

Frecuencia del alelo Q204X del gen miostatina, en hatos de ganado Charolais de la región noreste de México

Frequency of the myostatin Q204X allele in Charolais breed beef cattle from northeast Mexico

Ana María Sifuentes Rincón^a, Herlinda E. Puentes Montiel^a, Víctor R. Moreno Medina^a,
Xochitl Fabiola de la Rosa Reyna^a, Javier Rosales Alday^b

RESUMEN

En el presente trabajo se determinó la frecuencia del alelo Q204X del gen miostatina (MSTN) en individuos de cuatro hatos de la raza Charolais del noreste de México. En el total de la población (n= 289) se encontraron 15 portadores del alelo Q204X, mostrando frecuencias genotípicas y alélicas de 5.2 y 2.6 %, respectivamente. No se encontró ninguna diferencia ($P > 0.05$) entre el número de individuos portadores en los hatos estudiados. Sin embargo, al menos dos de los hatos presentaron un porcentaje de portadores arriba del 8 %. Se determinó que el alelo está en equilibrio Hardy-Weinberg en los hatos estudiados. El establecimiento de la presencia del alelo Q204X en el gen MSTN del ganado Charolais, abre la posibilidad de implementar estrategias experimentales enfocadas a determinar su papel y uso potencial en la selección de animales con mayor mérito genético.

PALABRAS CLAVE: Miostatina, Marcadores genéticos, Bovinos de carne, Doble musculatura, Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs).

ABSTRACT

Frequency of the myostatin Q204X allele in Charolais cattle herds in northeast Mexico was determined by sampling 289 animals from four herds. Each herd had allele carriers, with a total of 15 carriers identified, and overall genotypic frequency of 5.2 % and allelic frequency of 2.6 %. The number of carriers per herd was not significantly different ($P > 0.05$) between herds, although two herds had more than 8 % carriers. The allele was in Hardy-Weinberg equilibrium within the studied herds. Evaluation of genes that affect quantitative traits, such as the myostatin Q204X allele, is vital to determining their role and potential applications in breeding strategies.

KEY WORDS: Myostatin, Genetic markers, Beef cattle, Double-muscling, Single nucleotide polymorphisms (SNPs).

La raza Charolais es altamente apreciada en México por sus características de crecimiento y muscularidad, lo que le confiere ventajas económicas al producir mayor cantidad de carne por animal⁽¹⁾. Estas características se han logrado por el proceso de selección, principalmente fenotípica, a la cual se ha sometido esta raza.

The Charolais breed is highly prized in Mexico for its growth characteristics and muscularity, which result in greater meat production per animal and consequent economic advantages⁽¹⁾. These positive aspects have been developed through the selection process, mainly phenotypic, implemented in this breed.

Recibido el 18 de agosto de 2005 y aceptado para su publicación el 29 de junio de 2006.

^a Centro de Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional. Boulevard del Maestro esq. Elías Piña S/N, Col. Narciso Mendoza, 88710 Reynosa, Tam. Teléfono (899) 925 39 96, Fax: (899) 925 16 56. ana@mail.cb.g.ipn.mx. Correspondencia al primer autor.

^b Campo Experimental Sur de Tamaulipas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas Y Pecuarias (INIFAP).

Proyecto apoyado por SEP-CONACYT 39841 Y CGPI-IPN 2005270.

Actualmente, la aplicación de la genética molecular en la identificación de regiones genómicas (loci) y genes que afectan características de importancia productiva, ofrece la oportunidad de acelerar el proceso de selección y mejoramiento genético, por medio de la identificación de aquellos individuos portadores de los genotipos deseables según el objetivo de crianza.

El gen de la miostatina (MSTN) es un regulador extracelular negativo, que se expresa durante el desarrollo del músculo y en el tejido esquelético del animal adulto^(2,3,4). Estudios genético-moleculares han demostrado que en razas europeas la doble musculatura es ocasionada por al menos seis mutaciones (alelos mh mutados) presentes en los exones II y III de MSTN⁽⁵⁾. En el caso específico de la raza Charolais, el gen lleva una mutación (transición C > T) en el exón II, denominada alelo Q204X, que provoca la pérdida de función de la proteína^(6,7).

La manifestación fenotípica de los animales homocigóticos para los alelos mh mutados, es la doble musculatura, que además, se asocia con la disminución de grasa de otros órganos, reducida fertilidad de la hembra, susceptibilidad a enfermedades de vías respiratorias, y alta incidencia de distocia⁽⁸⁾. Sin embargo, los animales presentan canales más magras cuando se les compara con animales sin esta condición, así como también mayor conversión alimenticia^(9,10,11), lo cual ha propiciado que este fenotipo se seleccione a favor o en contra, dependiendo de los objetivos y estrategias de manejo de los hatos⁽⁸⁾. También se ha observado que en animales heterocigotos se incrementa el ojo de la chuleta y la suavidad de la carne, sin detrimento de la ganancia económica por concepto de problemas distócicos^(8,11).

Desde su introducción a América y específicamente a México, la raza Charolais se ha sometido a una serie de estrategias de mejoramiento genético que han permitido su adaptación, tanto a las diferentes regiones agro ecológicas, así como para los fines productivos especificados por los productores⁽¹⁾. Por los problemas de distocia ocasionados por la doble musculatura, una práctica común entre los

Use of molecular genetics in identification of genomic regions (loci) and genes that affect important production characteristics provides the opportunity to accelerate the selection and genetic improvement process through identification of carriers with desirable genotypes, based on the breeding objective.

The myostatin gene (MSTN) is a negative extracellular regulator that expresses during development of muscle and skeletal tissue in adult animals^(2,3,4). Molecular research has shown that double-muscling in European breeds is caused by at least six mutations (mh mutated alleles) in MSTN exons II and III⁽⁵⁾. A mutation (C > T transition) in exon II is present in Charolais MSTN gene, called the Q204X allele, that causes loss of the protein function^(6,7).

The phenotypic manifestation of mh mutated alleles in homozygotic animals is double-muscling. This condition is associated with decreased fat in other organs, reduced female fertility, susceptibility to respiratory diseases and high dystocia incidence⁽⁸⁾, but also leads to animals with leaner carcasses and better feed conversion than animals without double-muscling^(9,10,11). Given these characteristics, this phenotype is selected for or against depending on herd management objectives and strategies⁽⁸⁾. In heterozygotic animals, this phenotype produce an increase in rib-eye area and meat tenderness without dystocial problems negatively affecting profits^(8,11).

Since its introduction to the Americas, and particularly Mexico, the Charolais breed has been subjected to different genetic improvement strategies allowing its adaptation to different agroecological regions and also to producers' specific production objectives⁽¹⁾. Due to dystocial problems caused by double-muscling, this phenotype is commonly selected against. Increasing use of artificial insemination and embryo transfer programs, however, makes further study of the MSTN genotypes expressed in Mexican herds more urgent. This would generate data on the genetic constitution of individuals and contribute to planning genetic improvement strategies in this breed. The present study objective was to determine myostatin Q204X

productores es la selección en contra de este fenotipo. Sin embargo, debido a que en los últimos años se han incrementado los programas de inseminación artificial y transferencia de embriones, se hace de particular interés conocer los genotipos que presenta el gen MSTN en hatos de ganado establecidos en el país, para generar información sobre la constitución genética de los individuos y contribuir en el planteamiento de estrategias de mejoramiento genético en esta raza. El objetivo del presente trabajo fue determinar la frecuencia del alelo Q204X en individuos de la raza Charolais en cuatro hatos del noreste de México.

Se utilizaron muestras de sangre de 289 animales de registro, localizados en cuatro hatos de los estados de Nuevo León, Tamaulipas y Veracruz. En estos hatos se utiliza semen importado de varios países, entre ellos Francia e Irlanda, donde se ha seleccionado para producir animales con doble musculatura (Cuadro 1). En los hatos 1, 2 y 3 la muestra de sangre se tomó de hembras, crías y sementales, y en el hato 4 se muestrearon 70 vacas preñadas y un semental.

El aislamiento del ADN de las muestras de sangre se hizo utilizando la técnica de precipitación con sales⁽¹²⁾. La presencia del alelo Q204X se evaluó en cada individuo aplicando un ensayo de discriminación alélica. Esta metodología detecta polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y se realizó con un ensayo fluorogénico de nucleasa 5´⁽¹³⁾. Este ensayo involucró realizar la reacción en cadena de polimerasa (PCR) en presencia de dos sondas marcadas con dos fluoróforos diferentes (FAM y VIC). Al término de la reacción se cuantificó la señal fluorescente, y al obtener un

allele frequency in Charolais breed individuals in four herds in northeast Mexico.

Blood samples were taken from 289 registered animals in four herds located in Nuevo León, Tamaulipas and Veracruz, Mexico. The semen used in these herds is imported from countries such as France and Ireland, where double-muscling is selected for (Table 1). In herds 1, 2 and 3, samples were taken from cows, calves and bulls, and in herd 4 from 70 cows and one bull.

Isolation of blood sample DNA was done with the salt precipitation technique⁽¹²⁾. An allelic discrimination assay was done of each individual to determine the presence of the Q204X allele. This methodology detects single nucleotide polymorphisms (SNPs) and was done with a 5´ nuclease fluorogenic assay⁽¹³⁾ using PCR with two probes, each marked with a different fluorophore (FAM and VIC). The fluorescent signal was quantified after the reaction: a substantial increase in the FAM fluorophore indicated a Q204X allele homozygote; an increase in the VIC fluorophore indicated a normal allele homozygote; and fluorescence of both fluorophores indicated a heterozygote.

The assays were done with synthetic primers and probes (Applied Biosystems), 96-well optic plates and a ABI Prism 7000 Sequence Detection System. Analysis was done with 250 ng DNA, 12.5 ml Taqman PCR master mix (Applied Biosystems), and 0.625 ml probe/primer mix (Assay SNP mix) under the following conditions: cycles of 2 min at 50 °C and 10 min at 95 °C, followed by 40 two-step cycles of 15 sec at 92 °C and 1 min at 60 °C.

Cuadro 1.- Hatos de ganado Charolais utilizadas para determinar la presencia del alelo Q204X

Table 1.- Charolais cattle herds used to determine the myostatin Q204X allele

Herd	n	State	Region/climate	Origin of genetic material
1	95	Tamaulipas	Arid-semiarid/semidry-dry	USA, France
2	80	Nuevo León	Arid-semiarid/semiarid-humid	France, England, Ireland
3	43	Veracruz	Tropical-wet/tropical	Mexico
4	71	Nuevo León	Arid-semiarid/subhumid	France

incremento sustancial sólo del fluoróforo FAM, se determinó que se trataba de un homocigoto para el alelo Q204X, mientras que el incremento del fluoróforo VIC reveló un homocigoto para el alelo normal. Fluorescencia de ambos fluoróforos, se determinó la presencia de heterocigotos.

Se utilizaron iniciadores y sondas sintetizadas en la compañía Applied Biosystems, y para los ensayos se utilizaron placas ópticas de 96 pozos utilizando el equipo ABI Prism 7000 Sequence Detection System, en las siguientes condiciones: un ciclo de 2 min a 50 °C y 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de dos pasos 15 seg a 92 °C y 1 min a 60 °C. Se utilizaron 250 ng ADN, 12.5ml of Taqman PCR master mix (Applied Biosystems), y 0.625 ml de la mezcla de sondas e iniciadores (Assay SNP mix). El análisis de cada genotipo fue llevado a cabo utilizando el paquete computacional ABI Prism 7000 Sequence Detection System; además, cada muestra fue verificada mediante análisis visual con el fin de eliminar falsos positivos. Después de asignar el genotipo de cada uno de los animales, se calcularon las frecuencias de portadores y genotípicas en la población total así como en cada ható evaluado.

Se realizó un análisis de contingencia de Ji cuadrada para determinar la independencia de la presencia del gen Q204X entre hatos⁽¹⁴⁾. Los datos genotípicos se agruparon en una matriz donde se asignó de manera arbitraria un número de tres dígitos para cada tipo de alelo. Se utilizó el programa Genetix 4.02⁽¹⁵⁾ para realizar la prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg (con base en el cálculo de F_{IS} sobre 1000 permutaciones), Con este análisis se obtiene una distribución del estimador bajo la hipótesis nula (H_0) de que si $F_{IS} = 0$, indica que la población se encuentra en equilibrio pues $H_0 = H_E$. Con los valores obtenidos, se infieren la posibles causas de desequilibrio, si $F_{IS} > 0$ puede deberse a déficit de heterocigotos; si $F_{IS} < 0$ se debe a un exceso de heterocigotos.

En este estudio se encontró que de los 289 animales muestreados, 15 fueron portadores para el alelo Q204X del gen MSTN, dando una frecuencia del

Analysis of each genotype was done with the ABI Prism 7000 Sequence Detection System program, and each sample was visually analyzed to eliminate any false positives. Once each animal was assigned a genotype, and carriers and genotype frequencies were calculated by herd and experimental population.

A chi-squared contingency analysis was done to determine the independence of Q204X allele presence among the herds⁽¹⁴⁾. Genotype data were grouped in a matrix in which each allele type was randomly assigned a three-digit number. The Hardy-Weinberg equilibrium test, based on an F_{IS} calculation with 1000 permutations, was determined using the Genetix 4.02 software⁽¹⁵⁾. This produced a distribution for the estimator under the null hypothesis (H_0) of: if $F_{IS} = 0$ the population is in equilibrium, since $H_0 = H_E$. The resulting values were used to infer possible causes of Hardy-Weinberg equilibrium deviations: an $F_{IS} > 0$ may be caused by a heterozygote deficit; and an $F_{IS} < 0$ from a heterozygote surplus.

Of the 289 sampled animals, 15 were found to be MTSN gene Q204X allele carriers, with an overall population genotype frequency of 5.2 % and an allele frequency of 2.6 %. No homozygotic animals were identified for this allele (Table 2). A comparison of carriers frequency by herd produced no significant differences ($P > 0.05$), although herds

Cuadro 2.- Frecuencias genotípicas y alélicas de la mutación Q204X del gen miostatina en ganado Charolais

Table 2.- Genotype and allele frequencies of myostatin Q204X allele in Charolais breed (%)

Herd	n	Genotype frequency			Allele frequency	
		AA	AB	BB	A	B
1	95	-	2.1	97.9	2.0	98.0
2	80	-	8.8	91.2	4.4	95.6
3	43	-	9.3	90.7	4.7	95.3
4	71	-	2.8	97.2	1.4	98.6
Total	289	-	5.2	94.8	2.6	97.4

A: Q204X allele, B: Normal allele

5.2 % y una frecuencia del alelo en la población de 2.6 %. No se encontraron animales homocigóticos para este alelo (Cuadro 2). Al hacer una comparación de la frecuencia de portadores por hato, no se encontró ninguna diferencia ($P > 0.05$), pero se pudo observar que los hatos 2 y 3 tienen porcentajes de portadores arriba del 8 %. Esto puede ser debido a que en el hato 2 se introdujo material genético de Europa y aunque en el hato 3 se utilizó material de México, éste puede provenir de ganaderías que utilizan material genético de líneas europeas (Cuadro 1).

La prueba de F_{IS} para evaluar el equilibrio Hardy-Weinberg, permitió observar que el alelo está en equilibrio en cada hato, así como en la población total ($P > 0.00$). Este resultado es importante desde el punto de vista poblacional y de manejo, ya que aunque no está debidamente documentado, una práctica común entre los productores es eliminar de los hatos a aquellos animales con fenotipo de doble musculatura. Se ha reportado que los animales heterocigotos para los alelos mh son por lo general más grandes que los animales homocigóticos para los alelos normales^(5,8); puesto que en el estudio todos los individuos portadores son heterocigotos, el alelo Q204X se ha mantenido en equilibrio en la población estudiada, por medio de la selección fenotípica al azar de individuos heterocigotos para el alelo, ya que se esperaría que estos sean superiores en musculatura que sus contrapartes normales, pero sin llegar a presentar el fenotipo característico de la doble musculatura.

Ocho de los quince portadores del alelo Q204X fueron vacas; este resultado es importante ya que se ha demostrado que las hembras con de alelos mh en forma heterocigótica tienen menores dificultades de parto (distocia), aún cuando la cría sea homocigótica para los alelos mh mutados, evitando las pérdidas económicas que se generan por la presencia de este evento⁽⁸⁾.

En los hatos 1 y 2 se logró establecer la genealogía en tres de las crías portadoras del alelo Q204X; en dos de ellas el alelo fue heredado

2 and 3 had carriers percentages greater than 8%. In herd 2, this higher percentage may have resulted from introduction of genetic material from Europe, and in herd 3, in which material from Mexico is used; this material may have come from ranches that use European line genetic material (Table 1).

The F_{IS} results showed that the allele is in Hardy-Weinberg equilibrium in each studied herd, as well as in the overall population ($P > 0.00$). From a population and management point of view this is important since a common (though inadequately documented) practice among producers is to eliminate animals with the double-muscling phenotype from herds. Animals heterozygotic for mh alleles have been reported to be generally larger than those homozygotic for normal alleles^(5,8). Given that all the individual carriers in the present study were heterozygotes, the Q204X allele has apparently remained in equilibrium in the studied population via random phenotypic selection of heterozygotic individuals. These can be expected to be more muscled than their normal counterparts, though they will not manifest the characteristic double-muscling phenotype.

Eight of the fifteen Q204X allele carriers were cows. This is important in reproduction since cows heterozygotic for mh alleles have fewer problems birthing (i.e. dystocia), even when the calf is homozygotic for the mh mutated alleles, thus avoiding potential financial losses caused by this event⁽⁸⁾.

Genealogies were established for three of the calves carrying the Q204X allele in herds 2 and 3. Two of these calves inherited it from the mother and in the third both parents were heterozygotic carriers. Genealogical records would prove extremely useful in this case since they establish the filial relationships of animals in a population, allowing reproductive planning to avoid homozygosity for undesirable genes or to increase the frequency of desired genes. In the Charolais breed, for example, increased Q204X allele frequency can improve growth and carcass characteristics. Genealogical control of a population also allows planning of the desired level of consanguinity within a herd.

por la madre y en la tercera ambos padres son portadores del alelo en forma heterocigótica. En este punto es relevante resaltar las ventajas de contar con registros genealógicos, ya que estos permiten establecer las relaciones filiales de los animales en la población, lo cual es útil para hacer apareamientos planeados para evitar la presencia homocigótica de un gen indeseable o incrementar la frecuencia de genes deseables, como en el caso de la raza Charolais, donde se puede mejorar las características de crecimiento y de canal al incrementar la frecuencia del alelo Q204X. Otra de las ventajas que se tiene al conocer el pedigrí de la población, es que se puede planear el grado de consanguinidad deseado dentro del hato sin el detrimento dado por elevada consanguinidad.

Existen pocos estudios poblacionales evaluando la frecuencia del alelo Q204X de MSTN. Dvorak *et al.*⁽¹⁶⁾, reportaron una frecuencia de 0.012 y 0.1, respectivamente en dos hatos de ganado Charolais de países de Europa del este; en otro estudio⁽¹⁷⁾, encuentran una frecuencia de 0.6 de un haplotipo del gen miostatina que incluye la presencia de la mutación Q204X. Sin embargo, en estos trabajos no se evalúa el impacto del alelo Q204X desde el punto de vista productivo.

La evaluación del alelo Q204X en hatos mexicanos permitirá establecer el manejo de su presencia, y enfocar estrategias para aprovechar las ventajas que ofrece la presencia de doble musculatura en razas como la Charolais. En países en los que se ha avanzado en la aplicación de la biotecnología animal, la evaluación con marcadores genéticos empieza a ser un requisito para la inclusión de animales en pruebas de desempeño para características como calidad de carne. En México, los análisis moleculares pueden servir para generar información que permitan establecer cómo cada forma alélica de los genes de interés productivo (como es el caso del gen MSTN) se ha ido disseminando entre los hatos de acuerdo al manejo fenotípico y empírico, con este tipo de pruebas se pueden hacer diseños experimentales enfocados a evaluar el papel que puede estar jugando el gen en

Very few populational studies include evaluation of the MSTN gene Q204X allele frequency. Dvorak *et al.*⁽¹⁶⁾ reported frequencies of 0.012 and 0.1 in two Charolais herds in Eastern European countries, while another study includes a frequency of 0.6 for a myostatin gene haplotype with the Q204X mutation. Neither of these studies, however, includes an evaluation of the Q204X allele's impact on production parameters.

Evaluation of the Q204X allele in Mexican herds will help in establishing practices to manage its presence and in developing strategies to exploit the advantages offered by double-muscling in breeds such as Charolais. Countries with advanced animal biotechnology capabilities have begun to require genetic marker evaluation before animals can be included in performance trials, such as meat quality. Use of molecular analysis in Mexico could generate data to establish how each allelic form of gene associated with productive traits (as is the case with the MSTN gene) have disseminated among herds in response to phenotypic and empirical management. This type of test can be used in experimental designs focused on evaluating the role played by a gene in generating productive characteristics such as meat quality.

This is the first evaluation of the MSTN gene in Mexican herds. Further research is needed on this gene that includes productive data to establish the association between it and important economic parameters such as dystocial birth frequency, birth, weaning and market weights and carcass characteristics.

In conclusion, the myostatin gene Q204X allele was identified in registered Charolais breed herds in northeast Mexico. Carriers (genotype) frequency was 5.2 % and allele frequency was 2.6 % in the four studied herds. Carriers frequency was higher than 8 % in some herds, suggesting that care must be taken when mating these animals to prevent double-muscling in calves. This type of research, in addition to genealogical and production records, is needed to understand the relationship between this gene type and important economic characteristics.

la obtención de características productivas como lo es la calidad de carne.

Cabe mencionar que este es el primer trabajo en el que se evalúa el gen MSTN en hatos mexicanos, y se requiere continuar con esta línea de investigación adicionando datos productivos para establecer la asociación de este gen con características económicamente importantes, como la frecuencia de partos distócicos, pesos al nacimiento, al destete y al mercado, así como con características de canal.

Se concluye que se encontró la presencia del alelo Q204X del gen de la miostatina en hatos de registro de la raza Charolais en el noreste de México. La frecuencia animal portadores fue de 5.2 % y del alelo en los cuatro hatos fue del 2.6 %. Se observó que en algunos hatos la frecuencia de portadores es arriba del 8 %, por lo que se debe tener cuidado con estos animales en la planeación de apareamientos para evitar la presencia de becerros con doble musculatura. Se establece la necesidad de continuar con este tipo de trabajos incluyendo registros genealógicos y productivos para relacionar este tipo de genes con características de importancia económica.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo técnico y las facilidades prestadas a los productores de los hatos incluidos en el presente estudio: Ing. Álvaro García González, Lic. Gilberto Romero Cloud, Sr. Martín del Ángel Robles e Ing. Ricardo Maldonado González. HEPM agradece las becas PIFI-IPN y CONACYT.

LITERATURA CITADA

1. Charolais. Asociación Mexicana de la Raza Charolais. [en línea] <http://www.charolais.org.mx>. Consultado mayo 15, 2006.
2. McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;(94):12457-12461.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the producers Álvaro García González, Gilberto Romero Cloud, Martín del Ángel Robles and Ricardo Maldonado González for their technical support and access to their herds. HEPM received scholarships from the PIFI-IPN and CONACYT.

End of english version

3. Charlier C, Coppieters W, Farnir F. The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine Chromosome 2. *Mamm Genome* 1995;(6):788-792.
4. Heather A, Della-Fera MA, Baile CA. Review of myostatin history, physiology and applications. *Int Arch Biosci* 2001;1014-1022.
5. Grobet L, Poncelet D, Royo LJ, Brouwers B, Pirottin D, Michaux C, *et al*. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm Genome* 1998;(9):210-213.
6. Antoniou E, Grosz MD. PCR based detection of bovine myostatin Q204x mutation. *Anim Genet* 1999;(30):231-232.
7. Karim L, Coppieters W, Grobet L, Valentini A, Georges M. Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double-muscling in cattle using a multiplex oligonucleotide ligation assay. *Anim Genet* 2000;(31):396-399.
8. Bellinge RHS, Liberles DA, Laschi SPA, O'Brien A, Tay GK. Myostatin and its implications on animal breeding: a review. *Anim Genet* 2005;(36):1-6.
9. Casas E, Shackelford S, Keele J, Stone R, Kappes S, Koohmaraie M. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *J Anim Sci* 2000;(78):560-569.
10. Wheeler TL, Shackelford SD, Casas E, Cundiff LV, Koohmaraie M. The effects of Piedmontese inheritance and myostatin genotype on the palatability of longissimus thoracis, gluteus medius, semimembranosus, and biceps femoris. *J Anim Sci* 2001;(79):3069-3074.
11. Casas E, Bennet GL, Smith TPL, Cundiff LV. Association of myostatin on early calf mortality, growth and carcass composition traits in crossbreed cattle. *J Anim Sci* 2004;(82):2913-29.
12. Salazar-Marroquín EL. Evaluación de nueve marcadores microsatélites para la genotipificación de ganado bovino [tesis de maestría]. Reynosa, Tam, México: Instituto Politécnico Nacional; 2001.
13. Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genetic Analysis* 1999;(14):143-149.
14. Ott L. An introduction to statistical methods and data analysis. 4th ed. California, USA: Duxbury Press; 1993:331-332.
15. Belkhir K, Borsa C, Raufaste L, Retén F. Genetix version 4.02. Logiciel sous Windows TM pour la génétique des

- populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, France. 2004.
16. Dvorak J, Filistowicz A, Hruska D, Horák P, Vrtková I, Kúbek A, *et al.* The polymorphism of MSTN, PRNP and CSN3 genes in Charolais cattle. *Anim Sci Pap Rep* (2002);2019-23.
 17. Dunner S, Miranda ME, Amigues Y, Cañon J, Georges M, Hanset R, *et al.* Haplotype diversity of the myostatin gene among beef cattle breeds. *Genet Select Evol* 2003;(35):03-118.