

## **Avanços no tema genes da prolificidade ou fertilidade em ovinos: revisão**

**Advances in the subject of prolificacy genes or fertility in sheep: a review**

**Avances en los genes de prolificidad o fertilidad en ovejas: una revisión**

Recebido: 11/08/2021 | Revisado: 18/08/2021 | Aceito: 20/08/2021 | Publicado: 22/08/2021

### **Marilene dos Santos Maciel**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4234-9764>  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil  
E-mail: marilenemaciel123@hotmail.com

### **Apolônio Gomes Ribeiro**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6730-0209>  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil  
E-mail: apoloniogomes962@gmail.com

### **Paulo Otávio Silva Cavalcante**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8073-8560>  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil  
E-mail: paulootavio.s.c@gmail.com

### **Chrislanne Barreira de Macêdo Carvalho**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0704-4949>  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil  
E-mail: chrislanne\_carvalho@hotmail.com

### **Jéssica Berly Moreira Marinho**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3826-7670>  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil  
E-mail: jessicaberlymm@gmail.com

### **Gabriel Miranda Macambira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0277-5286>  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil  
E-mail: gabriel.miranda.zootecnia@gmail.com

### **Helia Sharlane de Holanda Oliveira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4314-4827>  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil  
E-mail: sharlaneho@yahoo.com

### **Dayane Albuquerque da Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6243-3969>  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil  
E-mail: dayane.albuquerque.ds@gmail.com

### **Ana Carolina Ferreira dos Santos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0361-5222>  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil  
E-mail: carolufirpe@hotmail.com

### **Diana Valadares Pessoa**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1194-4985>  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil  
E-mail: dianavaladares13@hotmail.com

### **Gabriela Duarte Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9688-8881>  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil  
E-mail: gabrieladuarte1059127@gmail.com

### **Yanne Cibelle Vieira de Carvalho**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2373-7390>  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil  
E-mail: yannevcv@gmail.com

## **Resumo**

As características de reprodução relativamente têm baixa ou média herdabilidade e não exibem uma resposta notável à seleção fenotípica. Portanto, a inclusão de informações genéticas dos genes associados à capacidade reprodutiva pode melhorar eficientemente a resposta de seleção. Os principais genes importantes que afetam a prolificidade e suas diversidades genéticas em diferentes raças de ovelhas vem sendo estudados em uma escala global. Onde, diferentes mutações associadas as características reprodutivas, incluindo taxa de ovulação e tamanho da ninhada, foram encontradas em várias raças de ovelhas em todo o mundo. Uma visão geral dos estudos sobre os principais genes da prolificidade mostrou que alguns alelos podem expressar diferentes efeitos fenotípicos em diferentes raças e, portanto, estudos adicionais sobre efeitos de interação são necessários para uma maior compreensão do controle genético da

reprodução em ovinos. Com relação a metodologia de avaliação para as características de prolificidade, a aplicação de novas tecnologias torna-se necessário para encontrar novas variantes, que é essencial para estudos futuros. A metodologia adotada foi um estudo descritivo, resultando em uma revisão bibliográfica embasada em artigos científicos mundiais.

**Palavras-chave:** Genética; Herdabilidade; Raças; Reprodução.

### Abstract

Reproductive traits relatively have low or medium heritability and do not exhibit a remarkable response to phenotypic selection. Therefore, the inclusion of genetic information from genes associated with reproductive capacity can efficiently improve the selection response. The main important genes affecting prolificacy and their genetic diversity in different breeds of sheep have been studied on a global scale. Where, different mutations associated with reproductive traits, including ovulation rate and litter size, have been found in various sheep breeds around the world. An overview of studies on major proliferation genes showed that some alleles may express different phenotypic effects in different breeds and therefore, further studies on interaction effects are needed for a greater understanding of the genetic control of reproduction in sheep. Regarding the evaluation methodology for prolificacy traits, the application of new technologies is necessary to find new variants, which is essential for future studies. The methodology adopted was a descriptive study, resulting in a literature review based on worldwide scientific articles.

**Keywords:** Genetics; Heritability; Breeds; Reproduction.

### Resumen

Los rasgos reproductivos tienen relativamente una heredabilidad baja o media y no muestran una respuesta notable a la selección fenotípica. Por lo tanto, la inclusión de la información genética de los genes asociados a la capacidad reproductiva puede mejorar eficazmente la respuesta de selección. Se han estudiado a escala mundial los principales genes importantes que afectan a la prolificidad y su diversidad genética en diferentes razas de ovejas. En varias razas de ovejas de todo el mundo se han encontrado diferentes mutaciones asociadas a rasgos reproductivos, como la tasa de ovulación y el tamaño de la camada. Una visión general de los estudios sobre los principales genes de la proliferación mostró que algunos alelos pueden expresar diferentes efectos fenotípicos en diferentes razas y, por lo tanto, se necesitan más estudios sobre los efectos de interacción para una mayor comprensión del control genético de la reproducción en las ovejas. En cuanto a la metodología de evaluación de los rasgos de prolificidad, se hace necesaria la aplicación de nuevas tecnologías para encontrar nuevas variantes, lo que es esencial para futuros estudios. La metodología adoptada fue un estudio descriptivo, que dio lugar a una revisión bibliográfica basada en artículos científicos de todo el mundo.

**Palabras clave:** Genética; Heredabilidad; Razas; Reproducción.

## 1. Introdução

A melhoria das características reprodutivas, como a taxa de ovulação e a sobrevivência embrionária, são os principais componentes para o tamanho da ninhada ou prolificidade, que é de grande importância econômica (Lassoued et al., 2017). A variação genética na taxa de ovulação em ovelhas vem sendo amplamente estudada, e evidências demonstram diferenças significativas entre raças. O primeiro gene importante identificado para a prolificidade em ovelhas foi o Booroola (Mahdavi et al., 2014), encontrado em ovinos da raça Merinos Booroola. Em virtude disso, surgiram novas suposições sobre os genes para explicar o aumento no tamanho da ninhada ou taxa de ovulação em uma variedade de raças.

Três principais genes da fecundidade foram identificados em ovelhas, nomeadamente, receptores de proteínas morfogenéticas óssea tipo 1B (*BMPR1B*) conhecida como *FecB* no cromossomo 6, proteína morfogenética óssea 15 (*BMP15*) conhecida como *FecX* no cromossomo X e fator de diferenciação de crescimento 9 (*GDF9*) conhecido como *FecG* no cromossomo 5 (Abdoli et al., 2016). Sendo que, esses três genes *Fec* pertencem à superfamília do gene  $\beta$  do fator de crescimento transformante, atuando nas células da granulosa para regular o crescimento e a diferenciação dos oócitos (Ahmad et al., 2017).

Esses são expressos em todas as fases do desenvolvimento do folículo nas espécies de mamíferos e estão envolvidos na regulação esteroideogênica das células da granulosa (Dias et al., 2014). As células da granulosa são componentes importantes do ambiente folicular para a obtenção da capacidade dos ovócitos, ovulação e fertilização, pois regulam a expressão do receptor de hormônio luteinizante (LHR), produção de estradiol e progesterona, secreção de Inibina A e B e produção de vários fatores que transcrevem as proteínas vitais (Ceko et al., 2015).

O alelo mutado *FecB* está associado ao efeito aditivo na taxa de ovulação (Wilson et al., 2001). Para as mutações do *FecG*, esse gene tem efeitos diferentes sobre a taxa de ovulação em cada estro, e até mesmo pode causar infertilidade em alguns casos (Souza et al., 2001).

De acordo Hanrahan et al. (2004), as ovelhas contendo um alelo heterozigoto a partir de duas cópias do gene mutado *GDF9* (*FecG<sup>H</sup>*) são férteis e apresentam alta taxa de ovulação. Por outro lado, as ovelhas contendo os mesmos alelos na forma homozigota para esta mutação são inférteis além da falha do ovário elementar (Barakat et al., 2017).

Com isso é possível destacar que esses genes produzem proteínas que participam de processos relacionados à taxa de ovulação e ao número da prole (Moghadaszadeh et al., 2015). No entanto, apesar desses genes estarem associadas ao aumento da taxa de ovulação e tamanho da ninhada, ele também está associado a esterilidade (Lassoued et al., 2017), demonstrando sua complexidade de entendimento.

Devido a importância e magnitude com que esses genes interferem na cadeia produtiva de uma forma geral, principalmente quando se trabalha com eficiência reprodutiva, vários estudos vêm sendo realizados no intuito de encontrar novos genes e mutações prolíferas nas diferentes raças em escala global. Com os avanços nos estudos, também houve uma necessidade primordial nos métodos de avaliação dos genes, na tentativa de eliminar muitas das vezes testes invasivos e laboriosos. As melhorias recentes na genética molecular indicaram que os principais genes associados à reprodução podem ser utilizados através da seleção assistida por marcador (MAS) (El-Seedy et al., 2017).

Dado o exposto, o objetivo desta revisão foi avaliar estudos sobre os principais genes da prolificidade que estão em evidências na atualidade com efeitos substanciais sobre o desempenho reprodutivo em ovinos.

## 2. Metodologia

O presente estudo trata-se de uma revisão narrativa acerca dos avanços no tema genes da prolificidade ou fertilidade em ovinos. A revisão abrangeu, em sua maioria, artigos científicos, mas foram também utilizadas teses e dissertações presentes na base de dados do Scielo (Scientific Electronic Library Online), Science Direct e Google Acadêmico. Descartou-se trabalhos sem resumo e que não abordavam a temática do estudo, assim como aqueles que apresentavam metodologias mal aplicadas ou suspeitas.

## 3. Revisão Bibliográfica

### 3.1 Proteínas Morfogenéticas Ósseas Tipo 1B (*BMPR1B*)

O gene *BMPR1B* é um dos principais genes candidatos para controle genético da taxa de ovulação e consequente aumento do tamanho da ninhada em diferentes raças ovinas (Mahdavi et al., 2014). Isso se justifica, porque quando comparada com os outros genes (*BMP15* e *GDF9*), esse tem a capacidade de aumentar a taxa de ovulação tanto em ovelhas heterozigotas como homozigotas. O gene *BMPR1B* foi relatada pela primeira vez em ovinos da raça Merino Booroola (*FecB<sup>B</sup>*), onde verificou-se que uma mutação de glutamina para arginina na posição 249 (Q249R) estava associada ao aumento a taxa de ovulação e o tamanho da ninhada em ovelhas (Mulsant et al., 2001; Souza et al., 2001; Wilson et al., 2001).

Chu et al. (2007), avaliaram ovelhas chinesas da raça Han de cauda curta e foi possível detectar a mesma mutação *FecB* (Q249R) do gene *BMPR1B* encontrado em ovelhas Merino Booroola, assim como, para a mutação *FecX<sup>G</sup>* (Q239Ter) da *BMP15* encontradas nas ovelhas de raças Belclare e Cambridge. Além disso, essas ovelhas portadoras de mutações nos genes *BMPR1B* e *BMP15* apresentaram maior tamanho da ninhada do que aqueles com qualquer mutação isolada. Sugerindo nesse caso que a interação desses genes pode ter efeitos superiores quando comparado com a ação única de um desses genes.

Zuo et al. (2013) realizaram estudos com ovelhas chinesas da raça Bayanbulak, no presente trabalho foram estudados pela primeira vez 10 loci de mutações de 3 genes candidatos de alta fertilidade. Os resultados mostraram que dois loci de mutações genéticas, o gene *BMP1B* (*FecB*) e *GDF9* (*FecG*) estavam presente em ovelhas Bayanbulak e associadas a fertilidade, sendo que nenhuma mutação no gene *BMP15* foi descoberta.

Em caso semelhante Roy et al. (2011) rastream bases genéticas de alta prolificidade (*BMP1B*, *BMP15* e *GDF9*) em ovelhas indianas da raça Bonpala. As mutações encontradas para o gene *BMP15* foram monomórficas. Este achado está de acordo com um estudo realizado anteriormente por Polley et al. (2010) com ovelhas indianas da raça Garole. Essas duas raças de ovelhas são prolíficas, mas foram encontradas monomórficas para o gene *BMP15*. No entanto foram encontrados polimorfismos para os genes *BMP1B* e *GDF9*, corroborando com os resultados de Zuo et al. (2013) que também relataram mutações coexistentes em dois genes de fecundidade diferentes.

Abdoli et al. (2013), também relataram fragmentos de genes *BMP1B* na população de ovelhas da raça iraniana Mehraban. Da mesma forma, Mahdavi et al. (2014) em resultados preliminares indicaram que a mutação do tamanho da ninhada foi afetada pelo *BMP1B*, em ovelhas iranianas da raça Kalehkoohi. As ovelhas Kalehkoohi que tiveram a mutação *FecB* tinham maior tamanho da ninhada do que as ovelhas nativas, levando em consideração que a raça Kalehkoohi é classificada como raça exótica.

Sudhakar et al. (2013), também observaram em ovelhas indianas da raça Nilagiri a mutação *FecB*. Com isso os autores relataram a importância desse achado, no intuito que permitirá estratégias de reprodução para ser adotado para melhorar ainda mais a prolificidade da raça Nilagiri.

Em contraste, Bodin et al. (2007) realizaram estudo com ovelhas da raça Lacaune e não foi possível encontrar o alelo *FecB* no gene *BMP1B*. Assim como Holanda et al. (2017), que realizou um estudo com o objetivo de detectar o polimorfismo no gene *BMP1B* (*FecB<sup>B</sup>*) e *BMP15* (*FecX<sup>G</sup>* e *FecX<sup>L</sup>*) em ovelhas das raças Santa Inês e Morada Nova, que têm uma importância considerável na produção brasileira, no entanto, houve ausência para todas as mutações supracitadas.

### 3.2 Proteína Morfogenética Óssea 15 (*BMP15*)

O gene proteína morfogenética óssea 15 (*BMP15*) em ovinos é transportado pelo cromossomo X e é conhecido como *FecX* (gene da fecundidade X) (Lassoued et al., 2017). Esse gene foi relatado pela primeira vez associado ao aumento da taxa de ovulação em ovelhas das raças Hanna (*FecX<sup>H</sup>*) e Inverdale (*FecX<sup>L</sup>*) (Galloway et al., 2000). Para a raça Hanna, uma glutamina na posição 291 foi substituída por um codão de parada prematura (Q291X), enquanto na ovelha da raça Inverdale um resíduo de valina na posição 299 foi substituído por ácido aspártico (V299D) (Våge et al., 2013).

Em estudo posteriores Hanrahan et al. (2004), observaram mais duas mutações adicionais em ovelhas das raças Cambridge e Belclare que afetaram a taxa de ovulação, onde relataram uma substituição de glutamina com um codão de parada prematuro na posição 239 (Q239X) (*FecX<sup>G</sup>*) e uma mudança de serina para isoleucina na posição 367 (S367I) (*FecX<sup>B</sup>*).

A linhagem da raça Inverdale carrega uma mutação X (*FecX<sup>L</sup>*), ligada a uma ocorrência natural que promove aumento na taxa de ovulação, partos gemelinos e triplos em ovelhas heterozigotas (*FecX<sup>L</sup>/FecX<sup>+</sup>*) (Bedhiah-Romdhani et al., 2008), mas insuficiência ovariana primária em ovelhas homozigotas (*FecX<sup>L</sup>/FecX<sup>L</sup>*) (Mulsant et al., 2001). O desenvolvimento das células germinativas, a formação do folículo e os primeiros estágios do crescimento folicular são normais nas ovelhas *FecX<sup>L</sup>/FecX<sup>L</sup>*, mas o desenvolvimento folicular além do estágio primário é prejudicado (Lassoued et al., 2017).

Outra linhagem que tem o mesmo fenótipo é as ovelhas da raça Hanna (*FecX<sup>H</sup>*), no entanto de acordo Galloway et al. (2000), o cruzamento entre animais *FecX<sup>L</sup>* com animais *FecX<sup>H</sup>*, produziram fêmeas inférteis e que fenotipicamente *FecX<sup>L</sup>/FecX<sup>H</sup>* é indistinguível das fêmeas *FecX<sup>L</sup>/FecX<sup>L</sup>*.

Nesse sentido vários estudos vêm sendo realizados, com intuito de encontrar genes prolíferos em diversas raças em diferentes partes do mundo (Tabela 1). Como descrito por (El-Seedy et al., 2017), os genes da fecundidade representaram a oportunidade única de adicionar um alto nível de prolificidade às ovelhas que se encaixam bem no ambiente, sem ter que adicionar características indesejáveis de outras raças, sendo que esses genes demonstram ser rastreáveis e persistentes após sua introdução a uma raça.

Na população da raça Lacaune, Bodin et al. (2007) suspeitaram a presença de um gene importante em um rebanho de ovelhas que apresentaram altos índices de prolificidade. Para validar essa hipótese, eles buscaram mutações nos genes *BMP15*, *GDF9* e *BMP1B* já conhecidos por estarem implicados no controle da taxa de ovulação em ovinos. Sendo que nesse estudo foi possível descrever a caracterização fenotípica e molecular de uma nova mutação C53Y identificada no gene *BMP15* em ovelhas da raça Lacaune, chamado *FecX<sup>L</sup>*.

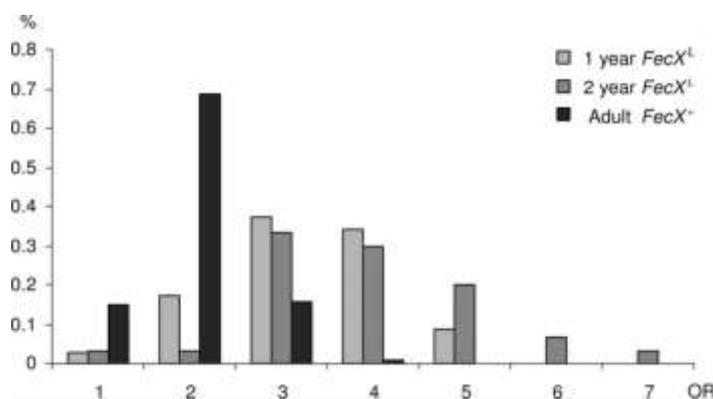
**Tabela 1.** Estudos realizados com genes prolíferos em ovinos (*BMP15/FecX*).

Raça	Genes	Origem	Referências
Romney	<i>FecX<sup>L</sup></i> / <i>BMP15</i> <sup>c893T&gt;A</sup> e <i>FecX<sup>H</sup></i> / <i>BMP15</i> <sup>c871C&gt;T</sup>	Nova Zelândia	(Hanrahan et al., 2004)
Lacaune	<i>FecX<sup>L</sup></i> / <i>BMP15</i> <sup>c962G&gt;A</sup>	França	(Bodin et al., 2007)
Rasa Aragonesa	<i>FecX<sup>R</sup></i> / <i>BMP15</i> <sup>c455_471del</sup>	Espanha	(Martinez-Royo et al., 2008; Monteagudo et al., 2009)
Barbarine	<i>FecX<sup>Bar</sup></i> / <i>BMP15</i> <sup>c.301-310</sup>	Tunísia	(Lassoued et al., 2017)

Fonte: Autores.

Para provar que o alelo *FecX<sup>L</sup>* estava associado ao aumento na taxa de ovulação, as ovelhas transportadoras dos genes heterozigotas e homozigotas foram procriadas. A taxa média de ovulação registrada para as 12 ovelhas heterozigotas foi de 3,29 e 3,93 para o primeiro e segundo ano, respectivamente (Figura 1). No total, 8,4% das ovulações eram de partos gemielinos e 89% eram de partos triplos ou mais. Como todas as filhas de carneiros portadores eram heterozigotas, não era possível comparar as ovelhas portadoras e não portadoras no mesmo plano genético. No entanto, a taxa média de ovulação (152 registros) do *FecX<sup>L</sup>* nas ovelhas da raça Lacaune não portadoras registradas no mesmo local em condições semelhantes era de 1,95, com 68% de ovulações para partos gemielinos e apenas 16% para partos triplos ou mais. Supondo que, quando presente no estado heterozigoto, o alelo *FecX<sup>L</sup>* é capaz de aumentar a taxa de ovulação nas ovelhas.

**Figura 1.** Distribuição dos números de ovulação de 12 ovelhas *FecX<sup>L</sup>* heterozigotas de 1 e 2 anos de idade, e de 52 ovelhas *FecX<sup>+</sup>* adultas.



Fonte: Bodin et al. (2007).

Através de programas de seleção na Espanha, foi constatado um aumento considerável na prolificidade da raça Aragonesa, o que levou a suspeita de que existia genes com efeitos importantes sobre a prolificidade. Em virtude disso

Martinez-Royo et al. (2008), realizou um estudo onde foi possível relatar um novo alelo em ovinos atrelado ao gene *BMP15*, nomeado *FecX<sup>R</sup>*. Com isso, esse respectivo alelo adere ao número de mutações naturais encontradas no *BMP15*, gene que, como descrito por Bodin et al. (2007) tem sido associado com alta prolificidade ou esterilidade, dependendo da sua presença no estado heterozigoto ou homozigoto, respectivamente.

Em estudo semelhante Monteaguedo et al. (2009), também realizaram um trabalho visando buscar possíveis mutações no loci *BMP15* associado à maior prolificidade em ovelhas da raça Aragonesa. E os resultados encontrados foram positivamente relacionados ao aumento dos índices de prolificidade na raça Aragonesa. Nesse sentido, essa nova mutação pode ser uma ferramenta importante na melhoria da prolificidade dessa raça.

Por outro lado, Lassoued et al. (2017), avaliaram ovelhas egípcias das raças Barki, Ossimi e Rahmani, e descreveram que a taxa de fertilidade não está relacionada as mutações no loci *BMP15* (*FecX<sup>G</sup>* e *FecX<sup>B</sup>*), uma vez que estavam ausentes em seus genomas. Resultados semelhantes também foram observados por El-Seedy et al. (2017), onde não foram observados genes associados ao *BMP15* para as raças ovinas Baraki e Rahmani. Assim como estudo conduzido por Polley et al. (2010), onde nenhum polimorfismo foi detectado no gene *BMP15*.

### 3.3 Factor de Diferenciação de Crescimento 9 (*GDF9*)

Como relatado anteriormente, os genes *GDF9* é um dos polimorfismos mais prevalente na superfamília  $\beta$  do crescimento transformante (*TGF $\beta$* ), direcionados a prolificidade em ovinos.

Hanrahan et al. (2004), realizaram estudos com ovelhas irlandesas das raças Cambridge e Belclare e examinaram os dados da taxa de ovulação que estavam disponíveis para as ovelhas das raças puras e férteis que tinham sido identificadas com mutações para o gene *FecG<sup>H</sup>* e, relataram que essa mutação aumentou significativamente a taxa de ovulação. Ocorrendo o inverso em relação as ovelhas homozigotas, onde todas eram estéreis para a mutação *FecG<sup>H</sup>*. Nesse estudo verificou-se também que a substituição da serina por fenilalanina na posição 395 (S395F) (*FecG<sup>H</sup>*) estava associada ao aumento da taxa de ovulação.

Esses achados forneceram a primeira evidência de que a mutação *GDF9* está associado aos efeitos reprodutivos observados nas raças ovinas Cambridge e Belclare. Sendo que, o aumento da taxa de ovulação e a esterilidade desses animais pode ser explicado pela presença de mutações heterozigotas e homozigotas para esse gene.

Nicol et al. (2009), realizaram estudos com ovelhas islandesas da raça Thoka e encontraram a mutação *GDF9*. A mutação relatada produziu uma alteração em um aminoácido não conservante na posição 109 dentro da região de codificação madura (S109R), que pode afetar a função da proteína. Essa mutação é diferente da relatada no gene *GDF9* por Hanrahan et al. (2004), em ovinos da raça Belclare e Cambridge (*FecG<sup>H</sup>*), que produziu uma substituição de aminoácidos não conservante na posição 77 da proteína madura (S77F). Essa mutação também resultou em esterilidade em ovelhas homozigotas e fertilidade em ovelhas heterozigotas, demonstrando que o *GDF9* é necessário para a foliculogênese.

Souza et al. (2014), descreveram o polimorfismo *GDF9* em ovinos da raça Ile de France criados na região sul do Brasil, ao qual foi nomeado de Vacaria (*FecG<sup>V</sup>*). De acordo esses autores, esse polimorfismo é uma transição de C para T na base 943 do quadro de leitura (c.943C>T) e causa aumento na taxa de ovulação e tamanho da ninhada em ovelhas heterozigotas e infertilidade em ovelhas homozigotas. Nesse estudo também foi observado hipoplasia nos ovários homozigotos do *FecG<sup>V</sup>*, semelhante aos resultados encontrado por Hanrahan et al. (2004) e Nicol et al. (2009), sugerindo que o fator uterotrófico segregado pelo ovário no período neonatal é produzido pelos folículos em desenvolvimento que são inibidos pelo processamento inadequado do *GDF9* maduro nos cordeiros ovinos portadores do gene *FecG<sup>V</sup>*.

Da mesma forma, Barakat et al. (2017) avaliando polimorfismos relativos ao gene *GDF9* (*FecG<sup>7</sup>* e *FecG<sup>H</sup>*) em ovelhas egípcias das raças Barki, Ossimi e Rahmani, demonstraram que a maioria dos animais testados era do genótipo

heterozigoto e apresentava alta taxa de fertilidade. Esses resultados divergem dos observados por El-Seedy et al. (2017), onde relataram que ovelhas das raças Barki e Rahmani obtiveram ausência absoluta do gene *FecG*.

Essas divergências de resultados podem estar associadas a diferenças na estrutura genéticas dessas raças, que muitas das vezes é devido aos cruzamentos com genótipos diferentes ou localização geográfica. Com isso, podem ocorrer variação na diversidade genética, dentro de uma determinada população ou entre populações. Por exemplo, sabemos que a raça Merino Booroola é reconhecida mundialmente com uma raça efetivamente prolífera, com isso seus cruzamentos com determinada raça em maior ou menor escala através do genótipo e ambiente podem determinar seu fenótipo final.

Trabalhos realizados por Polley et al. (2010) demonstraram que o gene *FecG* têm consequências importantes na taxa de ovulação e na fecundidade de ovelhas indianas da raça Garole. Kasiriyani et al. (2011), avaliaram a raça ovina iraniana da raça Sangsari e observaram que as mutações *GDF9* aumentaram as taxas de ovulação. Abdoli et al. (2013), também relataram o gene *GDF9* na população de ovelhas iranianas da raça Mehraban.

### 3.4 Fertilidade em Ovelhas Homozigotas

De acordo Hanrahan et al. (2004), todas as mutações conhecidas como *BMP15* (*FecX*) produz o mesmo fenótipo em ovelhas, ou seja, fêmeas heterozigotas são altamente prolíferas enquanto as fêmeas homozigotas são inférteis, devido a um bloqueio no desenvolvimento folicular na fase primária.

A variante genética associada a via *BMP1B* (*FecB*) que é segregada na raça Merino Booroola apresenta um efeito aditivo na taxa de ovulação e um efeito parcialmente dominante sobre o tamanho da ninhada (Wilson et al., 2001). Para *GDF9* (*FecG*), as mutações descritas apresentam um padrão de herança fenotípica semelhante a todas as variantes *BMP15* (Nicol et al., 2009), ou seja, ovelhas heterozigotas são altamente prolíferas, enquanto as ovelhas homozigotas são inférteis.

Para fêmeas adultas homozigotas *FecX<sup>L</sup>*, Bodin et al. (2007) em observações laparoscópicas mostraram um trato genital infantil e os ovários não apresentavam estruturas foliculares óbvias, assemelhando-se ao fenômeno observado em ovelhas homozigotas das raças Inverdale (*FecX<sup>L</sup>*), Hanna (*FecX<sup>H</sup>*) e Lacaune (*FecX<sup>L</sup>*) (McNatty et al., 2005). Onde os genes *FecX<sup>L</sup>/FecX<sup>L</sup>* apresentaram ovários com folículos subdesenvolvidos, além do estágio primário de desenvolvimento, justificando a esterilidade desses animais.

Resultados semelhantes também foram encontrados por Martinez-Royo et al. (2008) e Lassoued et al. (2017), onde avaliaram as raças Aragonesa e Barbarine, respectivamente. Como descrito por Lassoued et al. (2017), ovelhas homozigotas os ovários são densamente colonizados por folículos primordiais primários, onde muitos desses folículos primários foram anormalmente constituídos por oócitos grandes com zona pelúcida grossa, cercada por camadas de células de granulosa desorganizadas. Chegando à conclusão de que, os genes homozigotas *FecX* em ovelhas mutadas são estéreis devido ao bloqueio prematuro no estágio primário da foliculogênese.

Sobre o gene *FecG*, os resultados encontrados assemelham-se ao *FecX*, onde Kasiriyani et al. (2011), relataram que as ovelhas homozigotas da raça Sangsari eram estéreis devido a uma falha normal no desenvolvimento folicular ovariano. Curiosamente Silva et al. (2011), mostrou pela primeira vez um novo fenótipo *GDF9* nomeado *FecG<sup>E</sup>* (Emprapa) associada à prolificidade em ovelhas homozigotas da raça brasileira Santa Inês, uma vez que as ovelhas homozigotas do gene *FecG<sup>E</sup>* não eram estéreis. Os resultados demonstraram que as ovelhas homozigotas que apresentaram esse novo alelo, leva uma substituição de uma fenilalanina com uma cisteína em uma posição conservadora do peptídeo maduro. Com isso, as ovelhas homozigotas apresentando o alelo *FecG<sup>E</sup>* mostraram um aumento na taxa de ovulação (82%) e prolificidade (58%). Para os autores supracitados esse novo fenótipo pode ser útil para melhor compreensão do controle genético no desenvolvimento folicular, no entanto, é necessária uma investigação mais aprofundada para esclarecer as interações alélicas da variante *FecG<sup>E</sup>*.

Våge et al. (2013) avaliando um estudo de associação genômica para o tamanho da ninhada em ovelhas da raça Branca Norueguesa revelaram um polimorfismo de nucleotídeos único (c.1111G> A), responsável por uma substituição de valina por metionina na posição 371 (V371M). Esse polimorfismo já foi identificado em ovelhas das raças Belclare e Cambridge por Hanrahan et al. (2004), mas não encontraram associado à fertilidade. Sendo que essa população de ovelhas da raça Branca Norueguesa, o polimorfismo de nucleotídeos único C.1111G> A mostrou uma associação forte com o tamanho da ninhada.

As raças de ovelhas francesas Grivette e polonesa Olkuska apresentaram boas características maternas relacionadas ao tamanho da ninhada e taxa de ovulação que são predominantemente elevadas (Demars et al., 2013). Estudo realizado por Davis et al. (2002), relataram que as mutações *FecB<sup>B</sup>* e *FecX<sup>I</sup>* não são responsáveis pelo fenótipo tamanho da ninhada e taxa de ovulação em ovelhas da raça Olkuska. Através dessa suposição Demars et al. (2013), visou identificar variantes genéticas que afetam esses fenótipos nas populações de ovelhas das raças Grivette e Olkuska. Com isso foi possível identificar duas novas mutações não conservativas no gene *BMP15* associadas a um aumento no tamanho da ninhada e taxa de ovulação.

Seguindo a nomenclatura utilizada para os genes da fecundidade anteriores, essas duas mutações foram denominadas *FecX<sup>Gr</sup>* na população de ovelhas da raça Grivette e *FecX<sup>O</sup>* na população de ovelhas da raça Olkuska. As ovelhas homozigotas de ambas as raças foram altamente prolíferas, e não estéril, sendo que esses resultados trazem novas ideias sobre o papel fundamental desempenhado pela proteína *BMP15* na função ovariana, uma vez que esse fenótipo não corrobora com todas as mutações *BMP15* descritas em ovelhas até agora. Isso é plausível, porque todas as variantes *FecX* encontradas, que foram associadas ao aumento no tamanho da ninhada e taxa de ovulação foi observado somente em ovelhas heterozigotas (Tabela 2), sendo que as ovelhas homozigotas eram consideradas estéreis. Assim como o gene *GDF9* (*FecG<sup>E</sup>*), que foi encontrado pela primeira vez por Silva et al. (2011) na raça brasileira Santa Inês.

**Tabela 2.** Trabalhos de pesquisas com genes associados com a fertilidade e esterilidade em ovelhas

Raça	Genes	Origem	Autores
Cambridge e Belclare	<i>FecG<sup>H</sup></i>	Islândia	(Hanrahan et al., 2004)
Lacaune	<i>FecX<sup>L</sup></i>	França	(Bodin et al., 2007)
Rasa Aragonesa	<i>FecX<sup>R</sup></i>	Espanha	(Martinez-Royo et al., 2008)
Sangsari	<i>FecG</i>	Irã	(Kasiriyani et al., 2011)
Barbarine	<i>FecB<sup>Bar</sup></i>	Tunízia	(Lassoued et al., 2017)

Fonte: Autores.

### 3.5 Outros Genes da Prolificidade em Ovinos

Além dos genes principais mencionados, que são utilizados como marcadores que influenciam a prolificidade em ovinos, outros genes relacionados também foram encontrados como polimórficos com efeitos substanciais sobre as características reprodutivas (Tabela 3).

**Tabela 3.** Outros genes associados a prolificidade em ovinos.

Genes	Raças	Origem	Referências
<i>ESR1</i> <sup>1</sup>	Chios, Awassi e White Karaman	Turquia	(Ozmen et al., 2011)
<i>KISS1</i> <sup>2</sup>	Han de cauda curta, Dorset, Texel e Corriedale	China	(Chu et al., 2012)
<i>GPR54</i> <sup>3</sup>	Han de cauda curta, Dorset, Texel e Corriedale	China	(Chu et al., 2012)
<i>POU1F1</i> <sup>4</sup>	Sem raça definida	Índia	(Bastos et al., 2006)
<i>PRLR</i> <sup>5</sup>	Ran de cauda curta	China	(Chu et al., 2007)
<i>FSHR</i> <sup>6</sup>	Chios, Awassi e White Karaman	Turquia	(Ozmen et al., 2011)
<i>NR5A2</i> <sup>7</sup>	Ran de cauda curta	Turquia	(Chu et al., 2012)
	Hu	China	(Li et al., 2015)

<sup>1</sup>Gene do receptor de estrogênio; <sup>2</sup>Gene supressor de metástase; <sup>3</sup>Gene do receptor 54; <sup>4</sup>Factor de transcrição positivo específico da pituitária 1; <sup>5</sup>Gene do receptor de prolactina; <sup>6</sup>Gene do receptor de hormônio foliculo estimulante; <sup>7</sup>Gene da subfamília do receptor nuclear 5, grupo A membro 2. Fonte: Autores.

Esses resultados acima supracitados, podem ser essenciais para a função reprodutiva, com papéis vitais nos diferentes seguimentos da cadeia reprodutiva. Observamos que no decorrer dessa revisão, os genes principais associados a prolificidade resumiu-se basicamente aos genes *BMP1B*, *BMP15* e *NDF9*. Com isso, observa-se que os hormônios esteroides e seus receptores pode nortear e contribuir futuramente para a caracterização das características reprodutivas, que fenotipicamente possui características de baixa a média herdabilidade.

### 3.6 Métodos de Avaliação

As principais características que têm maior efeito sobre o número e o sucesso da prole são a habilidade materna, a fertilidade e a prolificidade (Abdoli et al., 2016). Sobre as duas últimas, devido a sua importância associadas aos genes, pesquisas têm sido voltadas para uma compreensão e nesse sentido os marcadores moleculares têm ganhado ponto de destaque. Isso é coerente em virtude das características reprodutivas, quando comparada com outras características quantitativas como desenvolvimento ponderal, qualidade de carcaça e características produtivas, apresentam baixa herdabilidade.

A aplicação de métodos de reprodução tradicionais, com base em dados fenotípicos, é um processo que consome muito tempo, assim, a genética molecular e a seleção assistida por marcador (MAS) têm uma grande importância para o melhoramento genético da eficiência da reprodução (Abdoli et al., 2013).

Como descrito por Khodabakhshzadeh et al. (2016), várias técnicas moleculares foram usadas para detectar variações gênicas, frequentemente relatado com base na reação em cadeia da polimerase (PCR), seguido de digestão com enzimas de restrição, separação eletroforética (RFLP) e confirmação por sequenciamento. No entanto, esses procedimentos são demorados, exigem três processos sequenciais diferentes e podem ser dispendiosos para diagnósticos de grandes populações (Escobar-Chaparro et al., 2017).

Recentemente, o desenvolvimento de produtos químicos intercalantes de DNA, como SYBR-green e EVA-green, levou ao desenvolvimento extensivo de diferentes técnicas de PCR quantitativa (qPCR) (Schmittgen & Livak, 2008). Na área de diagnósticos, o uso de curvas de fusão de alta resolução (HRM) passou a ser utilizada após qPCR provar ser bem-sucedido para detecção rápida e econômica da variação gênica (Meistertzheim et al., 2012). Resumidamente, essas curvas de HRM são adquiridas quando ampliações de DNA curtos (90 pb) são obtidos com primers flanqueado, e os SNPs de interesse são aquecidos em intervalos de temperatura pequenos e constantes até serem desnaturados, momento em que o produto químico de intercalação é liberado, enviando menos sinal fluorescente para um detector e traçando esta diminuição contra o aumento de temperatura (Reed et al., 2007).

Visando avaliar esse método baseado em qPCR e curvas de fusão de alta resolução para detectar diferentes polimorfismos no gene associado à prolificidade, o *GDF9*, Escobar-Chaparro et al. (2017), conseguiram detectar todas as variantes associadas a esse gene e criar um relatório de frequência alélica a ser usado para desenvolver uma estratégia de

reprodução em ovelhas. Sendo que ele se mostrou eficiente e econômico quando comparado às metodologias tradicionais, como o PCR-RFLP. No futuro, pode ser facilmente escalável para estudos maiores destinados a conservar a diversidade genética de populações e a identificar indivíduos de elite.

Abdoli et al. (2013), comparando aplicação de tecnologias de DNA molecular PCR-RFLP e PCR-SSCP na identificação das mutações dos genes *BMP1B* e *GDF9* em ovelhas iranianas, foi possível concluir que o uso da técnica PCR-SSCP, juntamente com o sequenciamento de DNA, pode ser considerado como um método mais eficiente em comparação com PCR-RFLP. Mahdavi et al. (2014), também consideraram os resultados através da MAS focada no gene *BMP1B* em ovelhas iranianas da raça Kolehkoobi como eficiente na avaliação da prolificidade.

Os efeitos dos genes da prolificidade também foram detectados em estudos de associação de genoma-geral (GWAS). Uma mutação missense (c.1111G> A) na parte bioativa da proteína *GDF9* com forte associação com o tamanho da ninhada foi detectada em ovelhas da raça Branca Norueguesa através do GWAS (Våge et al., 2013). De acordo Abdoli et al. (2016), a expressão fenotípica de um alelo é, em certa medida, dependente de outros alelos, principalmente mutações interativas múltiplas, e, portanto, um efeito fenotípico de um alelo pode ser observado em uma raça enquanto estiver ausente em outra.

Demars et al. (2013), também utilizaram o GWAS em ovelhas das raças Grivette e Olkuska e foi possível mostrar uma região do cromossomo X próximo ao gene *BMP15*, com provas sugestivas de associação. Nesse estudo, o sequenciamento do gene *BMP15* mostrou duas novas mutações chamadas *FecX<sup>Gr</sup>* e *FecX<sup>O</sup>*, responsáveis pelo fenótipo altamente prolífero dessas duas raças, respectivamente.

Em um estudo realizado por Gholizadeh et al. (2014), o GWAS foi conduzido para detectar locus de características quantitativas (QTLs) para a taxa prolificidade. Uma série de marcadores foram associados significativamente, onde sugeriram três regiões QTLs diferentes nos cromossomos 10 e 15 em ovelhas iranianas da raça Baluchi. Para esses autores, essa nova descoberta dos fragmentos envolvidos na prolificidade ovina nesta região é outra evidência da natureza genética complexa para prolificidade em ovinos.

Além disso, Miao & Qin (2015) em uma análise transcriptoma GWAS de mRNAs e microRNAs em ovelhas das raças Dorset e Han de cauda curta trouxeram genes diferencialmente expressos entre cada um dos grupos e o perfil de miRNA identificou miARNs específicos para cada grupo, o que pode desempenhar um papel no controle do desempenho reprodutivo.

#### 4 Considerações Finais

A capacidade reprodutiva tem um papel importante na rentabilidade da cadeia produtiva em ovinos. Existem mutações em diferentes genes com efeitos importantes sobre as características de desempenho reprodutivo, como a taxa de ovulação e o tamanho da ninhada em diferentes raças de ovelhas em todo o mundo. O conhecimento dos genes envolvidos na taxa de ovulação e no tamanho da ninhada e seus efeitos fornece informações úteis para a reprodução e seleção sobre essas características. Portanto, é necessário procurar novas mutações com efeitos positivos sobre a prolificidade em diferentes raças e populações. Além disso, novas tecnologias são necessárias para identificar as características desses genes com maior nível de eficiência.

#### Referências

- Abdoli, R., Zamani, P., Deljou, A., & Rezvan, H. (2013). Association of BMP1B and GDF9 genes polymorphisms and secondary protein structure changes with reproduction traits in Mehraban ewes. *Gene*, 524(2), 296–303. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.133>
- Abdoli, R., Zamani, P., Mirhoseini, S. Z., Ghavi Hossein-Zadeh, N., & Nadri, S. (2016). A review on prolificacy genes in sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(5), 631–637. <https://doi.org/10.1111/rda.12733>
- Ahmad, H. I., Liu, G., Jiang, X., Edallem, S. G., Wassie, T., Tesema, B., Yun, Y., Pan, L., Liu, C., Chong, Y., Yu, Z. J., & Jilong, H. (2017). Maximum-likelihood approaches reveal signatures of positive selection in BMP15 and GDF9 genes modulating ovarian function in mammalian female fertility. *Ecology*

and Evolution, July, 8895–8902. <https://doi.org/10.1002/ece3.3336>

- Barakat, I. A. H., Salem, L. M., Daoud, N. M., Khalil, W. K. B., & Mahrous, K. F. (2017). Genetic polymorphism of candidate genes for fecundity traits in Egyptian sheep breeds. *Biomedical Research (India)*, 28(2), 851–857
- Bastos, E., Ávila, S., Cravador, A., Renaville, R., Guedes-Pinto, H., & Luis Castrillo, J. (2006). Identification and characterization of four splicing variants of ovine POU1F1 gene. *Gene*, 382, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.05.028>
- Bedhiaf-Romdhani, S., Djemali, M., Zaklouta, M., & Iniguez, L. (2008). Monitoring crossbreeding trends in native Tunisian sheep breeds. *Small Ruminant Research*, 74(1–3), 274–278. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.07.008>
- Bodin, L., Di Pasquale, E., Fabre, S., Bontoux, M., Monget, P., Persani, L., & Mulsant, P. (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(1), 393–400. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0764>
- Ceko, M. J., Hummitzsch, K., Hatzirodos, N., Bonner, W. M., Aitken, J. B., Russell, D. L., Lane, M., Rodgers, R. J., & Harris, H. H. (2015). X-Ray fluorescence imaging and other analyses identify selenium and GPX1 as important in female reproductive function. *Metallomics*, 7(1), 71–82. <https://doi.org/10.1039/c4mt00228h>
- Chu, M. X., Liu, Z. H., Jiao, C. L., He, Y. Q., Fang, L., Ye, S. C., Chen, G. H., & Wang, J. Y. (2007). Mutations in BMPR-IB and BMP-15 genes are associated with litter size in Small Tailed Han sheep (*Ovis aries*). *Journal of Animal Science*, 85(3), 598–603. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-324>
- Chu, M., Xiao, C., Feng, T., Fu, Y., Cao, G., Fang, L., Di, R., Tang, Q., Huang, D., Ma, Y., Li, K., & Li, N. (2012). Polymorphisms of KiSS-1 and GPR54 genes and their relationships with litter size in sheep. *Molecular Biology Reports*, 39(3), 3291–3297. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1097-3>
- Davis, G. H., Galloway, S. M., Ross, I. K., Gregan, S. M., Ward, J., Nimbkar, B. V., Ghalsasi, P. M., Nimbkar, C., Gray, G. D., Subandriyo, Inounu, I., Tiesnamurti, B., Martyniuk, E., Eythorsdottir, E., Mulsant, P., Lecerf, F., Hanrahan, J. P., Bradford, G. E., & Wilson, T. (2002). DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation. *Biology of Reproduction*, 66(6), 1869–1874. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.6.1869>
- Demars, J., Fabre, S., Sarry, J., Rossetti, R., Gilbert, H., Persani, L., Tossier-Klopp, G., Mulsant, P., Nowak, Z., Drobik, W., Martyniuk, E., & Bodin, L. (2013). Genome-Wide Association Studies Identify Two Novel BMP15 Mutations Responsible for an Atypical Hyperprolificacy Phenotype in Sheep. *PLoS Genetics*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003482>
- Dias, F. C. F., Khan, M. I. R., Adams, G. P., Sirard, M. A., & Singh, J. (2014). Granulosa cell function and oocyte competence: Super-follicles, super-moms and super-stimulation in cattle. *Animal Reproduction Science*, 149(1–2), 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.07.016>
- El-Seedy, A. S., Hashem, N. M., El-Azrak, K. M., Nour El-Din, A. N. M., Ramadan, T. A., Taha, T. A., & Salem, M. H. (2017). Genetic screening of FecB, FecXG and FecXI mutations and their linkage with litter size in Barki and Rahmani sheep breeds. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(6), 1133–1137. <https://doi.org/10.1111/rda.13002>
- Escobar-Chaparro, R. A., Guillén, G., Espejo-Galicia, L. U., Meza-Villalvazo, V. M., Peña-Castro, J. M., & Abad-Zavaleta, J. (2017). qPCR and HRM-based diagnosis of SNPs on growth differentiation factor 9 (GDF9), a gene associated with sheep (*Ovis aries*) prolificacy. *3 Biotech*, 7(3). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0837-z>
- Galloway, S. M., McNatty, K. P., Cambridge, L. M., Laitinen, M. P. E., Juengel, J. L., Jokiranta, T. S., McLaren, R. J., Luro, K., Dodds, K. G., Montgomery, G. W., Beattie, A. E., Davis, G. H., & Ritvos, O. (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics*, 25(3), 279–283. <https://doi.org/10.1038/77033>
- Gholizadeh, M., Rahimi-Mianji, G., Nejati-Javaremi, A., De Koning, D. J., & Jonas, E. (2014). Genomewide association study to detect QTL for twinning rate in Baluchi sheep. *Journal of Genetics*, 93(2), 489–493. <https://doi.org/10.1007/s12041-014-0372-1>
- Hanrahan, J. P., Gregan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R., & Galloway, S. M. (2004). Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*, 70(4), 900–909. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.023093>
- Kasiriyani, M. M., Hafezian, S. H., & Hassani, N. (2011). Genetic polymorphism BMP15 and GDF9 genes in Sangsari sheep of Iran. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, 3(1), 31–34
- Khodabakhshzadeh, R., Mohammadabadi, M. R., Esmailzadeh, A. K., Moradi Shahrehabak, H., Bordbar, F., & Ansari Namin, S. (2016). Identification of point mutations in exon 2 of GDF9 gene in Kermani sheep. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 19(2), 281–289. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0035>
- Lassoued, N., Benkhilil, Z., Woloszyn, F., Rejeb, A., Aouina, M., Rekik, M., Fabre, S., & Bedhiaf-Romdhani, S. (2017). FecX Bar a Novel BMP15 mutation responsible for prolificacy and female sterility in Tunisian Barbarine Sheep. *BMC Genetics*, 18(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0510-x>
- Li, Y. X., Zhang, J., Qian, Y., Meng, C. H., Wang, H. L., Tao, X. J., Zhong, S., Cao, S. X., & Li, Q. F. (2015). Molecular characterization, expression, polymorphism of NR5A2 and its relationship with litter size in Hu sheep. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 12765–12775. <https://doi.org/10.4238/2015.October.19.20>
- Mahdavi, M., Nanekarani, S., & Hosseini, S. D. (2014). Mutation in BMPR-IB gene is associated with litter size in Iranian Kalehkoohi sheep. *Animal Reproduction Science*, 147(3–4), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.04.003>
- Martinez-Royo, A., Jurado, J. J., Smulders, J. P., Martí, J. I., Alabart, J. L., Roche, A., Fantova, E., Bodin, L., Mulsant, P., Serrano, M., Folch, J., & Calvo, J. H. (2008). A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. *Animal Genetics*, 39(3), 294–297. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01707.x>
- McNatty, K. P., Galloway, S. M., Wilson, T., Smith, P., Hudson, N. L., O’Connell, A., Bibby, A. H., Heath, D. A., Davis, G. H., Hanrahan, J. P., & Juengel, J.

- L. (2005). Physiological effects of major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics Selection Evolution*, 37(SUPPL. 1), 25–38. <https://doi.org/10.1051/gse:2004029>
- Meistertzheim, A.-L., Meistertzheim, A.-L., Calves, I., Artigaud, S., Friedman, C. S., Paillard, C., Laroche, J., & Ferec, C. (2012). High Resolution Melting Analysis for fast and cheap polymorphism screening of marine populations. *Protocol Exchange*. <https://doi.org/10.1038/protex.2012.015>
- Miao, X., & Qin, Q. L. X. (2015). Genome-wide transcriptome analysis of mRNAs and microRNAs in Dorset and Small Tail Han sheep to explore the regulation of fecundity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 402, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.12.023>
- Moghadaszadeh, M., Mohammadabadi, M., & Koshkoieh, A. E. (2015). Association of exon 2 of BMP15 gene with the litter size in the Raini Cashmere goat. *Genetics in the Third Millennium*, 13(3), 4062–4067
- Monteagudo, L. V., Ponz, R., Tejedor, M. T., Laviña, A., & Sierra, I. (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(1–2), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.01.005>
- Mulsant, P., Lecerf, F., Fabre, S., Schibler, L., Monget, P., Lanneluc, I., Pisselet, C., Riquet, J., Monniaux, D., Callebaut, I., Cribiu, E., Thimonier, J., Teyssier, J., Bodin, L., Cognié, Y., Chitour, N., & Elsen, J. M. (2001). Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Mérimo ewes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(9), 5104–5109. <https://doi.org/10.1073/pnas.091577598>
- Nicol, L., Bishop, S. C., Pong-Wong, R., Bendixen, C., Holm, L. E., Rhind, S. M., & McNeilly, A. S. (2009). Homozygosity for a single base-pair mutation in the oocyte-specific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep. *Reproduction*, 138(6), 921–933. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0193>
- Ozmen, O., Seker, I., Ertugrul, O., Ozkan, E., & Tekin, N. (2011). Prolactin receptor (PRLR) gene polymorphism in Chios, White Karaman and Awassi sheep breeds. *Archives Animal Breeding*, 54(4), 381–390. <https://doi.org/10.5194/aab-54-381-2011>
- Polley, S., De, S., Brahma, B., Mukherjee, A., P.V., V., Batabyal, S., Arora, J. S., Pan, S., Samanta, A. K., Datta, T. K., & Goswami, S. L. (2010). Polymorphism of BMPR1B, BMP15 and GDF9 fecundity genes in prolific Garole sheep. *Tropical Animal Health and Production*, 42(5), 985–993. <https://doi.org/10.1007/s11250-009-9518-1>
- Reed, G. H., Kent, J. O., & Wittwer, C. T. (2007). High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, 8(6), 597–608. <https://doi.org/10.2217/14622416.8.6.597>
- Roy, J., Polley, S., De, S., Mukherjee, A., Batabyal, S., Pan, S., Brahma, B., Datta, T. K., & Goswami, S. L. (2011). Polymorphism of fecundity genes (fecb, fecx, and fecg) in the indian bonpala sheep. *Animal Biotechnology*, 22(3), 151–162. <https://doi.org/10.1080/10495398.2011.589239>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Silva, B. D. M., Castro, E. A., Souza, C. J. H., Paiva, S. R., Sartori, R., Franco, M. M., Azevedo, H. C., Silva, T. A. S. N., Vieira, A. M. C., Neves, J. P., & Melo, E. O. (2011). A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. *Animal Genetics*, 42(1), 89–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02078.x>
- Souza, C. J. H., MacDougall, C., Campbell, B. K., McNeilly, A. S., & Baird, D. T. (2001). The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. *Journal of Endocrinology*, 169(2), 3–8. <https://doi.org/10.1677/joe.0.169R001>
- Souza, C. J. H., McNeilly, A. S., Benavides, M. V., Melo, E. O., & Moraes, J. C. F. (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. <https://doi.org/10.1111/age.12190>
- Sudhakar, A., Rajendran, R., & Rahumathulla, P. S. (2013). Detection of Booroola (FecB) mutation in Indian sheep--Nilagiri. *Small Ruminant Research*, 113(1), 55–57. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.02.012>
- Våge, D. I., Husdal, M., Kent, M. P., Klemetsdal, G., & Boman, I. A. (2013). A missense mutation in growth differentiation factor 9 (GDF9) is strongly associated with litter size in sheep. *BMC Genetics*, 14, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-1>
- Wilson, T., Wu, X. Y., Juengel, J. L., Ross, I. K., Lumsden, J. M., Lord, E. A., Dodds, K. G., Walling, G. A., McEwan, J. C., O'Connell, A. R., McNatty, K. P., & Montgomery, G. W. (2001). Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 64(4), 1225–1235. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.4.1225>
- Zuo, B., Qian, H., Wang, Z., Wang, X., Nisa, N., Bayier, A., Ying, S., Hu, X., Gong, C., Guo, Z., & Wang, F. (2013). A study on BMPR-IB genes of Bayanbulak sheep. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26(1), 36–42. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12238>