

La mutación G1 del gen *GDF9* y su relación con el peso al nacimiento en ovinos Pelibuey

Miriam Rosas-Rodríguez   Juan Salazar-Ortiz¹   Josafhat Salinas Ruiz¹  
Jaime Gallegos-Sánchez   Martha Hernández-Rodríguez   Cesar Cortez-Romero^{2,3}  
Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad – Ganadería,
Texcoco, Estado de México, México.

The G1 mutation of the gene *GDF9* and its relationship with birth weight in Pelibuey sheep

Abstract. Single nucleotide polymorphisms (SNP) in the gene *GDF9* (Growth Differentiation Factor 9) have been associated with litter size, birth type, and birth weight in sheep. The objective of this study was to identify the presence of the SNP G1 in exon 1 of the *GDF9* gene and to relate this to birth weight (BW) and two productive variables (weaning weight: WW and daily weight gain: DWG) in Pelibuey lambs. A total of 64 lambs from single ($n = 9$) and multiple ($n = 55$) births were used. Using PCR-RFLP markers, the presence of SNP G1 was determined, revealing a genotype frequency of 0.84 for the wild type GG and 0.15 for the heterozygous GA genotype. Allele frequency was 0.92 for the G allele and 0.078 for the A allele. The AA mutated genotype was not detected. The GA genotype was present in the multiple birth lambs. Values of the variables BW, WW, and DWG were higher ($P < 0.05$) in single birth lambs with the genotype GG (GGS) than in multiple birth lambs with this genotype (GGM) and in multiple birth lambs with the GA genotype (GAM). The GGS lambs presented improved preweaning performance compared to the GA and GG genotype lambs from multiple births. Finally, BW, WW, and DWG all differed significantly among birth types and genotypes ($P < 0.05$). This is the first report of the presence of the G1 SNP in Pelibuey sheep.

Keywords: Pelibuey lambs. Exon 1. Litter size. SNP marker. Prolificacy.

Resumen. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el gen *GDF9* (Growth Differentiation Factor 9), han sido asociados con el tamaño de camada o tipo de parto y peso al nacimiento en ovinos. El objetivo del presente estudio fue identificar la presencia del SNP G1 en el exón 1 del gen *GDF9* para relacionarlo con el peso al nacimiento (PN) y las variables productivas, peso al destete (PD) y ganancia diaria de peso (GDP), en corderos raza Pelibuey. Un total de 64 corderos provenientes de parto simple ($n = 9$) y múltiple ($n = 55$) fueron utilizados. A través de marcadores PCR-RFLP se identificó la presencia del SNP G1; con una frecuencia genotípica de 0.84 para el genotipo silvestre GG y 0.15 para el genotipo heterocigótico GA. La frecuencia alélica fue de 0.92 para el alelo (G) y 0.078 para el alelo A. No se detectó el genotipo mutado AA. El genotipo GA estuvo presente en corderos de parto múltiple. Las variables PN, PD y GDP fueron superiores en corderos de parto simple con el genotipo GG (GGS) que en corderos de parto múltiple con genotipo GG (GGM) y corderos de parto múltiple con genotipo GA (GAM). Los corderos GGS tuvieron mejor desempeño predestete con respecto a los corderos de genotipo GA y GG de parto múltiple. Finalmente, PN, PD y GDP fueron estadísticamente diferentes entre tipo de parto y tipo de genotipo. Este es el primer reporte del SNP G1 en ovinos raza Pelibuey.

Palabras clave: Corderos Pelibuey. Exón 1. Tipo de parto. Marcador SNP. Prolificidad.

Recibido: 2023-05-09. Revisado: 2023-05-19. Aceptado: 2023-07-30.

¹Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, Posgrado en Innovación Agroalimentaria Sustentable, Amatlán de los Reyes, Veracruz, México, 94953.

²Autor para la correspondencia: ccortez@colpos.mx

³Colegio de Postgraduados Campus San Luis Potosí, Posgrado en Innovación en Manejo de Recursos Naturales, Campus San Luis Potosí, Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí, México, 78600.

A mutação G1 do gene *GDF9* e sua relação com o peso ao nascer em ovelhas Pelibuey

Resumo. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene *GDF9* (Fator de Diferenciação de Crescimento 9) têm sido associados ao tamanho da ninhada ou tipo de parto e peso ao nascer em ovinos. O objetivo deste estudo foi identificar a presença do SNP G1 no exon 1 do gene *GDF9* para relacioná-lo com o peso ao nascer (BN) e variáveis produtivas (peso ao desmame (PD) e ganho de peso diário (GDP) em cordeiros). Foram utilizados 64 cordeiros de nascimentos simples ($n = 9$) e múltiplos ($n = 55$). A presença do SNP G1 foi identificada através de marcadores PCR-RFLP, com frequência genotípica de 0,84 para o tipo selvagem GG e 0,15 para o genótipo heterozigoto GA. A frequência alélica foi de 0,92 para o alelo (G) e 0,078 para o alelo A. O genótipo AA mutado não foi detectado. O genótipo GA estava presente em cordeiros de nascimentos múltiplos. As variáveis PN, PD e PIB foi maior ($P < 0,05$) em cordeiros de nascimento único com genótipo GG (GGS) do que em cordeiros de nascimento múltiplo com genótipo GG (GGM) e cordeiros de nascimento múltiplo com genótipo GA (GAM). desempenho ao desmame em comparação com cordeiros de genótipos GA e GG de partos múltiplos. Finalmente, PN, PD e GDP foram estatisticamente diferentes entre tipo de parto e tipo de genótipo ($P < 0,05$). Este é o primeiro relato de SNP G1 em ovelhas Pelibuey.

Palavras-chave: Cordeiros Pelibuey. Éxon 1. Tipo de parto. marcador SNP. Prolificância.

Introducción

El tamaño de camada es una característica económicamente importante en la producción de ovinos, porque se relaciona directamente con el peso al nacimiento y sobrevivencia de los corderos, y ha sido estudiada a nivel molecular (Tong *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021). Los polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) han sido asociados con el incremento de tasa ovulatoria, tamaño de camada y peso al nacimiento de corderos de las razas Cambridge, F700-Belclare, Awassi, Embrapa y Pelibuey (Al-Khuzai & Ahmed, 2019; Getmantseva *et al.*, 2019; Mohammad *et al.*, 2011). Los SNP en el gen del factor de crecimiento de diferenciación 9 (*GDF9*, por sus siglas en inglés) se han asociado con el tamaño de camada, peso al nacimiento, tasa ovulatoria y prolificidad (Tong *et al.*, 2020). Existen 11 mutaciones en la región codificante del gen *GDF9*, aunque sólo cinco afectan la tasa ovulatoria y el tamaño de la camada; las mutaciones reportadas son: G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8 o *FecG^H* (alta fertilidad) (Hanrahan *et al.* 2004), *FecG^T* (Thoka, Nicol *et al.* 2009), *FecG^E* (Embrapa, Silva *et al.* 2011), G7 o *FecG^{NWS}* (Oveja Blanca Noruega, Våge *et al.*, 2013) y *FecG^V* (Vecaria, Souza *et al.*, 2014). Los SNP en este gen *GDF9* son asociados al incremento en tasa ovulatoria en individuos heterocigóticos; por el contrario, en individuos homocigotos dominantes, las mutaciones se

asocian con esterilidad en las razas Belclare y Cambridge (Hanrahan *et al.*, 2004). En ovejas raza Pelibuey, la mutación *FecG^E*, ubicada en el exón 2 del gen *GDF9*, tiende a incrementar la prolificidad (Muñoz-García *et al.*, 2021; Pérez-Ruiz *et al.*, 2020). La mutación G1 del gen *GDF9* corresponde a la sustitución de una Guanina por una Adenina en la posición 260 del gen, la cual, a nivel de proteína, corresponde a la sustitución de una Arginina (R) por una Histidina (H) (Hanrahan *et al.*, 2004). Esta mutación G1 ha sido asociada con el incremento en el tamaño de camada y peso al nacimiento en ovinos Awassi (Al-Khuzai & Ahmed, 2019; Getmantseva *et al.*, 2019), también se ha reportado en otras razas prolíficas de ovinos, como Cambridge and F700-Belclare (Hanrahan *et al.* 2004). La raza Pelibuey es utilizada para la producción de carne en México, por sus principales características de adaptabilidad, resistencia parasitaria y prolificidad de 1.55 (Aguilar-Martínez *et al.*, 2017; Pérez-Ruiz *et al.*, 2020). El objetivo del presente estudio fue identificar la presencia del polimorfismo G1 en el exón 1 del gen *GDF9* para relacionarlo con el PN, PD y GDP predestete en corderos raza Pelibuey provenientes de parto simple y múltiple.

Materiales y Métodos

La investigación se realizó entre los años 2021-2023 en el Área Experimental de ovinos del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, Amatlán de los Reyes, Veracruz, México. La ubicación geográfica de este lugar es 18°51'20" N y 96°51'37" W, con altitud de 650 m.s.n.m., temperatura media anual de 22 °C y

precipitación anual de 2000 mm (García, 2004). El cuidado de los animales se realizó de acuerdo al Reglamento para el Uso y Cuidado de Animales destinados a la Investigación del Colegio de Postgraduados (CP, 2016).



Animales experimentales

Sesenta cuatro (64) muestras de sangre periférica de corderos raza Pelibuey de parto simple (un cordero nacido por oveja, $n = 9$) y múltiple (2 o más corderos nacidos por oveja, $n = 55$) fueron colectadas con una jeringa estéril de la vena yugular del cordero a los 75 días de edad y fueron conservadas en tubos con anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Peso al nacimiento, peso al destete y ganancia diaria de peso

El peso al nacimiento (PN) de los animales se registró durante las primeras 12 h de vida del cordero y cada 15 días hasta la edad al destete (PD, 75 días). La ganancia diaria de peso (GDP) fue estimada de la diferencia de PD y el PN y dividiendo el resultado entre la edad del cordero al destete en días.

Extracción de ADN y amplificación del exón 1 por PCR

El ADN genómico de las muestras de sangre se extrajo utilizando el Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, EU). Para la amplificación del exón 1 (462 pb) del gen *GDF9* se utilizaron los primers: forward 5'-GAAGACTGGTATGGGGAAATG-3' y reverse 5'-CCAATCTGCTCCTACACAACCT-3' (Hanrahan *et al.*, 2004). La PCR se realizó en un volumen final de 25 uL. Los componentes de cada reacción fueron: 12.5 uL de Master Mix 2x (Promega, Co.), 6.5 uL de agua libre de nucleasas, 2 uL de cada iniciador a 1 uM y 2 uL de ADN a 10 ng uL⁻¹. El programa de amplificación consistió en: desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, seguida de 35 ciclos de amplificación: desnaturalización a 94 °C por 30 s, 63 °C por 40 s, 72 °C por 30 s y extensión final a 72 °C por 4 min (Hanrahan *et al.*, 2004), en un termociclador AB Applied Biosystems (Gene Amp PCR System 9700). Los productos de PCR se verificaron en agarosa 2 % con tinción de bromuro de etidio, de acuerdo a los protocolos de bioseguridad de CIMMYT (2006).

Mutación G1 (GA) del gen *GDF9*

La cuantificación de la mutación G1 (GA) se realizó después de verificar que el producto de la amplificación del exón 1 fuera de 462 pb (Figura 1). Una vez verificado, se procedió a realizar la digestión con la endonucleasa *HhaI* y cuantificar el tipo de genotipos y la frecuencia de los alelos. Los resultados indicaron dos tipos de perfiles de digestión. Uno de

Cuantificación del SNP G1 mediante RFLP

Los productos de PCR fueron digeridos con la enzima *HhaI* (Thermo Scientific) en reacciones de 25 uL. Cada reacción consistió en: 1 U de enzima, 10 uL de producto de PCR, 18 uL de agua libre de nucleasas y 2 uL de Buffer Tango 10X, las cuales se incubaron a 37 °C durante una hora para luego inactivar la enzima a 65 °C por 10 min. Los fragmentos digeridos se separaron en agarosa 3 % durante 60 min a 80 V, con el uso de un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega Co.). Los geles se documentaron en un transiluminador MiniBis Pro 16 mm (DNR Bio-Imaging Systems®, Jerusalem, Israel) para posteriormente evaluar cada perfil de digestión.

Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas de la población de estudio se estimaron con base a la ecuación $(p+q)^2 = 1$ donde, para un locus con dos alelos p y q, la frecuencia genotípica de los homocigotos es p^2 y q^2 , respectivamente, con el heterocigoto siendo $2pq$ que, para el caso de la mutación G1 del gen *GDF9*, esto corresponde a los genotipos GG (p^2), GA ($2pq$) y AA (q^2).

Los datos de PN, PD y GDP de los corderos provenientes de parto simple y múltiple, previamente genotipados como GG o GA, se analizaron usando el procedimiento GLIMMIX de SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Se utilizó un modelo lineal de efectos mixtos como a continuación se describe:

$$y_{ijk} = \mu + G_i + P_j + animal_k + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: y_{ijk} es la variable respuesta (PN, PD y GDP) en el factor genotipo i del cordero bajo el tipo de parto j en el animal k , μ es la media general, G_i es el efecto fijo debido al genotipo del cordero, P_j es el efecto fijo del tipo de parto del cordero y $animal_k$ es el efecto aleatorio debido al animal, donde se asume $animal_k \sim IIDN(0, \sigma^2_{animal})$ y ε_{ijk} es el error experimental donde cada ε_{ijk} tiene una distribución normal con media 0 y varianza constante $\sigma^2_{\{\varepsilon_{ijk} \sim IIDN(0, \sigma^2)\}}$

Resultados y Discusión

ellos correspondió a los individuos homocigóticos silvestres GG y el otro a los individuos heterocigóticos GA. Estos últimos son los individuos portadores de la mutación G1. De manera analítica, el exón 1 de los individuos homocigóticos debe presentar dos sitios de corte y , por lo tanto, originar tres fragmentos de digestión (52, 156 y 254 pb), en tanto que, el exón 1 de uno de los cromosomas de los individuos heterocigóticos, solo debe presentar un solo sitio de corte *HhaI* y , por consiguiente, dar lugar a dos

fragmentos (52 y 410 pb). Dado que los heterocigóticos tienen ambas versiones del exón 1, el número de fragmentos de digestión es de cuatro (52, 156, 254 y 410 pb), tal y como se muestra con los resultados de la Figura 2.

A partir de estos resultados se determinó que la frecuencia de los alelos y genotipos de la mutación G1 en la población de ovino Pelibuey examinada, fue

como sigue: el alelo G se encuentra en una frecuencia de 0.922 mientras que el alelo A se encuentra en una frecuencia de 0.078, respectivamente. Solamente, dos de tres genotipos posibles fueron detectados, GG y GA, con frecuencias respectivas de 0.844 y 0.156, respectivamente (Tabla 1). En consecuencia, no se detectó la presencia de individuos homocigotos mutados AA en la población evaluada.

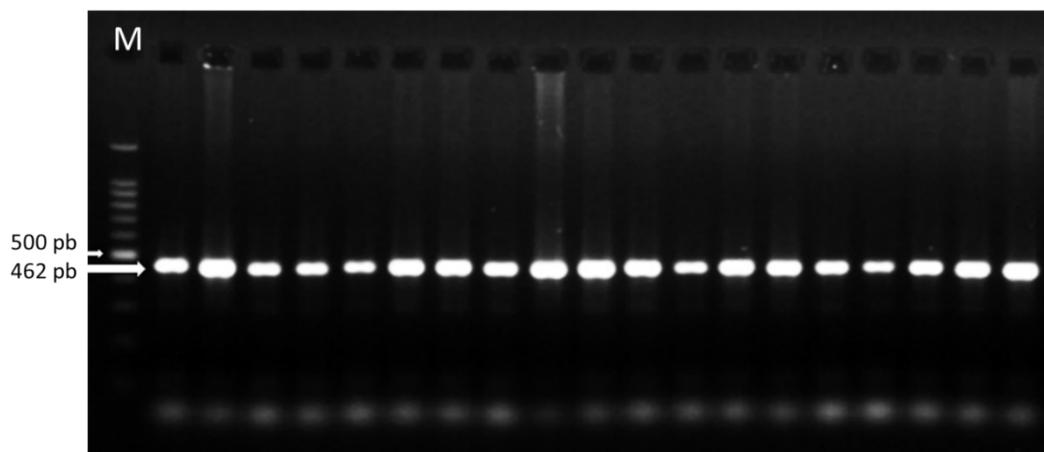


Figura 1. Amplificación por PCR del exón 1 del gen *GDF9*. Electroforesis en gel de agarosa al 2 %. M es el marcador de peso molecular de 100 pb.

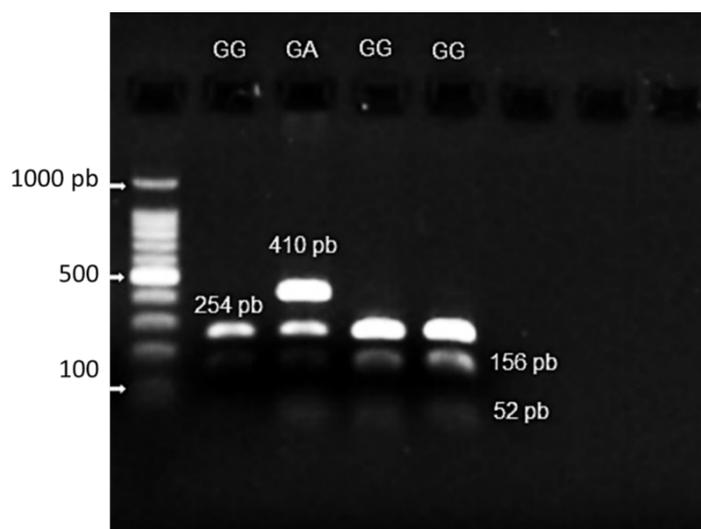


Figura 2. PCR-RFLP de la mutación G1 (GA) del gen *GDF9* digerido con la enzima Hhal.

Los productos de digestión muestran dos perfiles, uno que corresponde a los individuos silvestres (GG), los cuales tienen dos sitios de reconocimiento de la enzima en el exón 1 y, por lo tanto, generan tres fragmentos (52, 156 y 254 pb), y otro que corresponde a los heterocigóticos (GA), los cuales presentan ambas versiones de la mutación G1 en el exón 1, lo cual da lugar a cuatro fragmentos (52, 156, 254 y 410 pb).

La frecuencia genotípica GG y GA encontrada coincide con reportes previos realizados en ovinos Awassi, los cuales reportaron frecuencias de 0.80 y 0.18, respectivamente (Al-Khuzai *et al.*, 2019). La ausencia del genotipo mutante AA en el presente

estudio también coincide con reportes previos en estudios en ovinos (Getmantseva *et al.*, 2019; Kirikci *et al.*, 2021; Paz *et al.*, 2014). Genotipos mutantes en el gen *GDF9* han sido asociados con problemas de esterilidad en ovejas Cambridge and F700-Belclare (Hanrahan *et al.*, 2004). Probablemente la ausencia de registro de este genotipo se debe a que en el rebaño de este estudio lleva un plan de manejo reproductivo donde utilizan hembras y machos evaluados previamente al empadre; y a que, la raza Pelibuey es una raza prolífica (Hernández *et al.*, 2022). Por otra parte, el genotipo heterocigoto GA ha sido asociado con un incremento en el tamaño de camada y con el peso al nacimiento de los corderos (Getmantseva *et al.*, 2019). En el presente

estudio los 9 individuos que presentaron el genotipo heterocigótico GA provienen de parto múltiple; es

decir, no se encontró la mutación en individuos provenientes de parto simple.

Tabla 1. Frecuencia (Fr) genotípica y alélica del SNP G1 del gen *GDF9* en ovinos raza Pelibuey.

Genotipos	Fr genotípica				Fr alélica	
	Silvestre GG	Heterocigótico GA	Mutado AA	TOTAL	p (G)	q(A)
Fr genotípica esperada	p ²	2pq	q ²	1		
No. Individuos	55	9	0	64		
Fr genotípica observada	0.844	0.156	0	1	0.922	0.078

Peso al nacimiento por genotipo GG/GA y tipo de parto simple y múltiple

En la Tabla 2 se muestran los resultados de PN, PD y GDP de corderos Pelibuey de parto simple y múltiple de genotipos GG y GA. Las tres variables medidas

fueron estadísticamente diferentes entre tipo de parto y tipo de genotipo. Los corderos de parto simple y de genotipo GG (GGS) tuvieron mejor desarrollo predestete y no hubo diferencia entre corderos de parto múltiple con genotipo GG (GGM) y corderos de parto múltiple con genotipo GA (GAM).

Tabla 2. Peso al nacimiento, ganancia diaria de peso y peso al destete de cordero raza Pelibuey de parto simple y múltiple de genotipo GG y GA (medias \pm error estándar).

Genotipo		PN	PD	GDP
GGS	(n=9)	3.356 \pm 0.07 ^a	14.764 \pm 0.70 ^a	0.231 \pm 0.01 ^a
GGM	(n=46)	2.494 \pm 0.07 ^b	11.247 \pm 0.49 ^b	0.156 \pm 0.01 ^b
GAM	(n=9)	2.322 \pm 0.09 ^b	9.925 \pm 1.12 ^b	0.148 \pm 0.01 ^b

PN. Peso al nacimiento. PD. Peso al destete. GDP. Ganancia diaria de peso. GGS. Corderos de parto simple con genotipo GG; GGM: corderos de parto múltiple con genotipo GG; GAM: corderos de parto múltiple con genotipo GA. Medias con diferente superíndice en fila son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

El genotipo GA también ha sido reportado con un incremento de 140 g en el PN en ovinos raza Volgograd (Getmantseva *et al.*, 2019). Esto se debe probablemente a que el genotipado se realizó a las madres y no directamente a los corderos. Los corderos de parto múltiple con genotipo GG y GA presentaron valores inferiores en PN, PD y GDP. Estos resultados coinciden con los reportados por Hinojosa-Cuellar *et al.* (2012);

donde los corderos de parto simple pesan más al nacimiento que los corderos de parto múltiple (300 g); la GDP entre corderos de parto simple y parto múltiple fue de 15 g y, finalmente para PD, la diferencia entre tipo de parto fue de 300 g. El PN, PD y GDP son variables productivas predestete, que están asociadas al tamaño de camada y variantes tipo SNP en ovinos Pelibuey (Noriega-Loyo, 2017).

Conclusión

Se identificó por primera vez el polimorfismo G1 en el exón 1 del gen *GDF9* en corderos de raza Pelibuey provenientes de parto simple y múltiple. Se detectaron los genotipos, silvestre GG y heterocigótico GA. No se detectó el genotipo mutado AA. El genotipo GA se identificó sólo en individuos provenientes de parto múltiple (GAM) y estuvo en concordancia con un menor PN de los corderos respecto a corderos de parto simple con genotipo GG (GGS). Así, PN, PD y GDP fueron estadísticamente diferentes entre tipo de parto y tipo de genotipo, aunque la diferencia podría deberse

más al efecto de tipo de nacimiento. Se requería identificar y comparar con animales portadores tanto de parto simple como múltiple para lograr la confirmación del efecto de la mutación. La identificación de estos genotipos del SNP G1 en el exón 1 en ovinos raza Pelibuey en este estudio abre una ventana de oportunidad para asociar información genética con información de variables productivas en la producción de ovinos y contribuir al manejo dirigido de la raza Pelibuey.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por el financiamiento en los estudios de doctorado de la primera autora, al laboratorio de marcadores moleculares del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo y a las Líneas de

Generación y/o Aplicación del Conocimiento: Ganadería eficiente, bienestar sustentable y cambio climático (Campus Montecillo), Eficiencia y sustentabilidad en la producción primaria en sistemas agroalimentarios (Campus Córdoba) y Manejo



sustentable de recursos naturales (Campus SLP), del Colegio de Postgraduados; así como al Área Experimental de ovinos del Colegio de Postgraduados

Campus Córdoba, por las facilidades con los corderos de la raza Pelibuey para realizar el estudio.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Aprobación del Comité de Experimentación Animal: Aprobado por el Comité de bienestar animal (COBIAN) de acuerdo al reglamento para el uso y cuidado de animales destinados a la investigación del Colegio de Postgraduados.

Contribuciones de los autores: Conceptualización, M.R.R., J.S.O. y C.C.R., metodología, M.R.R., J.S.O. y M.H.R., análisis de datos, M.R.R. y J.S.R., investigación: M.R.R. y J.S.O., financiamiento: J.S.O. y C.C.R., escritura y preparación del manuscrito: M.R.R., J.S.O. y C.C.R., escritura y edición final del manuscrito, M.R.R., J.S.O., J.S.R., C.C.R., J.G.S. y M.H.R., visualización y supervisión: M.R.R., J.S.O., C.C.R., J.G.S. y M.H.R., supervisión: J.S.O. y C.C.R., administración del proyecto, J.S.O. y C.C.R., adquisición de fondos: J.S.O. y C.C.R. Todos los autores leyeron y están de acuerdo para la publicación del manuscrito.

Editado por G. Manuel Parra-Bracamonte.

Literatura Citada

- Aguilar-Martínez, C. U., J. M. Berruecos-Villalobos, B. Espinoza-Gutiérrez., J. C. Segura-Correa., J. Valencia-Méndez., y A. Roldán-Roldán. 2017. Origen, historia y situación actual de la oveja pelibuey en México. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 20(3), 429-439.
- Al-Khuzai, F. L. J., and J. R. Ahmed. 2019. Polymorphism of *GDF9* (exon-1) gene and its association with milk production and prolificacy of Awassi sheep. *Plant Archives*, 19(2), 4037-4040.
- CIMMYT. 2006. Protocolos de laboratorio; laboratorio de genética molecular aplicada. International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT). 3^{ra} ed. México, D.F. 93 p.
- CP. 2016. Reglamento para el uso y cuidado de animales destinados a la investigación en el Colegio de Postgraduados. Consejo General Académico. ACUERDO 02.11.16.
- García, E. 2004. Modificación al sistema de clasificación climática de Koppen (5.^a ed.). México, D.F.: UNAM.
- Getmantseva, L., N. Bakoev, S. Bakoev, N. Shirokova, M. Kolosova, A. Kolosov and V. Shevtsova. 2019. Effect of the *GDF9* gene on the weight of lambs at birth. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 25(1), 153-157.
- Hanrahan, J. P., S. M. Gregan, P. Mulsant, M. Mullen, G. H. Davis, R. Powell y 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(4), 900-909.
- Hernández, V. R., V. V. Murillo, R. G. Costa, V. L. Parraguirre, M. D. L. A. Valencia de Ita, y O. Romero-Arenas. 2022. Evaluation of Genetic Parameters of Growth of Pelibuey and Blackbelly Sheep through Pedigree in Mexico. *Animals*, 12(6), 691.
- Hinojosa-Cuéllar, J. A., J. Oliva-Hernández, G. Torres-Hernández, J. C. Segura-Correa, E. M. Aranda-Ibáñez, y J. M. González-Camacho. 2012. Factores que afectan el crecimiento predestete de corderos Pelibuey en el trópico húmedo de México. *Universidad y Ciencia*, 28(2), 163-171.
- Kirikci, K., M. A. Cam, and L. Mercan. 2021. Investigation of G1 (c. 260G> A) polymorphism in exon 1 of *GDF9* gene in Turkish sheep breed Karayaka. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 45(1), 191-197.
- Mohammad, M. K., H. H. Seyed, and H. Nosratollah. 2011. Genetic polymorphism *BMP15* and *GDF9* genes in Sangsari sheep of Iran. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, 3(1), 31-34.
- Muñoz-García, C., H. Vaquera-Huerta., J. Gallegos-Sánchez., C. M. Becerril-Pérez., L. A. Tarango-Arámbula., Á. Bravo-Vinaja., and Cortez-Romero. 2021. Influence of *FecG^E* mutation on the reproductive variables of Pelibuey ewes in the anestrus period. *Tropical Animal Health and Production*, 53(2), 328.
- Noriega Loyo, J. 2017. Determinación del efecto del polimorfismo del gen leptina en el desarrollo corporal-calidad de la canal de corderos Pelibuey (Master's thesis). Colegio de Postgraduados.
- Paz, E., J. Quiñones., S. Bravo., E. Rodero., A. González., and N. Sepúlveda, N. 2014. Identification of G1 and G8 polymorphisms of *GDF9* gene in Araucano creole sheep. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(2), 327-331.
- Pérez-Ruiz, E., J. Gallegos-Sánchez, C. Cortez-Romero, O. L. Segura-León, J. Salinas-Ruiz and J. Salazar-Ortiz. 2020. *FecG^E* mutation in Pelibuey sheep. *Animal Genetics*, 51(2), 346-347.



- Silva, B. D. M., E. A. Castro, C. J. H. Souza, S. R. Paiva, R. Sartori, M. M. Franco, H. C. Azevedo, T. A. S. N. Silva, A. M. C. Vieira, J. P. Neves, E. O. Melo. 2011. A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (*GDF9*) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. *Animal genetics*, 42(1), 89-92.
- Souza, C. J. H., A. S. McNeilly., V. M. Benavides., E. O. Melo and C. F. Moraes, J. 2014. Mutation in the protease cleavage site of *GDF9* increases ovulation rate and litter size in heterozygous ewes and causes infertility in homozygous ewes. *Animal Genetics*, 45(5), 732-739.
- Tong, B., J. Wang, Z. Cheng, J. Liu, Y. Wu, Y. Li and G. Li. 2020. Novel variants in *GDF9* gene affect promoter activity and litter size in Mongolia sheep. *Genes*, 11(4), 375.
- Våge, D. I., M. Husdal., M. P. Kent., G. Klemetsdal and I. A. Boman. 2013. A missense mutation in growth differentiation factor 9 (*GDF9*) is strongly associated with litter size in sheep. *BMC genetics*, 14, 1-8.
- Wang, F., M. Chu, L. Pan, X. Wang, X. He, R. Zhang and R. Di. 2021. Polymorphism detection of *GDF9* gene and its association with litter size in Luzhong mutton sheep (*Ovis aries*). *Animals*, 11(2), 57.