

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**IDENTIFICACIÓN DEL ALELO FecX^R DEL GEN BMP15 Y SU ASOCIACIÓN
CON PROLIFICIDAD EN OVEJAS DE PELO: PELIBUEY Y DORPER**

TESIS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA
M.V.Z. JESÚS GARCÍA VILLEGAS

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO.

NOVIEMBRE DE 2012

Identificación del alelo FecX^R del gen BMP15 y su asociación con prolificidad en ovejas de pelo: Pelibuey y Dorper. Requisito para obtener el grado de: Maestro en Ciencias Veterinarias.

Dr. ALBERTO BARRERAS SERRANO
DIRECTOR

Dr. ALEJANDRO ÁNGEL GÓMEZ DANÉS
CO-DIRECTOR

Dr. CLEMENTE LEMUS FLORES
ASESOR

Ph.D. FERNANDO FIGUEROA SAAVEDRA
ASESOR

Dr. EDUARDO SANCHEZ LÓPEZ
ASESOR

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a **Dios NS**, por permitirme vivir y por guiarme a lo largo de mi vida, tratando hacer de mí una persona exitosa tanto en el campo profesional como personal.

Al **Dr. ALBERTO BARRERAS SERRANO**, por confiar en mí y aceptarme como estudiante de maestría y por su valioso apoyo durante la misma.

Al **Dr. ALEJANDRO ANGEL GÓMEZ DANÉS**, por recomendarme con el Dr. Alberto Barreras, por su apoyo en la localización de las explotaciones de ovinos y por su ayuda en la recolección de muestras.

Al **Dr. CLEMENTE LEMUS FLORES**, por su disponibilidad y valioso apoyo en el trabajo de laboratorio.

A los coordinadores de la Maestría en Ciencias Veterinarias; **Dr. Alejandro Martínez Partida**, por ayudarme a ingresar al IICV. **Dra. Maritza Manríquez Núñez**, por su ayuda en los trámites de CONACYT y del mismo Instituto.

Al **CONACYT**, por su apoyo económico, que sin él hubiese sido imposible que realizara esta meta tan importante en mi vida profesional.

DEDICATORIAS

A mi esposa Alma. Por su comprensión al tener que alejarme de ella durante mis estudios de maestría.

A mi hija Valeria. Por ser mi más grande motivación en la vida. Te Amo Mucho.

A mis padres Irma y Pedro. Por su apoyo incondicional desde que era un niño.

A mis hermanos Dalia y Pedro. Por permitirme tratar de ser un hermano ejemplar.

A mis abuelos Felipe †, Francisca, Rosario y Miguel. Por sus consejos y bendiciones.

A mis suegros Tomas y María Luisa. Por su apoyo durante mi ausencia al cuidar de mi esposa e hija.

A mis tíos y tías. Por inculcarme desde mi adolescencia la necesidad de prepararme profesionalmente.

A mis primos y primas. Por sus buenas vibras y deseos.

A mis amigos y compañeros. Por su apoyo en los momentos difíciles.

LISTA DE CUADROS

| Cuadro | | Pág. |
|--------|--|------|
| 1 | Comparación de tipo de parto en hembras tipo silvestre y mutantes para el gen BMP15 | 3 |
| 2 | Razas de ovinos portadoras mutantes del gen BMP15 | 23 |
| 3 | Efecto del gen BMP15 sobre la ovulación | 24 |
| 4 | Número de hembras y porcentajes considerando el número de corderos nacidos por parto | 33 |
| 5 | Distribución de frecuencias genotípicas para el alelo FecX ^R del gen BMP15 en ambas razas | 36 |
| 6 | Identificación del genotipo AB del alelo FecX ^R del gen BMP15 en base a su prolificidad de ambas razas juntas | 38 |
| 7 | Promedios de prolificidad para cada genotipo | 39 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Pág. |
|--------|--|------|
| 1 | Alineamiento parcial del segundo exón del gen BMP15, mostrando la delección FecX ^R en los machos 1 y 2, comparadas con la secuencia tipo silvestre | 17 |
| 2 | Momento en el que actúa durante el crecimiento folicular el gen BMP15 | 25 |
| 3 | Representación esquemática del progreso de foliculogenesis en ovejas tipo silvestre (arriba), portadoras de la mutación de BMP15 en heterocigosis (centro) y portadoras de la mutación de BMP15 en homocigosis (abajo) | 26 |
| 4 | PCR del precursor de BMP15. Columna 9: oveja tipo silvestre, con banda de 312 pb. Columnas 1,2,3,4,5,7 y 8: ovejas heterocigotas FecX ^R /tipo silvestre (bandas de 312 pb y de 295 pb). Columna 6: Marcador de Peso Molecular | 35 |

RESUMEN

Identificación del alelo $FecX^R$ del gen BMP15 y su asociación con prolificidad en ovejas de pelo: Pelibuey y Dorper.

La prolificidad es un carácter de importancia económica al determinar la productividad y la rentabilidad de los rebaños ovinos. El progreso genético esperado en un programa de mejora por selección para este carácter sería lento ya que el índice de herencia es bajo (0.049) por lo que esquemas de selección asistida a favor de genes mayores puede ser una estrategia para aumentar la prolificidad. En razas de lana se han encontrado variantes genéticas, esto lleva a suponer que también podrían existir estas variantes u otras en razas de pelo como la Pelibuey y Dorper. En este trabajo se identificó el alelo $FecX^R$ del gen BMP15 en ovejas Pelibuey y Dorper y se analizó su relación con el carácter prolificidad. Para ello se analizaron 335 ovejas de las razas Pelibuey y Dorper provenientes de seis ranchos. Se identificaron las hembras de acuerdo a sus registros de producción en prolificidades alta (≥ 3 corderos), media (>1.5 y <3 corderos) y baja (≤ 1.5 corderos) sin considerar el número de parto. Se compararon los genotipos AA (tipo silvestre o normal) y AB (mutante) en su relación con prolificidad. La raza Dorper presentó mayor porcentaje de prolificidad y mostró mayor porcentaje de hembras heterocigotas. En ambas razas el genotipo AB se relacionó con las hembras de alta prolificidad, registrando una media de 3.0 en la raza pelibuey y de 3.2 corderos por parto en la raza Dorper.

Palabras Clave: Ovejas, Genes Mayores, prolificidad.

ABSTRACT

Identification of allele FecX^R of the BMP15 gene and its association with prolificacy in short hair sheep: Pelibuey and Dorper.

Prolificacy is a economic trait that determines productivity and profitability in sheep herds. The expected genetic progress by improvement programs through of selection in this trait would be slow since the heritability is low (0.049), therefore assisted selection schemes on major genes could be the best strategy to increase prolificacy. In this study the allele FecX^R of the BMP15 gene was identify in Pelibuey and Dorper short hair breed and its association with prolificacy trait was investigated. A total of 335 blood samples and prolificacy records of ewes from Pelibuey and Dorper breed were analyzed. According to prolificacy records, ewes were classified as high (≥ 3 lambs), medium (> 1.5 and < 3 lambs) and low (≤ 1.5 lambs) prolificacy regardless of the number of calving. The ewes from two breeds were genotyped for the BMP15 polymorphisms by PCR technique. The genotypes AA (wild or normal type) and AB (mutant) were compared in their relationship with prolificacy. Dorper breed showed higher of prolificacy percentage and higher heterozygous genotypes. Prolificacy trait was significantly influenced by genotype of the ewe for BMP15 gene ($P < 0.01$). Heterozygous genotypes for the locus showed higher prolificacy, with an average of 3.0 and 3.2 lambs per birth in Pelibuey and Dorper breed, respectively.

Keys words: ewes, major gene, prolificacy

CONTENIDO

| | Pág |
|---|-----|
| LISTA DE CUADROS | i |
| LISTA DE FIGURAS | ii |
| RESUMEN | iii |
| ABSTRACT | iv |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| REVISIÓN DE LITERATURA | 2 |
| Prolificidad | 2 |
| Factores que modifican la prolificidad | 4 |
| Mejora genética para prolificidad | 10 |
| Técnicas de biología molecular en apoyo a la mejora genética en prolificidad | 15 |
| Uso de genes candidatos | 17 |
| Proteína Morfogénica Ósea (BMP15) | 21 |
| <i>Naturaleza bioquímica</i> | 21 |
| <i>Localización</i> | 21 |
| <i>Función</i> | 22 |
| <i>Asociación con prolificidad</i> | 27 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 28 |
| Ubicación | 28 |
| Animales | 28 |
| Identificación de hembras de acuerdo a su prolificidad | 29 |
| Genotipificación molecular | 29 |
| Análisis estadístico | 30 |
| RESULTADOS Y DISCUSIONES | 32 |
| Identificación de hembras prolíficas | 32 |
| Genotipificación molecular | 34 |
| Relación de genotipos | 37 |
| CONCLUSIONES | 41 |

LITERATURA CITADA 42

INTRODUCCIÓN

En ovejas, la prolificidad o número de corderos nacidos por parto, es un carácter de importancia económica ya que determina la rentabilidad de la explotación. El progreso genético esperado en un programa de mejora por selección para el carácter prolificidad sería lento debido a que el índice de herencia para prolificidad es bajo (0.049). Por ello la selección asistida a favor de genes mayores es una estrategia recomendada para aumentar la prolificidad en ovejas. Durante las dos últimas décadas, los genetistas han creado familias informativas para estudios de segregación y mapeo de algunos genes mayores con el fin de encontrar su relación con prolificidad. En este sentido, a las ovejas se les ha considerado como especie modelo para identificar los genes implicados en los mecanismos de control de la tasa de ovulación. Las técnicas de biología molecular han permitido identificar genes mayores como el gen BMP15 (Proteína Morfogénica Osea), que está asociado con la prolificidad. Esto se ha demostrado en razas de lana, pero no en razas de pelo como la Pelibuey y Dorper

El objetivo del presente estudio fue identificar el alelo FecX^R del gen BMP15 y ver la asociación que tiene con el carácter prolificidad en una muestra de ovejas prolíficas de las razas Pelibuey y Dorper.

REVISIÓN DE LITERATURA

Prolificidad

La prolificidad es un carácter económicamente importante en las explotaciones ovinas productoras de carne al permitir aumentar el número de corderos nacidos por oveja y año (Pardos et al., 2007).

El carácter prolificidad, está ligado al cromosoma sexual X. Se ha demostrado que el gen BMP15 (Proteína Morfogénica Ósea) actúa sobre la tasa de ovulación, la cual está asociada con la prolificidad o número de corderos nacidos por parto en las hembras (Cuadro 1) Hanrahan et al., 2004; Bodin et al., 2007.

El número de corderos nacidos por oveja, está determinado por la tasa de ovulación. Para obtener un promedio de dos crías por parto, es necesario incrementar la tasa de ovulación a tres ovocitos, ya que posteriormente hay pérdidas en la fertilización y mortalidad embrionaria (Bister et al., 1999).

Un estudio hecho por Dickerson (1996), señala que la importancia del carácter prolificidad está relacionada con su efecto en la eficiencia y potencial de rentabilidad de la producción de corderos para el abasto. Además, es la característica responsable de la mayor parte de la variación del comportamiento

Cuadro 1. Comparación del tipo de parto en hembras tipo silvestre y mutantes para el gen BMP15

| Explotación | | | Tipo de parto | | Total |
|-------------|----------------|-----|------------------|--------------|-------|
| | | | Sencillo o doble | Triple o mas | |
| 1 | Tipo silvestre | n | 4614 | 73 | 4687 |
| | | (%) | 98.4 | 1.6 | 100 |
| | Mutantes | n | 14 | 9 | 23 |
| | | (%) | 60.9 | 39.1 | 100 |
| 2 | Tipo silvestre | n | 7389 | 178 | 7567 |
| | | (%) | 97.6 | 2.4 | 100 |
| | Mutantes | n | 33 | 5 | 38 |
| | | (%) | 86.8 | 13.2 | 100 |
| 3 | Tipo silvestre | n | 23847 | 548 | 24395 |
| | | (%) | 97.8 | 2.2 | 100 |
| | Mutantes | n | 23 | 7 | 30 |
| | | (%) | 76.7 | 23.3 | 100 |

(Laviña et al., 2009)

reproductivo de especies multíparas (Pérez-Enciso y Bidanel, 1997) y la que tiene el mayor potencial para cambio por selección (Bradford, 2002).

Factores que modifican la prolificidad

La prolificidad se ve influenciada por dos factores: 1.- Efectos genéticos como la raza y la variación individual y 2.- Efectos ambientales como el nivel de nutrición antes y después del empadre, la edad de la oveja, el número de parto, sincronización de celos con hormonas y condiciones climáticas (Germán, 2002; Macedo y Castellanos, 2004; Macedo y Arredondo, 2008).

El aumento o la disminución de la prolificidad se ve afectada por la tasa ovulatoria, el número de óvulos fertilizados y por la sobrevivencia embrionaria, además del número de parto, efecto del rebaño y tratamientos hormonales (García et al., 2004).

En borregas Pelibuey la prolificidad es baja, 1.16 en Colombia (Mejía et al., 2009), 1.2 en Venezuela (Dickson et al., 2004), 1.35 en Cuba (Guevara et al., 1986), comparada con razas lanares y con otras razas de ovinos de pelo, como lo es la raza Barbados BlackBelly (González et al., 1991), donde se registran valores para primiparas de 1.40 ± 0.08 , borregas de 2 a 4 años con 1.67 ± 0.06 , ovejas adultas de 5 a 6 años con 1.75 ± 0.07 y borregas de 8 a 10 años con 1.80 ± 0.29 corderos (Rojas y Rodríguez, 1995). Sin embargo, Macedo y Castellanos (2004), obtuvieron una prolificidad de 2.2 en un grupo de 50 ovejas

Pelibuey bajo condiciones de manejo intensivo y con suplementación alimenticia estratégica en Colima, México.

Un estudio publicado por Cortéz et al. (2006) reportó una media para índice de prolificidad de 1.27 para borregas Pelibuey de tres años de edad y con 35 kg de peso vivo nacidas en diferentes épocas del año, manifestando la inexistencia aparente de diferencias estadísticas en el efecto de épocas de Otoño-Invierno y de Primavera-Verano.

Por su parte, Macedo y Hummel (2006), bajo un sistema extensivo en Colima, México, mencionan que el número de parto no afectó ($P>0.05$) la prolificidad, sugiriendo que el tamaño de camada incrementa conforme aumenta el número de partos de la hembra y luego declina en forma inversa con la edad de la oveja (Rojas y Rodríguez, 1995), mostrando valores más bajos en borregas de primer parto; en ovejas del primero al quinto parto se observó un incremento en la prolificidad de 1.27 a 1.53 (Macedo y Hummel, 2006). Segura et al. (1996), confirman este mismo efecto, el cual es significativo ($P<0.01$), con valores de 1.35 para ovejas de primer y tercer parto, 1.62 para el cuarto y quinto parto y 1.75 en ovejas de quinto parto en adelante. Pérez et al. (2005), concluyeron que el genotipo, el tipo y mes de parto afectan la prolificidad, observando la mayor prolificidad en hembras de tercer o más partos y en empadres de Abril a Diciembre. Por el contrario, Galina et al. (1996), no encontraron un efecto del número de parto ni de raza sobre la prolificidad.

En cuanto a la selección en base al tipo de parto, éste procedimiento fue utilizado con éxito en Nueva Zelanda (Clarke, 1972) y Australia (Turner, 1978) para incrementar la prolificidad en ovinos Romney Marsh y Merino, respectivamente, y en un estudio en México se encontró que ovejas Blackbelly que provenían de parto doble y triple tuvieron un mayor tamaño de camada, en comparación con las provenientes de parto simple (Rojas y Rodríguez, 1995). Existen otras razas de ovejas tropicales que han alcanzado un promedio de prolificidad de 1.8, como es el caso de la Barbados Blackbelly (Rastogi, 2001) a través de selección y Morada Nova mediante cruzamiento (Rajab et. al., 1992).

La prolificidad también se ve afectada por el efecto de año, el que generalmente se explica por la variación en la cantidad y distribución de lluvias entre años, lo que a su vez influye en la producción de forraje (Dickson et al., 2004; Berhanu y Aynalem, 2009).

No existe suficiente información en relación al efecto que el color de la capa externa de la oveja tiene en la prolificidad. En trabajos con ovejas Pelibuey efectuados en México, el color de la capa externa de la oveja no tuvo influencia ($P > 0.05$) en esta característica (González et al., 2001; Campos et al., 2000). En cabras West African Dwarf, Ebozoje e Ikeobi (1998), encontraron que las cabras con capa externa de color negro tuvieron una prolificidad mas alta, comparadas con cabras cuya capa externa era de color blanca.

Datos publicados por Macedo y Hummel (2006), mencionan que la época de parto también influye en la prolificidad ($P < 0.01$), y por lo tanto en la temporada de empadre. Ovejas con parto en Enero-Abril tuvieron la mayor prolificidad que aquellas que parieron en Septiembre-Diciembre y de Mayo-Agosto (González et al., 2001).

Varios autores (González, 1993; Rojas y Rodríguez, 1995; Martínez, 1999) han señalado que las ovejas servidas en el Otoño tienen mayor prolificidad, efecto que podría atribuirse a una abundancia de forraje al término de la época de lluvias, por lo que las ovejas tienen al empadre una buena condición corporal, además de buena tasa ovulatoria y supervivencia embrionaria (Brash et al., 1994).

En un estudio, Macedo y Alvarado (2005), evaluaron el efecto de la época de monta sobre la prolificidad, la tasa de destete y la mortalidad de corderos en dos grupos de ovejas Pelibuey manejadas bajo diferentes sistemas de alimentación en Colima, México. En el sistema intensivo, la prolificidad encontrada en la época de empadre Primavera-Verano y Otoño-Invierno fue de 2.21 ± 0.12 y 2.37 ± 0.15 , respectivamente. Sin embargo en el sistema extensivo los valores reportados fueron menores 1.55 ± 0.08 y 1.56 ± 0.15 para la época de Primavera-Verano y Otoño-Invierno, respectivamente. Concluyeron que la época de monta no afecta la prolificidad y la tasa de destete de las ovejas Pelibuey manejadas bajo condiciones de alimentación intensivas o extensivas. Además mencionan que la productividad de las ovejas fue

notablemente mejorada por medio de la intensificación del sistema de producción. El desempeño reproductivo de la oveja depende de la cantidad de alimento disponible y de la calidad nutricional que este tenga. En estudios previos se ha demostrado una relación positiva entre el peso de la oveja y la tasa de ovulación, y una alta asociación entre el peso corporal de la oveja y la prolificidad (Macedo y Hummel, 2006).

Por su parte Dickson et al. (2004), realizaron un estudio para evaluar los factores que afectan el intervalo entre partos y la prolificidad en un hato de borregas Pelibuey bajo un sistema de pastoreo restringido y observaron que el año del parto tuvo un efecto significativo ($P < 0.01$) en la prolificidad que varió desde 1.07 ± 0.09 corderos por parto en el año de menor prolificidad hasta 1.38 ± 0.09 en el año de mayor prolificidad. Es probable que este último valor esté relacionado con el manejo general y con la condición corporal al parto, puesto que el peso de la madre estuvo correlacionado significativamente ($P < 0.01$) con la prolificidad; los valores más bajos se encontraron durante años con el menor peso de la madre. No observaron efecto significativo de la estación o el número del parto sobre la prolificidad.

Estudios hechos por Foote y Mathews (1983) y Michels et al. (2000), señalan que hay un efecto positivo en el incremento en los niveles de energía y proteína suplementada durante el empadre (flushing) sobre la condición corporal de la hembra y ésta a su vez, sobre la tasa de ovulación, la mortalidad embrionaria y por consiguiente sobre el número de crías nacidas.

Una dieta de alimentación restringida, retrasa el inicio del estro, reduce la tasa de ovulación y disminuye el porcentaje de gestación en comparación con una dieta nutricional adecuada. Los factores ambientales como altas o bajas temperaturas y el manejo inadecuado, pueden retrasar o suprimir los signos de estro y deprimir la tasa de ovulación (Sharkey et al., 2001; Córdoba-Izquierdo et al., 2008).

Por su parte, Bulbarela-García et al. (2009), al evaluar el efecto de L-arginina y aceite de pescado en el comportamiento reproductivo de ovejas de pelo sincronizadas con un progestágeno, observaron efectos positivos al utilizar el progestágeno acetato de fluorogestona mas L-arginina ya que mejoró la presentación de estros, la tasa ovulatoria y la prolificidad. Este aminoácido es usado para la síntesis de óxido nítrico, quien estimula la enzima intracitoplasmática guanilato ciclasa soluble, responsable de la síntesis de guanosín monofosfato cíclico (cGMP) que participa en el desarrollo folicular y la ovulación (Dhandapani y Brann, 2000; Alderton et al., 2001).

La adición de ácidos grasos poliinsaturados (aceite de maíz) en la dieta de ovejas Pelibuey iniciando el día 7 después de colocado el implante para sincronizar y administrados durante un periodo de 21 días, tienen un efecto positivo sobre la dinámica folicular, la tasa de fertilidad y prolificidad. Y administrados durante 23 días, iniciando el día 3 después de colocado el implante, mejora la respuesta ovulatoria (Herrera, 2003) sin provocar cambios en el peso vivo ni en la tasa de concepción (Cansino-Arroyo et al., 2009).

Mejora genética para prolificidad

Los programas de mejora genética tienen como finalidad provocar, en una población, un cambio genético que sea favorable desde un punto de vista económico y productivo. Las estrategias a seguir para lograr dicho cambio genético son la selección y cruzamiento. La elección de los caracteres fenotípicos que se pretendan mejorar, se basan en el índice de herencia y en el peso económico que estos tengan (Amills, 2010).

La ovulación múltiple en mamíferos es una característica compleja que depende de factores genéticos y ambientales. Muchas razas de ovejas presentan una o dos ovulaciones por ciclo y en la variación de la tasa de ovulación influyen la genética, edad, época del año, nutrición entre otros factores. Existe evidencia de la segregación de un locus con un efecto mayor sobre el tamaño de camada en la raza Merino Booroola, lo cual generó la búsqueda de genes que influyeran sobre la tasa de ovulación en otras razas de ovejas. La raza Merino Booroola presenta un solo locus autosomal denominado Fecundidad Booroola (FecB). El efecto sobre el tamaño de la camada es semidominante porque la pérdida embrionaria causa falla parcial de preñez múltiple. Los efectos fisiológicos del locus FecB se ejercen sobre la tasa de ovulación, el tamaño y número de folículos ovulatorios (Córdoba-Izquierdo et al., 2008).

Los folículos maduros de ovejas portadoras homocigóticas (BB) y heterocigóticas (B+) para el locus FecB, presentan un diámetro significativamente pequeño comparado con las ovejas no portadoras (++), debido a que contienen menor número de células de la granulosa. Pero la producción total de estradiol de ovarios de ovejas BB/B+ y ++ son similares (Godfrey et al., 1999).

El locus Fecundidad Inverdale (FecX^l) fue identificado en una línea prolífica de ovejas Romney que descienden de una oveja con una historia de 33 corderos procedentes de 11 partos. Los estudios de segregación demostraron que el locus se encuentra en el cromosoma X. El efecto de la mutación en hembras portadoras heterocigóticas aumenta la tasa de ovulación alrededor de 1.0 y el tamaño de camada alrededor de 0.6. Las hembras homocigóticas no presentan signos de actividad folicular (Montgomery et al., 2000).

Una práctica muy extendida entre los ganaderos de ovinos es la relacionada con la selección genética para prolificidad. Es común que el criador atribuya un mayor valor genético a un animal, sobre todo a los machos, por el simple hecho de provenir de un parto múltiple. Se piensa que el tipo de parto se hereda y transmite a la descendencia, produciéndose una selección en contra de los animales nacidos en parto simple, aunque sus progenitores tengan buenos parámetros genéticos (Ponz et al., 2006).

La selección realizada en base a las valoraciones genéticas para el carácter prolificidad es más efectiva que la realizada empíricamente por los ganaderos. Dado el bajo índice de herencia de este carácter, cualquier información procedente de la genealogía contribuye a aumentar la precisión de las estimaciones de los valores genéticos de los animales. La selección realizada en base al tipo de parto no toma en cuenta toda la información genealógica y utiliza solamente una observación procedente de la madre, mientras que la selección por parámetros genéticos aprovecha toda la información genealógica y productiva de que se dispone. Sin embargo, los esfuerzos y el trabajo que implica poner en marcha una valoración genética para prolificidad, son notables en comparación con la selección por tipo de parto (Ponz et al., 2006).

Los genes mayores que han demostrado tener efecto sobre el carácter prolificidad están relacionados con la tasa de ovulación. Estos genes mayores codifican para proteínas de pequeño peso molecular que actúan como factores reguladores de la ovulación y del desarrollo ovárico. En el gen BMP15 se han identificado seis variantes génicas ($FecX^I$, $FecX^B$, $FecX^L$, $FecX^G$, $FecX^H$ y $FecX^R$). Todas estas variantes génicas, en heterocigosis aumentan la tasa de ovulación y en homocigosis presentan esterilidad (Davis, 2005).

En un trabajo hecho por Martínez-Royo et al. (2008a), se secuenció el gen BMP15 y descubrieron una nueva variante génica natural no descrita hasta el momento. Esta nueva variante génica presenta una delección (pérdida de

bases nucleotídicas) de 17 pares de bases en el exón 2 del gen BMP15 en la raza Rasa Aragonesa. Aunque en el gen BMP15 se habían detectado cinco polimorfismos, esta nueva variante no había sido descrita, y por lo tanto se trata de un nuevo alelo del gen. Este nuevo alelo lo denominaron alelo Rasa Oviaragón (ROA) del gen BMP15. En el exón 2 se han encontrado polimorfismos específicos para las razas Hanna (variedad de Romney), Inverdale, Lacaune, Galway y Cambridge. Además, en la raza Belclare se han encontrado los polimorfismos descritos en las razas Cambridge y Galway.

Esta variante presenta un codón de parada prematuro en lugar del ácido glutámico en el residuo de aminoácido 239 y 291 de la proteína en estado natural, que resulta en la pérdida de la función biológica de BMP15 (Chu et al., 2007; Martínez-Royo et al., 2008b).

Datos publicados por Martínez-Royo et al. (2008a), mencionan que la presencia del alelo ROA conlleva un incremento de 0.58 corderos por parto con respecto a la media (1.3 corderos por parto) de la raza Rasa Aragonesa.

Las hembras homocigotas para todas las variantes del gen BMP15, tienen un aparato reproductor poco desarrollado, con hipoplasia de los ovarios, que provoca su esterilidad. Sin embargo, las hembras heterocigotas, tienen una prolificidad superior a las hembras que no portan ninguna variante (Galloway et al., 2000; Bodin et al., 2003; McNatty et al., 2007).

Si bien es cierto que la utilización de hembras heterocigotas reporta importantes beneficios para el carácter prolicidad, debe evitarse la frecuencia de las variantes génicas en homocigosis. Ello obliga a proporcionar soporte técnico a los productores, incluida la existencia de un laboratorio que permita confirmar la condición génica de los animales utilizados (Monteagudo et al., 2009).

Las condiciones de heterocigosis, homocigosis y hemicigosis (Macho) deben ser conocidas de tal forma que se controlen las labores que puedan afectar la reproducción de dichos animales. Dicho control debe extenderse al total de la explotación hasta que se tenga la evidencia de la existencia de alguna variante génica del gen BMP15 en alguno de los animales mediante análisis de ADN. De esta forma, se podrán minimizar los posibles efectos no deseados, empezando por evitar la introducción en los lotes de reposición de corderas homocigotas, que serán estériles a lo largo de toda su vida (Laviña et al., 2009).

Las experiencias acumuladas en diferentes razas con las variantes $FecX^H$, $FecX^I$ y $FecX^L$, llevan en todos los casos a prolificidades medias de 2 corderos por parto o incluso por encima de ese valor (Montgomery et al., 2001; Bodin et al., 2007).

Ovejas inmunizadas durante un periodo corto contra el gen BMP15, aumenta la tasa de ovulación sin efecto negativo sobre la fertilización de los

ovocitos liberados, el desarrollo fetal o la capacidad para llevar la gestación a término. Sin embargo la vacunación a largo plazo, puede resultar en la inactividad del crecimiento folicular. Por lo tanto, la regulación de BMP15 es una técnica que se puede aplicar para mejorar la prolificidad de las ovejas (Juengel et al., 2004b).

Técnicas de biología molecular en apoyo a la mejora genética en prolificidad

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es una de las técnicas más utilizadas en el campo de la biología molecular. Esta permite la rápida generación de una gran cantidad de ADN en muy poco tiempo. La principal función atribuible a la PCR, es su capacidad para amplificar una región específica, que al encontrarse en cantidad suficiente, facilita su observación y análisis (Premoli et al., 2004; Clark, 2005).

Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP). Si dos moléculas de ADN relacionadas son cortadas con la misma enzima de restricción y ambas difieren en un nucleótido reconocido o no por esta enzima, la molécula resulta en fragmentos de diferente tamaño para cada individuo, esta diferencia en la longitud de los fragmentos de restricción es lo que se conoce como RFLP (Griffiths, 2002; Clark, 2005). Para visualizar estas diferencias entre individuos se utiliza la electroforesis en geles de poliacrilamida o agarosa.

La electroforesis consiste en la separación de moléculas (proteínas, isoenzimas, ácidos nucleicos) a través de una matriz tamponada (agarosa, acrilamida, almidón). La matriz funciona como un filtro, separando las moléculas en un campo eléctrico, de acuerdo al tamaño y la carga neta que poseen. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato es el responsable por la fuerte carga negativa en condiciones de pH neutro, haciendo que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo) durante la electroforesis (Posso y Ghneim, 2008).

Las técnicas de análisis en biología molecular se encuentran desarrolladas y extendidas, existiendo aplicación de ellas en estudios en razas como la Inverdale, Belclare, Lacaune, Galway, Hanna y Rasa Aragonesa (Montgomery et al., 2001; Davis, 2005; Bodin et al., 2007).

En un estudio hecho por Monteagudo et al. (2009), se encontró mediante electroforesis utilizando PCR, una longitud de 312 pares de bases en el caso de las ovejas tipo silvestre, y de 295 pares de bases en el caso de las ovejas con delección de 17 nucleótidos (Figura 1) del segundo exón del gen BMP15, precisamente los situados entre la posición 525 y 541 en la numeración original de la secuencia AF236078S2, depositada por Galloway et al. (2000).

En condiciones normales, la forma tipo silvestre del exón codifica una secuencia de 245 aminoácidos, que forman una proteína inmadura; de esos 245 aminoácidos, sólo los últimos 125 se conservan en la proteína madura, que

es la que tiene verdadera función biológica. La delección $FecX^R$ modifica totalmente la secuencia codificada por el exón ya que sólo los primeros 45 aminoácidos se corresponden con la forma tipo silvestre y en la posición 100 y 101 aparecen codones de parada, que interrumpen la adición de nuevos aminoácidos. De esta forma, la proteína ni siquiera contiene la región que debería permanecer en la proteína madura, por lo tanto, su inactividad biológica es totalmente segura (Monteagudo et al., 2009).

| | | 525 | | 535 | | 545 |
|----------------|------------|------------|------------|-------|------|-----|
| Macho 1 | GTGGAGCCC- | ----- | ----- | ----- | AACC | |
| Tipo silvestre | GTGGAGCCCT | GGGTCCAGAA | AAGCCCAACC | | | |
| Macho 2 | GTGGAGCCC- | ----- | ----- | ----- | AACC | |

(Monteagudo et al., 2009)

Figura 1 Alineamiento parcial del segundo exón del gen BMP15, mostrando la delección $FecX^R$ en los machos 1 y 2, comparadas con la secuencia tipo silvestre.

Uso de genes candidatos

La variación genética de las características de importancia económica en los animales domésticos, esta generalmente determinada por varios loci (poligenes). Debido a esto, los métodos de selección con base en la hipótesis infinitesimal, la cual supone que la acción individual de cada alelo es muy

pequeña, han dominado la práctica del mejoramiento genético de animales (Linch y Walsh, 1998).

Estos métodos que hacen uso de la teoría estadística usando modelos lineales mixtos, con base en información fenotípica (registros de producción) y genealógica (relaciones de parentesco o pedigrí), en conjunto con una organización y planeación adecuada, han permitido avances genéticos considerables en varias características económicamente importantes en diversas poblaciones de animales (Henderson, 1984).

Respecto de la magnitud de su efecto, es posible reconocer dos tipos de genes que actúan sobre las características productivas en animales:

1. Genes mayores, cuyo efecto de sustitución (aditivo) sobre la expresión fenotípica de una característica es mayor a 0.5 desviaciones estándar fenotípicas y puede ser separado y reconocido mediante un análisis de la estructura de parentesco y la información fenotípica (análisis de segregación) o bien usando información de marcadores moleculares de ADN. Estos genes, en el contexto del uso de marcadores reciben el nombre de loci con efecto en caracteres cuantitativos (QTL) de *quantitative trait loci*. Los genes mayores causan grandes diferencias entre animales con diferentes genotipos para caracteres cuantitativos.

2. Poligenes, que son genes con efectos más pequeños, cuyo efecto individual es impráctico de detectar en forma individual (Montaldo y Kinghorn, 2000).

Un QTL (*Quantitative Trait Locus*) es una región dentro del genoma que codifica para uno o más genes con efecto significativo sobre un carácter cuantitativo. Gran parte de la variabilidad fenotípica de estos caracteres puede estar causada por unos pocos genes con efecto importante, mientras que el resto de la variabilidad es debida a varios genes con efecto pequeño. Cabe destacar que la mayoría de caracteres de interés económico en especies domesticas son de tipo cuantitativo (por ejemplo: crecimiento, peso, calidad de la carne, calidad de la canal, composición de ácidos grasos, entre otros). Por lo tanto, la detección de QTL para la posterior determinación de los factores causales ha sido el objetivo principal en numerosos proyectos (Mercadé, 2006).

Aunque aparecieron algunos trabajos en los que se identificaron QTL, no fue hasta principios de los años 90 cuando aumentaron los estudios de detección de QTL en diferentes especies. Esto es debido en gran parte a los avances en las técnicas moleculares, por ejemplo la PCR por sus múltiples aplicaciones (Saiki et al., 1985).

Un ejemplo del uso de un loci con efecto en caracteres cuantitativos (QTL) en la selección animal, es el caso del programa francés de mejoramiento genético de cabras productoras de leche. En este caso, se trata de un polimorfismo de una serie de 11 alelos de la serie $\alpha 1$ de la caseína ($\alpha 1$ -cas). Estos alelos, se han clasificado en fuertes, intermedios y débiles en cuanto a su efecto en la síntesis de caseína en la leche. Esto tiene un impacto en la

cantidad de proteína, de modo que los alelos fuertes superan a los débiles en cuanto al contenido de proteína y grasa de la leche (Manfredi et al., 2000).

Los marcadores moleculares son regiones distribuidas a lo largo del genoma que generalmente, presentan polimorfismos. El genotipo de los marcadores debe poder ser identificado fácilmente y permiten identificar un organismo, especie o carácter fenotípico asociado al mismo. A pesar que se han descrito diferentes tipos de marcadores, los más utilizados en la actualidad son los que permiten realizar genotipados masivos de forma fiable y económica, como serían los microsatélites o los SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Sin embargo, existen otros marcadores como los AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). La importancia de los marcadores moleculares se centra en que su utilización es fundamental para la construcción de mapas genómicos, la detección de *Quantitative Trait Loci* (QTL) y para la realización de estudios de asociación con caracteres fenotípicos de interés (Mercadé, 2006).

En cuanto a los genes candidatos, se buscan genes relacionados con la fisiología del carácter sin conocer su localización cromosómica. Tampoco es necesaria la detección previa de QTL. Los genes que puedan estar relacionados con el fenotipo de interés y de los que se conozca su secuencia nucleotídica en la especie de interés o en otras especies se seleccionan, se buscan polimorfismos para finalmente realizar estudios de asociación con diferentes caracteres para comprobar su efecto (Mercadé, 2006).

La Proteína Morfogénica Ósea (BMP15) es uno de los 35 miembros de la superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante β (TGF β), deriva del ovocito y es requerido para el crecimiento folicular (McNatty et al., 2003; Juengel et al., 2004a; Moore et al., 2004).

En un estudio, Moore et al. (2004), analizaron los ovarios de ovejas heterocigotas para las variantes del gen BMP15 para compararlos con ovarios de ovejas tipo silvestre, y observaron que los cuerpos lúteos de las ovejas heterocigotas eran más pequeños que los de las ovejas tipo silvestre. La interpretación a esto es que, el incremento de la tasa de ovulación se debe al desarrollo precoz de los folículos dominantes y les confieren la habilidad de ovular a menor tamaño.

Proteína morfogénica ósea (BMP15)

Naturaleza bioquímica: El gen BMP15 consta de una secuencia de 1179 nucleótidos de longitud, contiene dos exones separados por un intrón de alrededor de 5.4 kilobases (kb) y codifica para una preproteína de 393 residuos de aminoácidos. El polipéptido maduro activo tiene 125 aminoácidos de largo (Galloway et al., 2002).

Localización: El gen BMP15 se sitúa en la región no recombinante del cromosoma X, por lo que está ligado al sexo. Los machos (XY) sólo pueden portar una copia del gen, por lo que se denominan hemicigotos, y las hembras

(XX) pueden portar cualquier variante del gen BMP15 en homocigosis o en heterocigosis. Se han descrito seis variantes de este gen (Cuadro 2) que intervienen en la prolificidad, las cuales originan sustituciones de aminoácidos (caso de FecX^I, FecX^B y FecX^L), o codones de parada prematuros (caso de FecX^G, FecX^H y FecX^R). Todas las variantes de este tipo han recibido denominación (acrónimos) que comienzan con las siglas FecX, por modificar la fecundidad y por situarse en el cromosoma X. La última letra, con formato de superíndice, corresponde a la inicial de la raza en la que se hallaron: Inverdale, Belclare, Lacaune, Galway, Hanna y Rasa Aragonesa. En todos los casos, los efectos sobre la prolificidad de las ovejas dependen de la condición génica, mientras que la tasa de ovulación se incrementa en las hembras heterocigotas, las hembras homocigotas presentan fallo ovárico primario que origina esterilidad (Cuadro 3) Montgomery et al., 2001; Moore et al., 2004; Davis, 2005.

Es importante señalar que no existen diferencias en los niveles circulantes de FSH entre las ovejas de tipo silvestre y las ovejas portadoras heterocigotas para el gen BMP15 (Moore, 2004).

Función: El gen BMP15 es esencial para el crecimiento folicular normal (figura 2) y regula la proliferación de células de la granulosa y la diferenciación, promoviendo la mitosis (figura 3) en ellas y suprimiendo la expresión de receptores para la hormona folículo estimulante (FSH) Juengel et al., 2002; Otsuka y Shimasaki, 2002ab; Moore y Shimasaki, 2005.

Cuadro 2. Razas de ovinos portadoras mutantes del gen BMP15

| Raza | Cromosoma | Nombre | Gen | Autor |
|----------------|-----------|-------------------|-------|----------------------------|
| Inverdale | X | FecX ^I | BMP15 | Davis et al., 1991 |
| Hanna | X | FecX ^H | BMP15 | Davis et al., 2001 |
| Belclare | X | FecX ^B | BMP15 | Hanrahan, 1991 |
| Cambridge | X | FecX ^G | BMP15 | Hanrahan y Owen, 1985 |
| Lacaune | X | FecX ^L | BMP15 | Bodin et al., 1993 |
| Rasa Aragonesa | X | FecX ^R | BMP15 | Martínez-Royo et al., 2008 |

(Bodin, 2006)

Cuadro 3. Efecto del gen BMP15 sobre la ovulación

| Población | Gen | Aumento de ovulación en heterocigotas | Aumento de ovulación en homocigotas |
|-------------------------|-------------------|--|--|
| Belclare y Cambridge | FecG | 1.39 | Esterilidad |
| Inverdale | FecX ^I | 1.00 | Esterilidad |
| Hanna | FecX ^H | | Esterilidad |
| Belclare | FecX ^B | .97 | Esterilidad |
| Belclare y Cambridge | FecX ^G | .70 | Esterilidad |
| Lacaune | FecX ^L | 1.60 | Esterilidad |
| Rasa Aragonesa | FecX ^R | .58 | Esterilidad |

(Bodin, 2006)

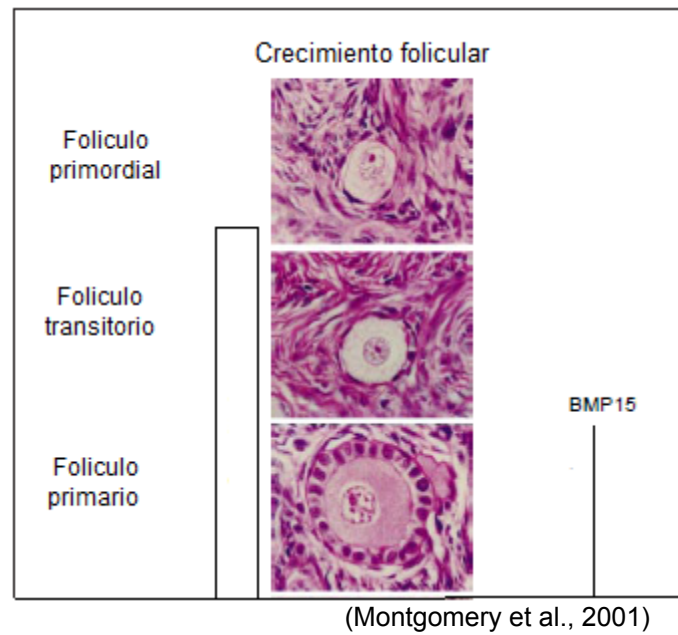
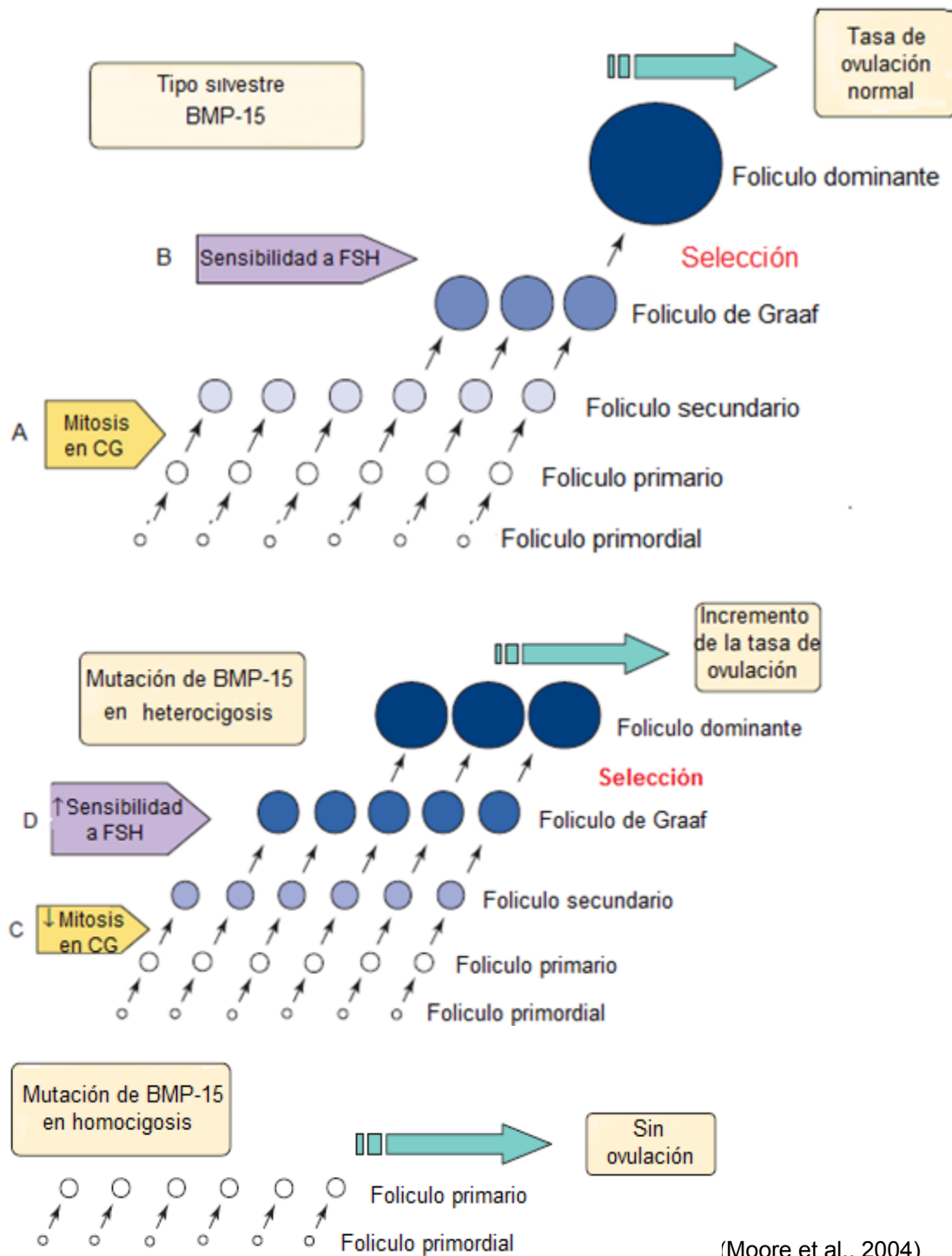


Figura 2. Momento en el que actúa durante el crecimiento folicular el gen BMP15.



(Moore et al., 2004)

Figura 3. Representación esquemática del progreso de foliculogénesis en ovejas tipo silvestre (arriba), portadoras de la mutación de BMP15 en heterocigosis (centro) y portadoras de la mutación de BMP15 en homocigosis (abajo).

Asociación con prolificidad: El gen BMP15 interviene en la regulación de las funciones de las células de la capa granulosa ovárica, por lo que todas las variantes de este gen causan alteraciones en el crecimiento folicular que originan superovulación que repercute en aumento de la prolificidad en ovejas heterocigotas y esterilidad en ovejas homocigotas (McNatty et al., 2005).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de la Unidad Académica de Agricultura de la Universidad Autónoma de Nayarit.

Animales

En este trabajo se incluyeron un total de 335 borregas, 234 de la raza Pelibuey y 101 de la raza Dorper provenientes de explotaciones ubicadas en los municipios de Compostela, Ahuacatlán, Ixtlán del Río, Santiago Ixcuintla, Rosamorada Nayarit y Tepatitlán Jalisco. Las explotaciones fueron manejadas bajo un sistema semiextensivo; los animales se suplementaron en corral dos veces al día con rastrojo de maíz, sorgo, alfalfa y contaban con mezcla de minerales a libre acceso, y por la mañana salían a pastar en pradera con pasto insurgente (*Brachiaria brizantha*) para regresar por la tarde al corral. No se utilizaron tratamientos hormonales para mejorar sus parámetros reproductivos.

El clima es cálido subhúmedo con temperatura media anual de 25 °C, tiene temperaturas mínimas de 10 °C en enero y máximas de 35 °C en mayo y junio con lluvias de mayo a septiembre y precipitación media anual de 1100 mm. Altura de 0 hasta 2760 metros sobre el nivel del mar (INEGI, 2011).

Identificación de hembras de acuerdo a su prolificidad

Las hembras se agruparon de acuerdo a sus registros de prolificidad en alta (≥ 3 corderos), media (>1.5 y <3 corderos) y baja (≤ 1.5 corderos). No se consideró el número de parto.

Para el trabajo de laboratorio, a cada borrega se le introdujo una aguja en la vena yugular para recolectar por goteo (para disminuir riesgo de hemolisis) tres mililitros de sangre en tubos con el anticoagulante Ácido Etilén Diamino Tetraacético (EDTA). Las muestras se introdujeron en un recipiente con hielo para posteriormente ser transportadas al laboratorio donde, de cada muestra se llenaron tres tubos eppendorf de un mililitro y se guardaron a -20 °C para su posterior análisis.

Genotipificación molecular

Extracción y Purificación de ADN: La extracción y Purificación de ADN a partir de sangre se realizó mediante la técnica salina publicada por Sambrook y Russel en el 2001.

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) punto final: Se adquirieron los primers: Forward (5'-CTCTGAGACCAAACCGGGTA-3') y Reverse (5'-CATGCCACCAGAACTCAAGA-3') según Monteagudo et al. (2009).

Para amplificar el alelo FecX^R del gen BMP15 se elaboró un coctel que contenía para una reacción; 13.85 μ l de agua bidestilada, 2.5 μ l de Buffer (10 X), 0.75 μ l de Cloruro de Magnesio (MgCl₂) (50 mM = 1.5 mM/ μ l), 2.5 μ l de

Dinucleótidos de trifosfatos (DNTPs)(2 mM), 1 μ l de Primer (50 pgr), 0.4 μ l de Taq Polimerasa (5 U.I.). Al coctel, que contenía 21 μ l totales, se le añadieron 4 μ l (50 ng/ μ l) de muestra de ADN, se mezcló con vortex y se introdujo al termociclador para correr el programa: un ciclo de 5 minutos a 95 °C; 35 ciclos de 45 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, 1 minuto a 73 °C con una extensión final de 5 minutos a 73 °C. Se verificó el resultado del PCR en gel de agarosa al 4% con tinción de bromuro de etidio.

Electroforesis: Para verificar los genotipos FecX^R, se mezclaron 6 μ l del producto del PCR y 2 μ l de azul de bromurofenol y se aplicó en gel de poliacrilamida al 6% con tinción de bromuro de etidio a 98 voltios por cuatro horas. Los geles se visualizaron en cámara UV empleando el programa EDAS de Kodak. El producto esperado tenía una longitud de 312 pares de bases (pb) en el caso del alelo normal, y de 295 en el caso del alelo con delección (Monteagudo et al., 2009)

Análisis estadístico

a) Con la información de prolificidad de las hembras se calcularon las frecuencias por raza y grupo y se compararon empleando la prueba de independencia de chi cuadrada.

b) Con los genotipos de acuerdo a las razas y grupos se calcularon las frecuencias y se compararon con una prueba de independencia de chi cuadrada.

c) En ambas razas se relacionaron los genotipos con el número de corderos nacidos por parto por medio de un análisis de varianza para comparar los genotipos de acuerdo a un modelo de un efecto fijo $Y = \mu + \text{Genotipo} + e$ en ambas razas.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Identificación de hembras prolíficas

De acuerdo al agrupamiento por raza considerando prolificidad, en la raza Dorper se observó un mayor porcentaje de animales con alta prolificidad respecto a la raza Pelibuey ($P < 0.01$), como se observa en el Cuadro 4. En la raza Pelibuey el porcentaje mayor de ovejas se concentra en prolificidad media.

La raza Dorper presentó un promedio de 2.1 y la raza Pelibuey de 1.6 corderos por parto. La raza Rasa Aragonesa, al igual que las razas Pelibuey y Dorper, no es una raza prolífica, usualmente tiene una media de 1.2 a 1.5 corderos por parto (Sierra, 1992).

En un estudio realizado por Laviña et al. (2009), se secuenció el gen BMP15 en un grupo selecto de ovejas que habían demostrado elevada prolificidad de acuerdo a los registros de la base de datos de ANGRA. Este gen candidato ya había demostrado su interés en razas extranjeras. Los animales se escogieron por su elevada prolificidad, por la repetibilidad en los registros, por la alta prolificidad entre sus hijas y por la evidencia de clara segregación en el carácter entre su descendencia, compatible con el efecto de un posible gen mayor.

Cuadro 4. Número de hembras y porcentajes considerando el número de corderos nacidos por parto

| Raza | Baja (≤ 1.5) | Media (> 1.5 y < 3) | Alta (≥ 3) | Total |
|----------|------------------------|------------------------------|----------------------|-------------|
| Pelibuey | 49 20.94 | 158 67.52 | 27 11.54 | 234 100% |
| Dorper | 29 28.71 | 37 36.63 | 35 34.65 | 101 100% |

P<0.01, Chi cuadrada.

Genotipificación molecular

Los resultados en cuanto a las frecuencias genotípicas en ambas razas muestran un porcentaje menor de hembras heterocigotas (AB) respecto a las hembras homocigotas normales (AA) o tipo silvestre. Respecto a las hembras heterocigotas de ambas razas (Figura 4), se observó un porcentaje mayor en la raza Dorper (Cuadro 5). Sin haber diferencia estadística entre razas ($P > 0.05$).

La identificación del alelo $FecX^R$ en razas de pelo, coincide con los resultados expuestos por Monteagudo et al. (2009), quienes presentaron una nueva mutación en el segundo exón del gen BMP15 en la raza de lana Rasa Aragonesa que consiste en una pérdida de 17 pb resultando en un desplazamiento del marco de lectura y en un codón de parada prematuro.

Siguiendo con la nomenclatura previa de las mutaciones del gen BMP15, a esta nueva variante la nombraron $FecX^R$ (Martínez-Royo et al., 2008b). Esta nueva variante se comporta de igual forma a las cinco mutaciones antes descritas en este gen. En heterocigosis aumenta la prolificidad y en homocigosis hay esterilidad completa (Davis et al., 2001; Hanrahan et al., 2004; Martínez-Royo et al., 2008b).

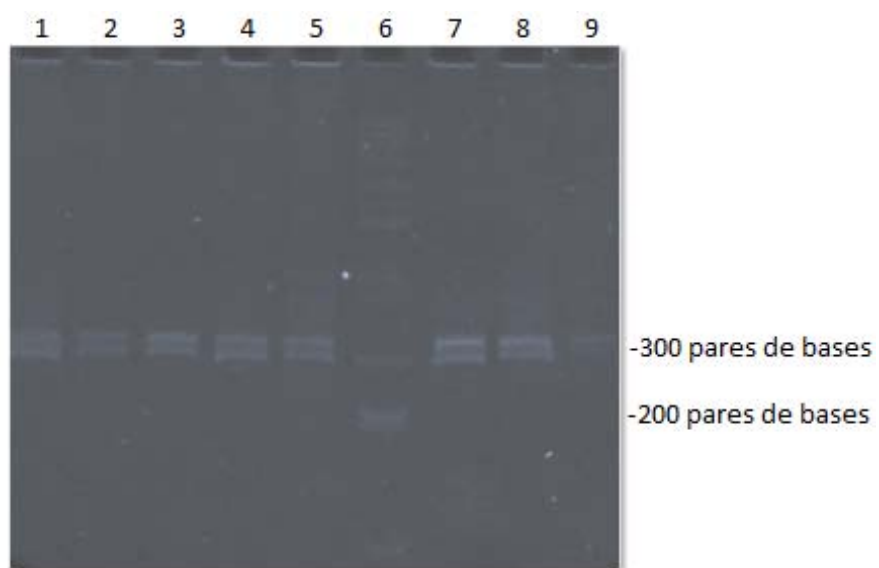


Figura 4. PCR del precursor de BMP15. Columna 9: oveja tipo silvestre, con banda de 312 pb. Columnas 1,2,3,4,5,7 y 8: ovejas heterocigotas $FecX^R$ /tipo silvestre (bandas de 312 pb y de 295 pb). Columna 6: Marcador de Peso Molecular.

Cuadro 5. Distribución de frecuencias genotípicas para el alelo FecX^R del gen BMP15 en ambas razas

| Raza | AA | AB | Total |
|----------|--------------|-----------|-------------|
| Pelibuey | 228 97.44 | 6 2.56 | 234 100% |
| Dorper | 96 95.05 | 5 4.95 | 101 100% |

P>0.05, Chi cuadrada.

Relación de genotipos

No se observaron diferencias ($P>0.05$) para la interacción genotipo x raza, así como entre razas ($P>0.05$). El genotipo AB se relaciona con las hembras que presentan alta prolificidad (Cuadro 6). Hay diferencia estadística entre genotipos ($P<0.01$).

Los resultados en las razas ovinas Pelibuey y Dorper, coinciden con los publicados por Laviña et al. (2009), quienes al analizar 3 explotaciones, detectaron diferencias altamente significativas ($P<0.01$) en cuanto a la distribución de partos entre mutantes y salvajes, con una mayor frecuencia de partos triples o más en el caso de las mutantes. Además, Martínez-Royo et al. (2008b), encontraron diferencias altamente significativas ($P<0.01$) entre ovejas con altos valores de prolificidad y ovejas con valores de prolificidad baja. También obtuvieron diferencias altamente significativas ($P<0.01$) entre genotipos tipo silvestre y heterocigotos para la mutación $FecX^R$ del gen BMP15. Además, encontraron asociación entre ovejas con alta prolificidad y genotipo heterocigoto para la mutación $FecX^R$ del gen BMP15.

Al comparar los genotipos de la población, hay diferencia ($P<0.01$) entre AA y AB, con mayor prolificidad en AB (Cuadro 7). El genotipo AB en la raza Pelibuey tiene una media de 3.00 y en Dorper de 3.20 corderos por parto. La diferencia entre el alelo AA y AB en ambas razas es de +1.15 corderos por parto.

Cuadro 6. Identificación del genotipo AB del alelo FecX^R del gen BMP15 en base a su prolificidad de ambas razas juntas

| Prolificidad | AA | AB | Total |
|--------------|-------------|-------------|-------------|
| Alta | 51 82.26 | 11 17.74 | 62 100% |
| Media | 195 100 | 0 0 | 195 100% |
| Baja | 78 100 | 0 0 | 78 100% |

P<0.01, Chi cuadrada.

Cuadro 7. Promedios de prolificidad para cada genotipo

| AA | AB | EE |
|------|------|------|
| 1.94 | 3.09 | 0.09 |

***P<0.01

Los resultados no coinciden con los publicados por Vacca et al. (2010), quienes analizaron la estructura genética de los genes *BMPR1B*, *BMP15* y *GEF9* en cinco razas de ovejas criadas en Túnez. El genotipado reveló que las mutaciones investigadas en estos tres genes estaban ausentes en las cinco razas analizadas.

CONCLUSIONES

La raza Dorper presentó mayor porcentaje de prolificidad que la raza Pelibuey.

Se observó mayor porcentaje de hembras heterocigotas en la raza Dorper.

En ambas razas el genotipo AB se relaciona con las hembras que presentan alta prolificidad.

El haber encontrado hembras heterocigotas para el alelo $FecX^R$ del gen BMP15 en ovejas de pelo es importante considerando que hasta ahora en dicho gen se han encontrado seis variantes génicas, todas en razas de lana.

LITERATURA CITADA

- Alderton, K.W., E.C. Cooper, and G.R. Knowles. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357:593-615.
- Amills, M. 2010. Mejora genética en ovino y caprino. *Producción ovina y caprina.*
- Berhanu, B. and H. Aynalem. 2009. Reproductive performance of traditionally managed sheep in the south western part of Ethiopia. *Livestock Research for Rural Development.* 23:1.
- Bister, J.L., B. Noël, B. Parrad, S.N. Mandiki, J. Mbayahaga and R. Paquay. 1999. Control of ovarian follicles activity in the ewe. *Animal endocrinology.* 17:315-328.
- Bodensteiner, K.J., C.M. Clay, C.L. Moeller and H.R. Sawyer. 1999. Molecular cloning of the ovine Growth/Differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biology of Reproduction.* 60:381-386
- Bodin, L. 2006. Genes mayores en ganado ovino, implicaciones en la reproducción. INRA, Toulouse, France. 3:38-44.
- Bodin, L., E. Di Pasquale, S. Fabre, M. Bontoux, P. Monget, L. Persani and P. Mulsant. 2007. A novel mutation in the Bone Morphogenetic Protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. *Endocrinology.* 148:393-400.
- Bodin, L., F. Lecerf, C. Pisselet, M.S. Cristhal, M. Bibe and P. Mulsant. 2003. How many mutations are associated with increased ovulation rate and litter size in progeny of Lacaune meat sheep? Workshop on Major Genes and QTL in Sheep and Goats. INRA, Toulouse, France. 2-11.
- Bradford, G.E. 2002. Selection for reproductive efficiency. *Sheep and Goat Research Journal.* 17:6-10.
- Brash, L.D., N. Fogarty and A.R. Gilmour. 1994. Reproductive performance and genetic parameters for Australian Dorset sheep. *Australian Journal of Agricultural Research.* 45:427-441.
- Bulbarela-García, G., A. Pro-Martínez, C.M. Becerril-Pérez, P. Díaz-Rivera, A. Rosendo-Ponce y J. Gallegos-Sánchez. 2009. Efecto de L-arginina y aceite de pescado en el comportamiento reproductivo de ovejas de pelo sincronizadas con un progestágeno. *Agrociencia* 43(4):371-377.
- Campos, M.G., G.G. Sánchez, C.B. Pliego y G.H. Castro. 2000. Comparación de la productividad de ovejas de las tres variedades de color del ovino Pelibuey.

- Memoria del 1er. Taller Sobre Ovinos de Pelo del Golfo y Noreste de México: "Hacia un Programa Nacional de Mejoramiento Ovino"; Octubre 4-7; Cd. Victoria, Tamps., Universidad Autónoma de Tamaulipas. 367-372.
- Cansino-Arroyo, G., J. Herrera-Camacho y J.R. Aké-López. 2009. Tasas de concepción, fertilidad y prolificidad en ovejas de pelo alimentadas con dietas enriquecidas con ácidos grasos poliinsaturados. *Universidad y Ciencia*. 25(1):181-185.
- Chu, M.X., Z.H. Liu, C.L. Jiao, Y.Q. He, L. Fang, S.C. Ye, G.H. Chen and J.Y. Wang 2007. Mutations in BMPR-IB and BMP-15 genes are associated with litter size in Small Tailed Han sheep (*Ovis aries*). *Journal of Animal Sciences*. 85:598-603.
- Clark, D. 2005. *Molecular Biology*. London: Elsevier Academia Press.
- Clarke, J.N. 1972. Current levels of performance in the Ruakura fertility flock of Romney sheep. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. 32:99-111.
- Córdoba-Izquierdo, A., M.S. Córdoba-Jiménez, C.A. Córdoba-Jiménez y J.E. Guerra-Liera. 2008. Procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras. *Rev. vet.* 19:67-79.
- Cortéz, Z.J., C.H. Losada, M.J. Rivera, Q.L. Zarco y H.A. Ortiz. 2006. Prolificidad y comportamiento reproductivo de borregas Pelibuey paridas en diferentes épocas del año. Memoria del V Seminario de Producción de Ovinos en el Trópico. Universidad de Juárez Autónoma de Tabasco. 99-100.
- Davis, G.H. 2004. Fecundity genes in sheep. *Animal Reproduction Science*. 82-83:247-253.
- Davis, G.H. 2005. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics Selection Evolution*. 37:11-23.
- Davis, G.H., K.G. Dodds and G.D. Bruce. 2001. Ovulation rate and litter size of prolific Inverdale (FecXI) and Hanna (FecXH) sheep. *Proc. Assoc. Adv. Anim. Breed. Genet.* 14:175-178.
- Dhandapani, K.M. and D.W. Brann. 2000. The role of glutamate and nitric oxide in the reproductive neuroendocrine system. *Cell Biol.* 78:165-79.
- Dickerson, G.E. 1996. Economic importance of prolificacy in sheep. In: M.H. Fahmy, editors. *Prolific Sheep*. Tucson (AZ) USA:CAB International, 205-213.
- Dickson, L., G. Torres, R. D'Aubeterre y O. García. 2004. Factores que influyen en el intervalo entre partos y la prolificidad de un hato de carneros Pelibuey en Venezuela. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 38(1):13-17.

- Ebozoje, M.O. and C.O.N. Ikeobi. 1998. Colour variation and reproduction in the West African Dwarf (WAD) goats. *Small Ruminant Research*. 27:125-130.
- Foote, W.C. and D.H. Mathews. 1983. The relationship of body weight and size to reproduction and production performance. *Proceedings of the North Central Region Report (NC-111) Technical Comitee. Increasing Efficiency of Sheep Production. U.S.A.* p. 131.
- Galina, M.A., R. Morales, E. Silva and B. López. 1996. Reproductive performance of Pelibuey and Blackbelly sheep under tropical management system in México. *Small Ruminant Resarch*. 22:31-37.
- Galloway, S.M., K.P. McNatty, L.M. Cambridge, M.P.E. Laitinen, J.L. Juengel, T.S. Jokiranta, R.J. McLaren, K. Luiro, K.G. Dodds, G.W. Montgomery, A.E. Beattie, G.H. Davis and O. Ritvos. 2000. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics*. 25:279-283.
- Galloway, S.M., S.M. Gregan, T. Wilson, K.P. McNatty, J.L. Juengel, O. Ritvos and G.H. Davis. 2002. Bmp15 mutations and ovarian function. *Molecular and cellular Endocrinology*. 191:15-18.
- García, G., J.M. León, J.P. Tejero, R. Zamora, J.V. Delgado y J. Quiroz. 2004. Influencia de los efectos ambientales sobre la prolificidad en el ovino segureño. *Federación Española de Asociaciones de Ganado Selecto (FEAGAS)*. 25:105-107.
- Germán, A.C.G. 2002. Influencia de la condición corporal y la alimentación en el comportamiento reproductivo de las ovejas de pelo. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Edo de México. 1-70.
- Godfrey, R.W., J.R. Collins, E.L. Hensley and J.E. Wheaton. 1999. Estrus synchronization and artificial insemination of hair sheep ewes in the tropics. *Theriogenology*. 51:985-997.
- González, G.R., H.G. Torres, P.C.M. Becerril y R.P. Díaz. 2001. Relación del color del pelaje y factores ambientales con características reproductivas en ovejas tropicales. *Agrociencia*. 35:41-50.
- González, R.A., M.J. Valencia, W.C. Foote and B.D. Murphy. 1991. Hair sheep in México: reproduction in the Pelibuey sheep. *Animal Breeding Abstracts*. 59:509-524.
- González, S.C. 1993. Comportamiento reproductivo de ovejas y cabras tropicales. *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias LUZ*. 3:173-196.

- Griffiths, A.J., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin y W.M. Gelbart. 2002. *Genética*. 7ed. (A. Laborda, Ed., y M. Elias, Trans.) Madrid: McGraw-Hill.
- Guevara, G.A., A. Piñeiro, R. Cardoso, P. Sánchez y C.V. Zayas. 1986. Comparación entre las razas Suffolk, Barriguinegra y tres variedades de Pelibuey en varios caracteres. *Revista Cubana de Producción Animal*. 2:173-176.
- Hanrahan, J.P., S.M. Gregan, P. Mulsant, M. Mullen, G.H. Davis, R. Powell and S.M. Galloway. 2004. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both, increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*. 70:900-909.
- Henderson, C.R. 1984. *Applications of linear models in animal breeding*. University of Guelph, Ontario.
- Herrera, C.J. 2003. Efecto de la adición de ácidos grasos poliinsaturados sobre la dinámica folicular, tasa de gestación y respuesta ovárica en ovejas Pelibuey. *Tropical and subtropical agroecosystems*. 2(2):101-104.
- Juengel, J.L., K.J. Bodensteiner, D.A. Heath, N.L. Hudson, C.L. Moeller, P. Smith, S.M. Galloway, G.H. Davis, H.R. Sawyer and K.P. McNatty. 2004a. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. *Animal Reproduction Science*. 82-83:447-460.
- Juengel, J.L., N.L. Hudson, D.A. Heath, P. Smith, K.L. Reader, S.B. Lawrence, A.R. O'Connell, M.P.E. Laitinen, M. Cranfield, N.P. Groome, O. Ritvos and K.P. McNatty. 2002. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biology of Reproduction*. 67:1777-1789.
- Juengel, J.L., N.L. Hudson, L. Whiting and K.P. McNatty. 2004b. Effects of immunization against Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 on ovulation rate, fertilization, and pregnancy in ewes. *Biology of Reproduction*. 70:557-561.
- Laitinen, M., K. Vuojolainen, R. Jaatinen, I. Ketola, J. Aaltonen, E. Lehtonen, M. Heikinheimo and O. Ritvos. 1998. A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mech. Dev.* 78:135-140.
- Laviña, A., A. Macías, E. Martín, P. Arellano, S. Murillo, R. Ponz, L.V. Monteagudo, M.T. Tejedor e I. Sierra. 2009. Análisis de la distribución de partos de ovejas portadoras del alelo Fex^R del gen BMP15. Asociación Internacional para el Desarrollo Agrario. 39 Jornada de estudio. XIII Jornadas sobre Producción Animal (AIDA). Zaragoza, España.

- Linch, M. y B. Walsh. 1998. Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer, Massachussets.
- Macedo, R. and J.D. Hummel. 2006. Influence of parity on productive performance of Pelibuey ewes under intensive management in the Mexican dry tropics. *Livestock Research for Rural Development*. 18(6).
- Macedo, R. y A. Alvarado. 2005. Efecto de la época de monta sobre la productividad de ovejas pelibuey bajo dos sistemas de alimentación en colima, México. *Arch. Zootec.* 54:51-62.
- Macedo, R. y V. Arredondo. 2008. Efecto del sexo, tipo de nacimiento y lactancia sobre el crecimiento de ovinos Pelibuey en manejo intensivo. *Archivos de Zootecnia*. 218:219-228.
- Macedo, R. y Y. Castellanos. 2004. Rentabilidad de un sistema intensivo de producción ovino en el trópico. *Avances de investigación agropecuaria*. 8(3):1-9.
- Manfredi, E., J.M. Serradilla, C. Leroux, P. Martin y A. Sánchez. 2000. Genetics for milk production. En: *Proc. Of the 6th World Congress on Genetics Applied to livestock Production*, Armidale, NSW. Vol. 27:335-338.
- Martínez, R.R.D. 1999. Patrones reproductivos de la oveja Pelibuey en el trópico Mexicano. *Agrociencia*. 33:75-80.
- Martínez-Royo, A., J.J. Jurado, J.P. Smulders, J.I. Martí, J.L. Alabart, A. Roche, E. Fantova, E. Vigil, E. Sevilla, L. Quintin, L. Bodin, P. Mulsant, M. Serrano, J. Folch y J.H. Calvo. 2008a. Nueva variante génica del gen BMP15 que influye en la prolificidad de la Rasa Aragonesa. *Albéitar*. 112:8-10.
- Martínez-Royo, A., J.J. Jurado, J.P. Smulders, J.I. Martí, J.L. Alabart, A. Roche, E. Fantova, L. Bodin, P. Mulsant, M. Serrano, J. Folch and J.H. Calvo. 2008b. A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. *Animal Genetics*. 39:294-297.
- McGrath, S.A., A.F Esquela and S.J. Lee. 1995. Oocyte-specific expression of growth differentiation factor-9. *Molecular Endocrinology*. 9:131-136.
- McNatty, K. P., N.L. Hudson, L. Whiting, K.L. Reader, S. Lun, A. Western, D.A. Heath, P. Smith, L.G. Moore and J.L. Juengel. 2007. The effects of immunizing sheep with different BMP15 or GDF9 peptide sequences on ovarian follicular activity and ovulation rate. *Biology of Reproduction*. 76:552-560.
- Mcnatty, K.P., J.L. Juengel, K.L. Reader, S. Lun, S. Myllymaa, S.B. Lawrence, A. Western, M.F. Meerasahib, D.G. Mottershead, N.P. Groome, O. Ritvos and M.P.E. Laitinen. 2005. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation

- factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function. *Reproduction*. 129:473-480.
- McNatty, K.P., J.L. Juengel, T. Wilson, S.M. Galloway, G.H. Davis, N.L. Hudson, C.L. Moeller, M. Cranfield, K.L. Reader, M.P.E. Laitinen, N.P. Groome, H.R. Sawyer and O. Ritvos. 2003. Oocyte-derived growth factors and ovulation rate in sheep. *Reproduction*. 61:339-351.
- Mejía, C.E., M. Rosales, J.E. Vargas and Murgueitio. 2009. Intensive production from African hair sheep fed sugar cane tops, multinutritional blocks and tree foliage. *Livestock Research for Rural Development*. 3:1
- Mercadé, A. 2006. Mapeo fino de QTL y análisis de genes candidatos relacionados con el metabolismo lipídico en un cruce de Ibérico x Landrace. Tesis doctoral.
- Michels, H., E. Decuypere and O. Onagbesan. 2000. Litter size, ovulation rate and prenatal survival in relation to ewe body weight: Genetics review. *Small Rumin.* 38:199-209.
- Montaldo, H.H. y B.P. Kinghorn. 2000. Detección y uso de genes mayores en animales. *Acta Universitaria*. 10:9-17.
- Monteagudo, L.V., R. Ponz, M.T. Tejedor, A. Laviña and I. Sierra. 2009. A 17 bp deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed. *Animal Reproduction Science*. 110:139-146.
- Montgomery, G.W., S.M. Galloway, G.H. Davis and K.P. McNatty. 2000. Genes controlling ovulation rate in sheep. Review. *Reproduction*. 121:843-852.
- Montgomery, G.W., S.M. Galloway, G.H. Davis and K.P. McNatty. 2001. Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction*. 121:843-852.
- Moore, R.K. and S. Shimasaki. 2005. Molecular biology and physiological role of the oocyte factor BMP-15. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 234:67-73.
- Moore, R.K., G.F. Erickson and S. Shimasaki. 2004. Are BMP-15 and GDF-9 primary determinants of ovulation quota in mammals? *Endocrinology and metabolism*. 15:356-361.
- Mullen, M., J.P. Hanrahan, S.M. Galloway and R. Powell. 2003. Source of mutations with large effect on ovulation rate in Belclare sheep. Proceedings of the Irish Agricultural Research Forum, Tullamore, Offaly, Ireland. 3rd and 4th March. Page 84.

- Otsuka, F. and S. Shimasaki. 2002a. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: Its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:8060-8065.
- Otsuka, F. and S. Shimasaki. 2002b. A novel function of bone morphogenetic protein-15 in the pituitary: selective synthesis and secretion of FSH by gonadotropes. *Endocrinology.* 143:4938-4941.
- Pardos, C.L., M.T. Maza y E. Fantova. 2007. Influencia de la prolificidad en explotaciones ovinas de carne de raza Rasa Oviaragón. *Arch. Zootec.* 56:363-366.
- Pérez, C.R., C. Vázquez, F.C. Sosa, M. Valencia y P.E. González. 2005. Factores que influyen en la prolificidad en ovinos Pelibuey y Blackbelly. Memoria: XIX Reunión ALPA. Tampico, México.
- Pérez-Enciso, M. and J.P. Bidanel. 1997. Selection for litter size components: a critical review. *Genetics Selection Evolution.* 29:483-496.
- Ponz, R., G. Yagüe y J. Altarriba. 2006. ¿Reposición por parto doble o mediante evaluación genética? Sitio argentino de producción animal. SEOC. Zamora Genética. 4:166-166.
- Posso, D.D. y T.H. Ghneim. 2008. Uso de marcadores microsatélites para la estimación de diversidad genética en plantas. Ediciones IVIC.
- Premoli, G., A. Gonzales, B. Millan, T. Percoco y A. Vielma. 2004. Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev. Cubana Med Trop.* 56:85-90.
- Rajab, M.H., T.C. Cartwright, P.F. Dahm and E.A.P. Figueiredo. 1992. Performance of three tropical hair sheep breeds. *Journal of Animal Science.* 70:3351-3359.
- Rastogi, R.K. 2001. Production performance of Barbados Blackbelly sheep in Tobago, West Indies. *Small Ruminant Research.* 41:171-175.
- Rojas, R.O y R.O.L. Rodríguez. 1995. Factores que modifican la prolificidad en ovejas Blackbelly en clima tropical. *Técnica Pecuaria en México.* 33:159-167.
- Sadighi, M., K.J. Bodensteiner, A.E. Beattie and S.M. Galloway. 2002. Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (GDF9) to sheep chromosome 5. *Anim. Genet.* 33:244-245.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230(4732):1350-1354.

- Sambrook, J. and Russel, D.W. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3rd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York. ISBN: 0879695773., pp: 2100.
- Segura, J.C., L. Sarmiento and O. 1996. Rojas. Productivity of Pelibuey and Blackbelly ewes in México under extensive management. *Small Ruminant Research*. 21:57-62.
- Sharkey, S., R.J. Callan, R. Mortimer and C. Kimberling. 2001. Reproductive techniques in sheep. *Review. Food Anim Pract*. 17:435-455.
- Sierra, I. 1992. La raza ovina Rasa Aragonesa: Caracteres morfológicos y productivos. *Animal Genetic Resources Information*., 10: 65-74.
- Turner, H.N. 1978. Selection for reproduction rate in Australian Merino sheep: Direct responses. *Australian Journal of Agricultural Research*. 29:327-350.
- Vacca, G.M., Dhaouadi, A., Rekik, M., Carcangiu, V., Pazzola, M., Dettori., M.L. 2010. Prolificacy genotypes at BMPR 1B, BMP15 and GDF9 genes in North African sheep breeds. *Small Ruminant Research*., 88: 67-71.
- Vitt, U.A., M. Hayashi, C. Klein and A.J.W. Hsueh. 2000. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biology of Reproduction*. 62:370-377.