgen.1003809.
  55. Rothschild M, Jacobson C, Vaske D, Tuggle C, Wang L, Short T, Eckardt G, *et al.* The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. *Proc Natl Academy Sci. USA* 1996;93:201-205.
  56. Hewitt SC, Korach KS. Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues. *Reproduction* 2003;125(2):143-149.
  57. Shi H, Bai J, Niu Z, Muniresha, Fen L, Jia B. Study on candidate gene for fecundity traits in Xingjiang Cele black sheep. *African J Biotechnol* 2010;9(49):8498-8505.
  58. Bi XD, Chu MX, Jin HG, Fang L, Ye SC. Estrogen receptor as a candidate gene for prolificacy of small tail Han sheep. *Yi Chuan Xue Bao* 2005;32(10):1060-1065.
  59. Di R, Jia LH, Chu MX, Chen HQ, Fang L. Polymorphism Analysis of Exon 4 of Estrogen Receptor Gene in Sheep. *China Anim Husb Vet Med* 2008;12. [on line]: [http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTOTAL-GWXX200812024.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-GWXX200812024.htm)
  60. Robertson DM, Foulds LM, Leversha L, Morgan FJ, Hearn MT, Burger HG, Wettenhall RE, *et al.* Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. *Biochem and Biophys Res Comm* 1985;126:220-226.
  61. Woodruff TK, Besecke LM, Groome N, Draper LB, Schwartz NB, Weiss J. Inhibin A and inhibin B are inversely correlated to follicle-stimulating hormone, yet are discordant during the follicular phase of the rat estrous cycle, and inhibin A is expressed in a sexually dimorphic manner. *Endocrinol* 1996;137:5463-5467.
  62. Mason AJ, Hayflick JS, Ling N, Esch F, Ueno N, Ying SY, Guillemain R, *et al.* Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor-beta. *Nature* 1985;318(6047):659-63.
  63. Jaeger C, Hiendleder S. Cosmid cloning and characterization of the coding regions and regulatory elements of the ovine a-(INHBA), ðA-(INHBA) and ðB-inhibin (INHBB) genes. *Anim Genet* 1994;25(Suppl 2):33.
  64. Hiendleder S, Lewalski H, Jaeger C, Plante Y. Genomic cloning and comparative sequence analysis of different alleles of the ovine ðA-inhibin/activin (INHBA) genes as a potential QTL for litter size. *Anim Genet* 1996;27(Suppl 2):119.
  66. Hiendleder S, Lewalski H, Jaeger C, Pracht P. Nucleotide sequence of ovine ð-inhibin (INHBA) genes and evaluation of RFLP marker effects on reproductive performance. *Anim Genet* 2002;33(3):247-248.
  66. Leyhe B, Hiendleder S, Jaeger C, Wassmuth R. Pronounced differences in the frequency Taq I ðA inhibin alleles between sheep breeds with different reproductive performance. *Anim Genet* 1994;25(1):41-43.
  67. Vincent AL, Wang L, Tuggle CK, Robic A, Rothschild MF. Prolactin receptor maps to pig chromosome 16. *Mammal Genom* 1997;8(10):793-794.
  68. Jenkins ZA, Henry HM, Sise JA, Montgomery GW. Follistatin (FST), growth hormone receptor (GHR), and prolactin receptor (PRLR) genes map to the same region of sheep chromosome 16 [abstract]. *Anim Genet* 2000;31(4):280.
  69. Chu MX, Wang XC, Jin M, Di R, Chen HQ, Zhu GQ, Fang L, Ma YH, Li K. DNA polymorphism of 5' flanking region of prolactin gene and its association with litter size in sheep. *J Anim Breed Genet* 2009;126(1):63-68.
  70. Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev* 1991;12(3):235-251.
  71. Zhang GX, Chu MX, Wang JY, Fang L, Ye SC. Polymorphism of exon 10 of prolactin receptor gene and its relationship with prolificacy of Jining Grey goats. *Yi Chuan* 2007;29(3):329-36.
  72. Bittman EL, Dempsey RJ, Karsch FJ. Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. *Endocrinol* 1983;113:2276-2283.
  73. Weaver DR, Liu C, Reppert SM. Nature's knockout: The Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol Endocrinol* 1996;10:1478-1487.
  74. Notter DR, Cockett NE. Opportunities for detection and use of QTL influencing seasonal reproduction in sheep: a review. *Genet Sel Evol* 2005;37(Suppl 1):S39-S53.
  75. Notter DR. Genetic improvement of out-of-season breeding through selection, in: *Proc Out-of-Season Breeding Symp.* Ames, Iowa 1992:55-81.
  76. Pearce DT, Oldham CM. The ram effect, its mechanism and application to the management of sheep, in: Lindsay DR, Pearce DT editors. *Reproduction in sheep.* Aust Academy Sci. Canberra 1984:26-34.
  77. Arroyo J. Reproductive seasonality of sheep in Mexico. *Trop Subtrop Agros* 2011;14:829-845.
  78. Hinojosa-Cuellar JA, Oliva-Hernández J. Distribución de partos por estación en ovejas de razas de pelo y cruces en un ambiente tropical húmedo. *Rev Cient FCV-Luz* 2009;XIX:288-294.
  79. Luna PC, Berumen AAC, Aguilar CJA, Cansino AGR. Fertility of hair ewes supplemented with African palm kernel. *Livest Res Rural Develop* 2010; [on line]: <http://www.lrrd.org/lrrd22/10/luna22178.htm>
  80. Wildeus S. Hair sheep genetic resources and their contribution to diversified small ruminant production in the United States. *J Anim Sci* 1997;75:630-640.
  81. Notter DR, Chemineau P. Nocturnal melatonin and prolactin plasma concentrations in sheep selected for fertility in autumn lambing. *J Anim Sci* 2001;79:2895-2901.
  82. Messer LA, Wang L, Tuggle CK, Yerle M, Chardon P, Pomp D, Womack JE, Barendse W, Crawford AM, Notter DR, Rothschild MF. Mapping of the melatonin receptor 1a (MTNR1A) gene in pigs, sheep, and cattle. *Mamm Genome* 1997;8:368-370.
  83. Barrett P, Conway S, Jockers R, Strosberg AD, Guardiola-Lemaitre B, Delagrègne P, Morgan PJ. Cloning and functional analysis of a polymorphic variant of the ovine Mel 1a melatonin receptor. *Biochem Biophys Acta* 1997;1356:299-307.
  84. Notter DR, Cockett NE, Hadfield TS. Evaluation of melatonin receptor 1a as a candidate gene influencing reproduction in

- a fall-lambing sheep flock. J Anim Sci 2003;81:912-917.
85. Migaud M, Gavet S, Pelletier J. Partial cloning and polymorphism of the melatonin1a (Mel1a) receptor gene in two breeds of goat with different reproductive seasonality. J Anim Sci 2002;94:103-107.
86. Chu MX, Ji CL, Chen GH. Association between PCR-RFLP of melatonin receptor 1a gene and high prolificacy in Small Tail Han sheep, Asian-Aust J Anim Sci 2003;16:1701-1704.