

Identifikasi Mutasi Gen *Bmpr-1b* dan *Bmp15* pada Domba Ekor Gemuk

MASKUR¹ dan CHAIRUSSYUHUR ARMAN²

Laboratorium Pemuliaan¹ dan Laboratorium Reproduksi Ternak²
Jurusan Ilmu Produksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Mataram
Jalan Majapahit No. 62 Mataram 83125

(Diterima dewan redaksi 8 Desember 2009)

ABSTRACT

MASKUR and C. ARMAN. 2010. Identification of *Bmpr-1b* and *Bmp15* gene mutations in fat tail sheep. *JITV* 15(1): 16-21.

Fat tail sheep (FTS) is regarded as highly prolific local sheep and have been well adapted under tropical climate of Lombok island. *BMPR-1B* and *BMP15* genes that control reproductive traits such as ovulation rate and litter size in different type of sheep will be studied as candidate genes for prolific traits in FTS. These genes have been reported by various investigators have different prolificacy mechanism between several breeds of sheep, and it is very likely will occur in FTS. This study was designed to understand different prolificacy mechanism that occurred among breed of sheep. One hundred and forty FTS potential for twin and triplet scattered in Lombok Island, West Nusa Tenggara Province were screened to identify mutation of *BMPR-1B* and *BMP15* genes using Forced PCR-RFLP method. Furthermore, the frequency of allele and genotype caused by mutation was measured in each gene. Results of the study indicated that mutation of *FecX^G* at *BMP15* gene resulted in two alleles, namely "wild-type"(+) Allele was 111 bp and 30 bp, and mutant allele (*G*) was 141 bp with frequency of 0.675 and 0.325. The combination of allele at *BMP15* gene resulted in two genotypes, namely: ++ (111 bp/111 bp) and *G*+ (141 bp/111 bp) with frequency of 0.35 and 0.65 in FTS. Mutation of *FecB* at *BMPR-1B* gene resulted in two alleles, namely "wild-type"(+) Allele was 140 bp, and mutant allele (*B*) was 110 and 30 bp with frequency of 0.718 and 0.282. The combination of allele at *BMPR-1B* gene resulted in three genotypes, namely: *BB* (110 bp/110 bp), *B*+ (110 bp/140 bp), and ++ (140 bp/140 bp), its frequency was 0.11, 0.35 and 0.54 in FTS, respectively.

Key words: Mutation, *BMPR-1B*, *BMP15*, Fat Tailed, Sheep

ABSTRAK

MASKUR dan C. ARMAN. 2010. Identifikasi mutasi gen *Bmpr-1b* dan *Bmp15* pada domba ekor gemuk. *JITV* 15(1): 16-21.

Domba ekor gemuk (DEG) merupakan domba lokal yang memiliki sifat prolifrik tinggi dan beradaptasi cukup lama dengan lingkungan tropik P. Lombok. Gen *BMPR-1B* dan *BMP15* yang mengontrol sifat reproduksi seperti kecepatan ovulasi dan jumlah anak sekelahiran (litter size) pada berbagai jenis domba akan diteliti sebagai kandidat gen untuk sifat prolifrik pada DEG. Gen ini dilaporkan oleh beberapa peneliti memiliki mekanisme proliferasi yang berbeda antara beberapa bangsa/breed dan jenis domba dan kemungkinan itu bisa terjadi pada DEG. Penelitian ini dirancang untuk menjelaskan pemahaman tentang perbedaan mekanisme proliferasi yang terjadi antara *breed* domba. Sebanyak 140 ekor DEG yang berpotensi menghasilkan anak kembar dua (*twin*) atau kembar tiga (*triplet*) yang tersebar di Pulau Lombok Provinsi Nusa Tenggara Barat di-*screening* untuk mengidentifikasi adanya mutasi gen *BMPR-1B* dan *BMP15* dengan menggunakan metode Forced PCR-RFLP. Selanjutnya akan dilakukan pengukuran frekuensi alel dan genotipe yang diakibatkan oleh adanya mutasi pada masing-masing gen. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa mutasi *FecX^G* pada gen *BMP15* menghasilkan dua alel yaitu Alel "wild-type"(+) berukuran 111 bp dan 30 bp, dan alel mutan (*G*) berukuran 141 bp dengan frekuensi 0,675 dan 0,325. Kombinasi alel pada gen *BMP15* menghasilkan dua genotipe, yaitu : ++ (111 bp/111 bp) dan *G*+ (141 bp/111 bp) dengan frekuensi 0,35 dan 0,65 pada domba Lombok ekor gemuk. Mutasi *FecB* pada gen *BMPR-1B* menghasilkan dua alel yaitu Alel "wild-type"(+) berukuran 140 bp, dan alel mutan (*B*) berukuran 110 dan 30 bp dengan frekuensi 0,718 dan 0,282. Kombinasi alel pada gen *BMPR-1B* menghasilkan tiga genotipe, yaitu : *BB* (110 bp/110 bp), *B*+ (110 bp/140 bp), dan ++ (140 bp/140 bp), frekuensi berturut-turut adalah 0,11 ; 0,35 dan 0,54 pada domba Lombok ekor gemuk.

Kata kunci: Mutasi, *BMPR-1B*, *BMP15*, Domba, Ekor Gemuk

PENDAHULUAN

Gen *BMPR-1B* dan *BMP15* yang sering disebut *FecB* dan *FecX* merupakan gen yang menyebabkan sifat prolifrik pada berbagai jenis domba. Gen *BMPR-1B* merupakan gen autosomal dominan dengan efek aditif pada kecepatan ovulasi, sedangkan *BMP15* adalah gen

overdominan yang terpaut dengan kromosom X yang menyebabkan sifat infertil pada individu homisigot. Mutasi yang terjadi pada kedua gen ini menyebabkan meningkatnya kecepatan ovulasi dan jumlah anak sekelahiran (litter size) pada ternak domba.

FecB adalah lokus autosomal tunggal yang mempunyai efek kodominan yang berpengaruh

terhadap kecepatan ovulasi dan memiliki efek dominan terhadap jumlah anak sekelahiran (litter size) (SOUZA *et al.*, 2001). Prolifisasi yang tinggi pada domba disebabkan oleh mutasi non-konservatif (Q249R) pada gen BMPR-1B (Bone Morphogenetic Protein Receptor 1B) yang diekspresikan pada ovarium dan sel granulosa (SOUZA *et al.*, 2001; WILSON *et al.*, 2001; MULSANT *et al.*, 2001; DAVIS, *et al.*, 2002; 2006). Studi pada beberapa *breed* domba menunjukkan bahwa *FecB* berasosiasi dengan prolifisasi tinggi seperti kecepatan ovulasi dan litter size (WANG *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2006; GUAN *et al.*, 2007)

Lokus lain seperti *FecX* merupakan mutan dari gen BMP15 (Bone Morphogenetic Protein 15) yang berpengaruh terhadap fertilitas pada domba (HANRAHAN *et al.*, 2004; DAVIS *et al.*, 2002; 2006). Domba dengan genotipe Homozygote pada BMP15 menunjukkan sifat infertil sedangkan genotipe heterozygote memiliki fertilitas yang sangat baik dengan kecepatan ovulasi yang lebih tinggi (GALLOWAY *et al.*, 2002; CHU *et al.*, 2005).

Penelitian mengenai pengaruh mutasi pada gen BMPR-1B dan BMP15 telah banyak dilaporkan oleh peneliti-peneliti dari berbagai negara. Uji DNA terhadap gen BMPR-1B dan BMP15 pada berbagai *breed* domba dari 8 negara termasuk domba ekor tipis dari Indonesia menunjukkan adanya mutasi yang menyebabkan sifat prolifik pada domba-domba tersebut (DAVIS *et al.*, 2002). KUMAR *et al.*, (2007) melaporkan pengaruh mutasi pada gen *FecB* terhadap meningkatnya jumlah anak sekelahiran (litter size) dan performan pertumbuhan pada domba persilangan Garole X Malpura.

Hasil yang berbeda dilaporkan oleh beberapa peneliti bahwa pada beberapa jenis domba dengan sifat prolifik yang tinggi ternyata tidak menunjukkan adanya mutasi pada gen BMPR-1B dan BMP15. Pada domba Hu di Cina yang sangat populer dengan sifat prolifiknya ternyata tidak ditemukan adanya mutasi pada gen BMP15 dan semua bergenotip BB pada gen BMPR-1B (WANG *et al.*, 2003; DAVIS *et al.*, 2006; GUAN *et al.*, 2007). Mutasi pada BMP15 juga tidak ditemukan pada domba Merino Cina, Xinjiang Fine Wool, dan Romolly Hills (DAVIS, 2004).

Mekanisme genetik yang berbeda tentang prolifisasi antara *breed* pada ternak domba masih belum banyak diketahui. Kecenderungan untuk beranak kembar dua (twining) maupun tiga (triplet) adalah sama walaupun terdapat perbedaan pada tingkat pengaturan gen. Penelitian ini merupakan penelitian awal untuk mengetahui adanya pola tersebut pada domba Lombok ekor gemuk melalui identifikasi mutasi gen *FecB* dan *FecX* dan pengaruhnya terhadap oocyte dan sel granulosa. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjelaskan pemahaman tentang perbedaan mekanisme prolifisasi antara *breed* domba.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi-Immunologi Universitas Mataram dan Laboratorium Terapan (Teaching Farm) Fakultas Peternakan Universitas Mataram. Sebagai objek penelitian adalah 140 ekor DEG yang dipelihara secara tradisional oleh peternak di Pulau Lombok-NTB. Sampel darah dari masing-masing individu sebagai sumber DNA untuk analisis Force PCR-RFLP.

Penelitian tahun pertama adalah untuk mengetahui adanya mutasi pada gen *FecB* dan *FecX* pada DEG. Pada tahap ini dilakukan *genotyping* gen *FecB* dan *FecX* pada 140 ekor sampel yang telah teridentifikasi memiliki potensi beranak kembar dua (twin) dan tiga (triplet). Identifikasi mutasi dilakukan menggunakan teknik Force PCR-RFLP seperti yang telah dilakukan oleh GALLOWAY *et al.* (2000); DAVIS *et al.* (2002) dan HANRAHAN *et al.* (2004). Teknik ini sudah digunakan secara meluas pada berbagai uji DNA.

Desain primer (forward dan reverse primer) Gen

Primer gen BMP-15 dan BMPR-1B didesain berdasarkan informasi sekuen yang digunakan sebelumnya oleh CHU *et al.* (2007). kemudian disintesis oleh Cybergene A.B. Sweden. Primer didesain dengan sekuen sebagai berikut:

BMPR-1B	Forward: 5'	GTCGCTATGGGGAAGT
		TTGGATG -3'
	Reverse: 5'	CAAGATGTTTTTCATGCC
		TCATCAACACGGTC-3'
BMP15	Forward: 5'	CACTGTCTTCTTGTTACT
		GTATTTCAATGAGAC -3'
	Reverse: 5'	GATGCAATACTGCCTG
		CTTG -3'

Ekstraksi DNA genom

Materi utama penelitian ini adalah DNA Genome yang diperoleh dari darah domba Lombok ekor gemuk sebanyak 140 ekor. Ekstraksi DNA genome dilakukan mengikuti petunjuk SAMBROOK *et al.*, (1989) dengan menggunakan buffer lisis sel untuk mendegradasi dinding sel dan fenol-kloroform untuk mendegradasi protein dan lemak kemudian dipresipitasi menggunakan etanol absolut. Proses berikutnya adalah pemurnian menggunakan RNase.

Forced restriction fragment length polymorphism PCR

Sampel DNA dari masing-masing individu digunakan sebagai cetakan (template) untuk mengamplifikasi lokus-lokus *FecB* dan *FecX* melalui reaksi PCR dengan sekuen nukleotida pengapit masing-

masing (Forward & Reverse Primer). Amplifikasi dilakukan mengikuti metode yang digunakan sebelumnya oleh DAVIS *et al.* (2002) dan CHU *et al.* (2007).

PCR dikondisikan pada volume reaksi 25 µl terdiri dari 100 ng DNA, 0,5 µM masing-masing primer, 1 x buffer PCR (10mM Tris-HCl pH 9.0), 1.5 mM MgCl dan 50 mM KCl, 5% deionized Formamide, 200 µM dNTP, dan 0,025 U Taq DNA polimerase (Pharmacia). Amplifikasi dilakukan selama 37 siklus dimana siklus pertama pada 95°C selama 5 menit diikuti 35 siklus berikutnya masing 95°C x 45 detik, 64°C x 45 detik, dan 72°C x 45 detik kemudian diakhiri satu siklus berikutnya pada 72°C selama 7 menit, menggunakan DNA thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus Corp).

Produk PCR yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan RFLP melalui pemotongan menggunakan enzim restriksi yang memiliki situs pemotongan pada masing-masing gen. Sebanyak 4 µl DNA produk PCR ditambahkan 0,5µl enzim restriksi (5U); 0,5µl buffer enzim dan 5 µl milique water sampai volume 10 µl, Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 3 jam.

Deteksi dan identifikasi produk Forced PCR-RFLP

Pada penelitian ini, analisis produk Forced PCR-RFLP dan deteksi terhadap alel gen dilakukan dengan elektroforesis gel agarose 2% dan pewarnaan dengan Ethidium Bromida (EtBr).

Analisis statistik

Frekuensi alel dihitung berdasarkan rumus Nei (1987):

$$x_i = \frac{(2n_{ii} + \sum_{j=1}^n n_{ij})}{(2N)}$$

Keterangan:

- x_i = frekuensi alel ke-i
- n_{ii} = jumlah individu bergenotipe ii
- n_{ij} = jumlah individu bergenotipe ij
- N = jumlah individu sampel

Frekuensi genotipe dapat diketahui dengan cara membagi jumlah sampel yang memiliki genotipe tipe tertentu dengan seluruh jumlah sampel. Frekuensi genotipe dihitung dengan rumus:

$$x_i = \frac{\sum_{i=1}^n n_i}{N}$$

- Ket.: x_i = frekuensi genotipe ke-i
- n_i = jumlah individu bergenotipe i
- N = jumlah individu sampel

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi Gen BMP15 dan BMPR-1B

Materi utama penelitian ini adalah DNA genom yang diperoleh dari 140 ekor sampel domba Lombok ekor gemuk. DNA genom diisolasi dari sampel darah yang dikoleksi menggunakan tabung venoject dengan pengawet EDTA. Ekstraksi DNA genome dilakukan dengan metode phenol-chloroform mengikuti petunjuk SAMBROOK *et al.* (1989) dengan beberapa modifikasi sehingga dihasilkan DNA dengan konsentrasi sekitar 100 – 500 ng/µl. Konsentrasi DNA ini adalah cukup ideal sebagai DNA template pada proses PCR.

Amplifikasi kandidat gen pengontrol sifat prolifrik dari genom domba Lombok ekor gemuk dilakukan menggunakan primer (Reverse & Forward Primer) yang didesain dan telah diuji sebelumnya pada berbagai bangsa domba baik daerah tropis maupun dari daerah temperate berdasarkan informasi dari berbagai jurnal internasional. Primer gen BMP15 dan BMPR-B didesain untuk mengamplifikasi DNA target dengan ukuran 141 dan 140 bp. Berdasarkan ukuran produk yang dihasilkan yang ditunjukkan dengan *DNA ladder HindIII 100 bp* dapat dipastikan bahwa produk amplifikasi adalah merupakan gen target. Semua gen target pada semua sampel teramplifikasi dengan hasil yang sangat jelas. Visualisasi produk PCR pada gel agarose 2% dengan pewarna EtBr dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2.

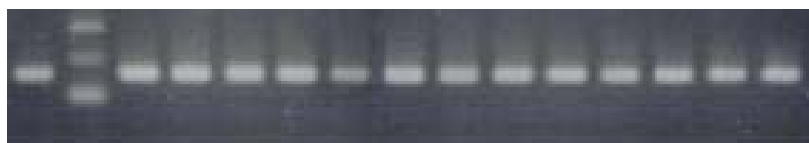
Deteksi putasi Gen BMP 15 dan BMPR-1B pada domba ekor gemuk

Mutasi Gen BMP 15 pada domba ekor gemuk

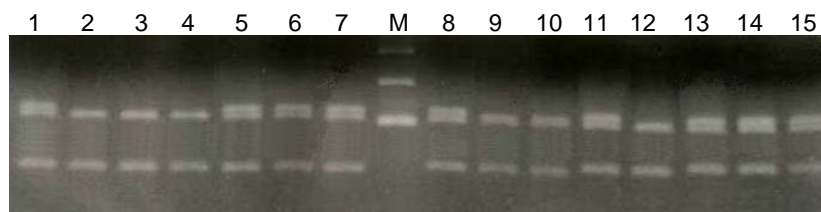
Amplifikasi gen BMP15 menggunakan teknik PCR menghasilkan sekuen DNA berukuran 141 bp. Tipe liar (wild type) dari sekuen gen BMP15 ekson 2 memiliki situs pemotongan enzim *HinfI* yang menghasilkan alel dengan ukuran 111 bp dan 30 bp (+). Mutasi transisi C/T menyebabkan perubahan pada situs pemotongan enzim *HinfI* yang menghasilkan alel mutan B berukuran 141 bp. Adanya mutasi ini menimbulkan polimorfisma genotipe pada domba ekor gemuk (DEG).



Gambar 1. Visualisasi hasil amplifikasi PCR gen BMP 15 genom domba Lombok ekor gemuk pada gel agarosa 2%



Gambar 2. Visualisasi hasil amplifikasi PCR gen BMPR-1B genom domba Lombok ekor gemuk pada gel agarose 2%



M= 100 bp DNA marker
 Alel "wild-type" (+) berukuran 111 bp dan 30 bp,
 Alel mutan (G) berukuran 141 bp
 Lajur 1, 5, 6, 7, 8, 11, 13, 14, 15 = genotipe G+
 Lajur 2,3,4,9,10,12 = genotipe ++

Gambar 3. Mutasi *FecX^G* gene *BMP-15* yang dipotong dengan *Hinf* I.

Dua genotipe, ++ (111 bp/111 bp) dan G+ (141 bp/111 bp) terdeteksi pada domba Lombok ekor gemuk (Gambar 3). Identifikasi polimorfisma nukleotida tunggal C/T melalui perunutian sekuen menunjukkan adanya perubahan pada posisi 718 dari gene *BMP-15*. Sekuen nukleotida yang dihasilkan dari genotipe G+ adalah identik dengan genotipe tipe liar ++ (wild-type) kecuali adanya perubahan basa C→T pada nukleotida 718 dari gen *BMP-15*. Mutasi ini menghasilkan "premature stop codon" pada tempat asam amino glutamat pada residu asam amino 239 dari asam amino yang tidak terproses (MCNATTY *et al.*, 2005) yang mungkin merupakan hasil dari hilangnya fungsi dari gen BMP-15 (CAG→TAG, Q239Ter) (MONTGOMERY *et al.*, 1993). Hasil ini menunjukkan adanya indikasi bahwa domba Lombok ekor gemuk membawa mutasi *FecX^G* dari gen BMP15 yang sama seperti yang dijumpai pada domba Han ekor kecil (CHU *et al.*, 2006), Belclare dan Cambridge (HANRAHAN *et al.*, 2004)

Mutasi Gen BMPR-1B pada domba ekor gemuk

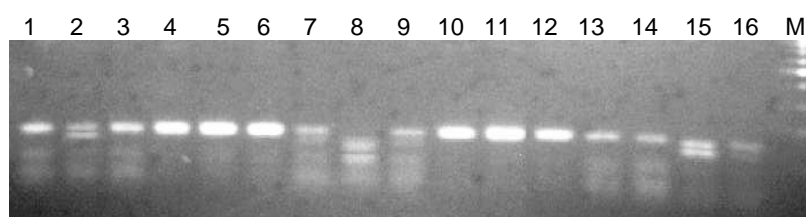
Amplifikasi gen BMPR-1B menggunakan teknik PCR menghasilkan sekuen DNA berukuran 140 bp. Tipe liar (wild type) dari sekuen gen BMPR-1B ekson 6 tidak memiliki situs pemotongan enzim *Ava*II dengan ukuran alel 140 bp (+). Mutasi transisi A – G menyebabkan adanya situs pemotongan enzim *Ava*II yang menghasilkan alel mutan B berukuran 110 dan 30 bp. Adanya mutasi ini menimbulkan polimorfisma genotipe pada domba ekor gemuk (DEG).

Tiga genotipe, BB (110 bp/110 bp), B+ (110 bp/140 bp), dan ++ (140 bp/140 bp), terdeteksi pada domba Lombok ekor gemuk (gambar 4). Ada atau tidak adanya

plimorfisma pada situs pemotongan enzim restriksi *Ava* II divisualisasikan menggunakan electrophoresis gel agarose. Sekuen nukleotida genotipe BB adalah identik dengan genotipe dari wild-type ++ kecuali adanya mutasi transisi A – G pada basa 746 situs pengkode (coding region) gen BMPR-1B. Mutasi ini menghasilkan perubahan dalam asam amino yang dikode dari glutamine pada "wild-type" menjadi arginine pada genotipe BB/tipe mutan (CAG→CGG, Q249R). Hasil ini menunjukkan bahwa domba Lombok ekor gemuk membawa mutasi *FecB* dari gen BMPR-1B yang sama seperti yang dijumpai pada domba Booroola Merino (MULSANT *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2001; WILSON *et al.*, 2001) dan domba Small Tailed Han (CHU *et al.*, 2007).

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya pola mutasi yang sama antara gen BMP15 dengan reseptornya gen BMPR-1B, dimana frekuensi alel tipe liar (wild type allele) lebih tinggi daripada alel mutan (G dan B). Hasil yang berbeda dilaporkan pada domba ekor kecil Han dimana alel mutan (B) memiliki frekuensi yang lebih tinggi daripada alel tipe liar (wild type allele) pada gen BMPR-1B, sedangkan pada BMP 15 adalah sebaliknya (sama dengan domba Lombok ekor gemuk).

Polimorfisme gen BMP15 yang diakibatkan oleh adanya mutasi *FecX^G* menghasilkan dua genotipe yaitu ++ (homosigot wild type) dan G+ (heterosigot) dan tidak ditemukan genotipe GG (homosigot mutan). Hasil yang sama juga dilaporkan pada domba ekor kecil Han dimana genotipe GG (homosigot mutan) juga tidak ditemukan. Pada gen BMPR-1B, mutasi *fecB* menghasilkan tiga pola genotip yaitu ++, B+ dan BB dimana homosigot wild type ++ memiliki frekuensi

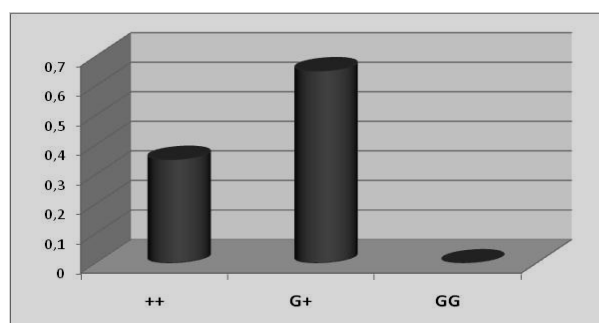


M= 100 bp DNA marker
 Alel "wild-type"(+) berukuran 140 bp, dan alel mutan (B) berukuran 110 dan 30 bp
 Lajur 1,3,4,5,6,10,11,12,13,14 = genotipe ++
 Lajur 2,7,9,15,16 = genotipe B+
 Lajur 8 = genotipe BB

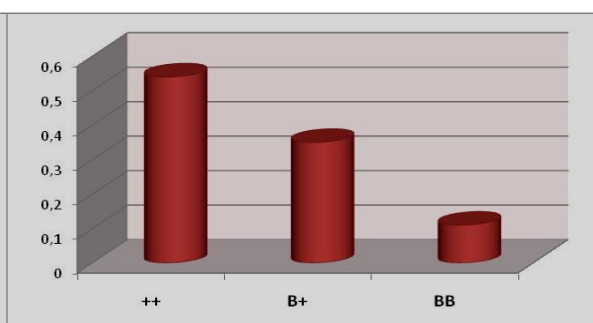
Gambar 4. Mutasi *FecB* gene *BMPR-1B* yang dipotong dengan *AvaII*.

Tabel 1. Frekuensi alel dan genotipe Gen BMP 15 dan BMPR-1B pada domba ekor gemuk

Gen	N	Frekuensi Genotipe			Frekuensi Alel	
BMP 15	140	++	G+	GG	+	G
		0,35(49)	0,65(91)	0,00	0,675	0,325
BMPR-1B	140	++	B+	BB	+	B
		0,54(76)	0,35(49)	0,11(15)	0,718	0,282



Gambar 5. Frekuensi genotipe gen BMP15 pada DLEG



Gambar 6. Frekuensi genotipe gen BMPR-1B pada DLEG

tertinggi diikuti B+ dan terendah homisigot mutan BB. Hasil ini berbeda dengan pola frekuensi genotipe yang dilaporkan pada domba Han dimana homisigot mutan BB memiliki frekuensi tertinggi (CHU *et al.*, 2006).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian diatas dapat diambil beberapa kesimpulan, yaitu: Mutasi *FecX^G* pada gen *BMP15* menghasilkan dua alel yaitu Alel "wild-type"(+) berukuran 111 bp dan 30 bp, dan alel mutan (G) berukuran 141 bp dengan frekuensi 0,675 dan 0,325. Kombinasi alel pada gen *BMP15* menghasilkan dua genotipe, yaitu: ++ (111 bp/111 bp) dan G+ (141 bp/111 bp) dengan frekuensi 0,35 dan 0,65

pada domba Lombok ekor gemuk. Mutasi *FecB* pada gen *BMPR-1B* menghasilkan dua alel yaitu Alel "wild-type"(+) berukuran 140 bp, dan alel mutan (B) berukuran 110 dan 30 bp dengan frekuensi 0,718 dan 0,282. Kombinasi alel pada gen *BMPR-1B* menghasilkan tiga genotipe, yaitu : BB (110 bp/110 bp), B+ (110 bp/140 bp), dan ++ (140 bp/140 bp), frekuensi berturut-turut adalah 0,11 ; 0,35 dan 0,54 pada domba Lombok ekor gemuk.

SARAN

Mekanisme pengaturan gen BMP15 dan BMPR-1B pada domba Lombok ekor gemuk membutuhkan penelitian lebih lanjut. Pengamatan basis fenotipe

domba Lombok ekor gemuk tampaknya memerlukan pemahaman (insights) lebih lanjut melalui pengontrolan pengembangan follicle dan oocyte.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dapat terlaksana atas dukungan pembiayaan Dana DIPA Universitas Mataram Tahun Anggaran 2009 Nomor 0234.0/023-04.2/XXI/2009, Tanggal 31 Desember 2008.

DAFTAR PUSTAKA

- CHU, M.X., L.H. SANG, J.Y. WANG, L. FANG and S.C. YE. 2005. Study on BMP15 and GDF9 as candidate genes for prolificacy of small Tail Han sheep. *Yi Chuan Xue Bao.* 32: 38-45.
- 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-1B and BMP-15 genes are associated with litter size in Small Tailed Han sheep (*Ovis aries*). *J. Anim. Sci.* 85: 598-603
- DAVIS, G.H. 2004. Fecundity genes in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 247-253.
- DAVIS, G.H. 2005. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet. Sel. Evol.* 37 (Suppl. 1): S11-S23.
- DAVIS, G.H., P.A. FARQUHAR, A.R. O'CONNELL, J.M. EVERETT-HINCKS, P.J. WISHART, S.M. GALLOWAY and K.G. DODDS. 2006. A putative autosomal gene increasing ovulation rate in Romney sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 92: 65-73.
- DAVIS, G.H., S.M. GALLOWAY, I.K. ROSS, S.M. GREGAN, J. WARD, B.V. NIMBKAR, P.M. GHALSASI, C. NIMBKAR, G.D. GRAY, SUBANDRIYO, I. INOUNU, B. TIESNAMURTI, E. MARTYNIUK, E. EYTHORS DOTIR, P. MULSANT, F. LECERF, J.P. HANRAHAN, G.C. BRADFORD and T. WILSON. 2002. DNA test in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (*FecB*) mutation. *Biol. Reprod.* 66: 1869-1874.
- GALLOWAY, S.M., K.P. MCNATTY, L.M. CAMBRIDGE, L.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. Mutation in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat. Genet.* 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. *Mol. Cell. Endocrinol.* 191: 15-18.
- GUAN, F., S.R. LIU, G.Q. SHI and L.G. YANG. 2007. Polymorphism of *FecB* gene in nine sheep breeds or strains and its effects on litter size, lamb growth and development. *Anim. Reprod. Sci.* 99: 44-52.
- 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 oocytes derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol. Reprod.* 70: 900-909.
- KUMAR, D., A. JOSHI, S.M. NAQVI, S. KUMAR, A.K. MISHRA, V.P. MAURYA, A.L. ARORA, J.P. MITTAL and V.K. SINGH. 2007. Sperm motion characteristics of Garole x Malpura sheep evolved in a semi-arid tropical environment through introgression of *FecB* gene. *Anim. Reprod. Sci.* 30: 755-760.
- KUMAR, S., A.P. KOLTE, A.K. MISHRA, A.L. ARORA and V.K. SINGH. 2006. Identification of the *FecB* mutation in Garole x Malpura sheep and its effect on litter size. *Small Rum. Res.* 64: 305-310.
- MCNATTY, K.P., S.M. GALLOWAY, T. WILSON, P. SMITH, N.L. HUDSON, A. O'CONNELL, A.H. BIBBY, D.A. HEATH, G.H. DAVIS, J.P. HANRAHAN and J.L. JUENGEL. 2005. Physiological effects of major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet. Sel. Evol.* 37 (Suppl. 1): S25-S38.
- MONTGOMERY, G.W., A.M. CRAWFORD, J.M. PENTY, K.G. DODDS, A.J. EDE, H.M. HENRY, C.A. PIERSON, E.A. LORD, S.M. GALLOWAY, A.E. SCHMACK, J.A. SISE, P.A. SWARBRICK, V. HANRAHAN, F.C. BUCHANAN and D.F. HILL. 1993. The ovine Booroola fecundity gene (*FecB*) is linked to markers from a region of human chromosome 4q. *Nat. Genet.* 4: 410-414.
- MULSANT, P., F. LECERF, S. FABRE, L. SCHIBLER, P. MONGET, I. LANNELUC, C. PISSELET, J. RIQUET, D. MONNIAUX, I. CALLEBAUT, E. CRIBIU, J. THIMONIER, J. TEYSSIER, L. BODIN, Y. COGNIE, N. CHITOUR and J.M. ELSEN. 2001. Mutation in the bone morphogenetic protein receptor-1B is associated with increased ovulation rate in Booroola ewes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 5104-5109.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH and T. MANIATIS. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- SOUZA, C.J., C. MACDOUGAL, B.K. CAMPBELL, A.S. MCNEILLY and D.T. BAIRD. 2001. The Booroola (*FecB*) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1B (BMPR-1B) gene. *J. Endocrinol.* 2, R1-R6.
- WANG, G.L., X.Z. MAO, G.H. DAVIS, Z.S. ZHAO, L.J. ZHANG and Y.Q. ZENG, 2003. DNA tests in Hu sheep and Han sheep (small tail) showed the existence of Booroola (*FecB*) mutation. *J. Nanjing Agric. Univ.* 1: 104-106.
- WILSON, T., X.Y. WU, J.L. JUENGEL, I.K. ROSS, J.M. LUMSDEN, E.A. LORD, K.G. DODDS, G.A. WALLING, J.C. MCEWAN, A.R. O'CONNELL, K.P. MCNATTY and G.W. MONTGOMERY. 2001. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein 1B receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol. Reprod.* 2001 64: 1225-1235.