

Polimorfisme g.-371T>A Promotor Gen Miostatin pada Sapi Pedaging Indonesia

(Polymorphism g.-371T>A Promoter of the Myostatin Gene in Indonesian Beef Cattle)

Sutikno¹, Rudy Priyanto², Cece Sumantri², Jakaria Jakaria^{2*}

(Diterima Oktober 2018/Disetujui Januari 2020)

ABSTRAK

Gen *myostatin* (MSTN) berfungsi sebagai inhibitor (*negative regulator*) pertumbuhan jaringan otot. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi polimorfisme g.-371T>A pada promotor gen MSTN pada sapi pedaging Indonesia. Sampel darah diperoleh dari 191 ekor sapi potong Indonesia yang terdiri atas sapi bali (BL) (42), sapi madura (MD) (20), sapi pesisir (PI) (17), sapi katingan (KT) (16), sapi peranakan *ongole* (PO) (22), sapi pasundan (PD) (14), sapi sumba *ongole* (SO) (10), sapi brahman (BH) (17), sapi simental (SM) (15), dan sapi limousin (LM) (18). Polimorfisme gen MSTN dianalisis menggunakan metode PCR-RFLP (*Dral*) dan *direct sequencing*. Hasil genotiping g.-371T>A adalah polimorfik (genotipe TT, TA, dan AA) pada sapi Simmental, SO, dan Katingan. Frekuensi alel T dan A masing-masing adalah 0,83; 0,90; 0,97; dan 0,17; 0,10; 0,03. Nilai H_o dan H_e masing-masing adalah 0,06–0,20 dan 0,06–0,28. Hasil penelitian ini berada dalam keseimbangan *Hardy-Weinberg* ($P > 0,05$). Pada sapi PD, sapi MD, sapi PI, sapi PO, sapi BH, sapi LM, dan sapi Bali hasilnya monomorfik (genotipe TT). Hasil sekuensing bagian promotor gen MSTN ditemukan mutasi perubahan T menjadi A pada posisi g-371. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa g-371T>A gen MSTN bersifat beragam yang potensial dijadikan marka genetik untuk sifat pertumbuhan jaringan otot pada sapi SM, sapi SO, dan sapi KT.

Kata kunci: SNP g.-371T>A gen MSTN, sapi Sumba ongole, sapi katingan, sapi Simmental

ABSTRACT

Myostatin (MSTN) gene acts as a negative regulator of muscle growth. The aim of the present study was to identify polymorphism of g.-371T>A in promoter region of MSTN gene in Indonesian beef cattle. Blood samples were collected from 191 cattle, including Bali (BL) (42), Madura (MD) (20), Pesisir (PI) (17), Katingan (KT) (16), Ongole grade (PO) (22), Pasundan (PD) (14), Sumba ongole (SO) (10), Brahman (BH) (17), Simmental (SM) (15), and Limousin (LM) (18). Polymorphism of MSTN gene was analyzed using PCR-RFLP (*Dral*) and direct sequencing methods. Results of genotyping g-371T>A were polymorphic (TT, TA, and AA genotypes) in Simmental, SO, and Katingan. The frequencies of alleles T and A were 0.83; 0.90; 0.97 and 0.17; 0.10; 0.03 respectively. The values of H_o and H_e were 0.06–0.20 and 0.06–0.28, respectively. The results of this study are in Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). Whereas in PD, MD, PI, PO, BH, LM, and BL were monomorphic (TT genotype). The result of sequencing the promoter region of MSTN gene found that mutations transversion was occurred in T to A at g.-371. It was concluded that g.-371T>A of MSTN gene was polymorphic which was potential to be used as genetic markers of muscle growth in SM, SO, and KT cattle.

Keywords: SNP g.-371T>A of MSTN gene, Sumba ongole cattle, Katingan cattle, Simmental cattle

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki sumber daya genetik ternak (SDGT) yang banyak, salah satunya dengan SDGT sapi pedaging (*beef cattle*) yang terdiri atas sapi Bali, Madura, Aceh, Sumbawa, pesisir, peranakan *ongole* (PO), Jabres, dan Sumba *ongole* (SO). Kekayaan SDGT perlu dilestarikan, dikembangkan, dan diman-

faatkan secara berkelanjutan untuk meningkatkan pendapatan dan kesejahteraan peternak serta memperkuat ketahanan pangan nasional. Kebijakan pengelolaan SDGT yang berkelanjutan merujuk pada tiga pendekatan, yaitu permurnian dan konservasi ternak, persilangan ternak, dan pengembangan bangsa baru. Beberapa sapi potong di Indonesia berpotensi untuk dikembangkan menjadi sapi potong unggul.

Selama ini, seleksi ternak berdasarkan sifat pertumbuhan dan kualitas daging telah dilakukan, tetapi hasilnya belum optimal karena masih berdasarkan data fenotipe. Seleksi berdasarkan data fenotipe menghasilkan peningkatan genetik yang lambat, terutama pada ternak yang interval generasinya lama, seperti sapi, kambing, dan domba. Pemetaan genome (DNA) melalui pendekatan *single*

¹ Jurusan Peternakan, Sekolah Tinggi Pertanian Kutai Timur, Jl. Soekarno Hatta, Tlk. Lingga, Sangatta Utara, Kutai Timur, Kalimantan Timur 75611

² Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

* Penulis Korespondensi:

Email: jakaria_karman@yahoo.co.id

nucleotide polymorphism (SNP) pada sapi dapat dijadikan pendekatan (*tool*) dalam mengetahui keterkaitan antara sifat kuantitatif dan variasi DNA yang memungkinkan seleksi ternak berdasarkan marka genetik atau disebut *marker assisted selection* (MAS) (Matukumalli *et al.* 2009).

Informasi polimorfisme SNP g.-371T>A di promotor gen MSTN dilaporkan berasosiasi dengan sifat kualitas daging dan pertumbuhan pada sapi Hanwoo Korea dan sapi lokal China (Zhang *et al.* 2007; Han *et al.* 2012). SNP ini berpeluang untuk dijadikan sebagai kandidat MAS dan belum diteliti pada sapi pedaging Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi SNP g.-371T>A gen MSTN pada bangsa sapi potong Indonesia.

METODE PENELITIAN

Sampel Sapi yang Digunakan

Penelitian dilakukan di Laboratorium Genetika Molekuler Ternak, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor. Sampel darah yang digunakan berasal dari koleksi laboratorium genetika molekuler ternak perwakilan sapi potong di Indonesia yang terdiri atas: sapi Bali, Madura, Pesisir, Katingan, PO, Pasundan, SO, Brahman, Simmental, dan Limousin (Tabel 1).

Ekstraksi dan Amplifikasi DNA

Sampel darah diambil dari *vena jugularis* dan disimpan dalam tabung *vacutainer* yang mengandung etanol absolut sebagai bahan preservatif. DNA genom diisolasi menggunakan metode *fenol-cloroform* yang dijelaskan oleh (Sambrook & Russel 2001). Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen MSTN adalah *forward*: 5'-CTGAGGGAAAAGCATATCAAC-3' dan *reverse*: 5'-ACTTGCCACACCAGTGAATC-3'. Primer dirancang berdasarkan sekuens Genbank dengan nomor akses AF348479 menggunakan *software* MEGA7 dan dievaluasi secara *online* menggunakan PCR *Primer Stats* (www.bioinformatics.org).

Amplifikasi fragmen gen dilakukan dengan menggunakan mesin *Thermal Cycler* merk *Esco*. Pereaksi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) terdiri atas: sampel DNA 1 µL (5 ng), 7,5 uL *promega green master mix*, 6,1 uL DW, 5 pmol primer *forward*, dan primer *reverse*. Suhu amplifikasi DNA terdiri atas: *predenaturasi* 95°C selama 5 menit, *denaturasi* 95°C selama 20 detik, *annealing* pada suhu 60°C selama 30 detik, ekstensi pada suhu 72°C selama 30 detik, ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Tahapan denaturasi sampai ekstensi diulang sebanyak 35 kali.

Penentuan Genotipe

Penentuan genotipe gen MSTN dilakukan menggunakan metode *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLP) dan sekuensing. RFLP dilakukan menggunakan enzim restriksi *DraI* (TTTIAAA). Hasil RFLP divisualisasi menggunakan gel agarose 2% dengan buffer 0,5 x TBE (*tris borax EDTA*) yang diwarnai dengan *fluorose*, gel difoto menggunakan UV *Transilluminator*.

Sekuensing dilakukan pada sampel sapi Bali dan Simmental yang mewakili genotipe yang berbeda sebanyak dua sampel untuk setiap genotipe. Sekuensing dilakukan dengan menggunakan mesin sekuenser (*ABI Prims 3100-Avant Genetic Analyzer*) pada fragmen primer *forward* melalui jasa perusahaan sekuensing *1st Base* di Selangor, Malaysia.

Analisis Data

- **Frekuensi genotipe dan alel**

Frekuensi genotipe merupakan rasio antara jumlah suatu genotipe dan jumlah populasi. Frekuensi genotipe dihitung berdasarkan rumus Nei & Kumar (2000) sebagai berikut: $X_{ii} = n_{ii}/N$, di mana X_{ii} = Frekuensi genotipe ke ii , n_{ii} = Jumlah sampel bergenotipe ii , dan N = Jumlah sampel. Frekuensi alel merupakan rasio antara suatu alel dan keseluruhan alel pada suatu lokus dalam populasi. Frekuensi alel dihitung berdasarkan rumus: $X_i = (2n_{ii} + \sum n_{ij})/2N$, di mana X_i = frekuensi alel ke i , n_{ii} = jumlah sampel

Tabel 1 Jumlah, bangsa, tahun koleksi, dan lokasi pengambilan sampel darah sapi potong yang digunakan dalam penelitian

Bangsa	Jumlah sampel	Tahun koleksi	Lokasi
Sapi Bali	42 ekor	2015	Pulau Bali
Sapi Madura	20 ekor	2011	Pulau Madura
Sapi Pesisir	17 ekor	2006	Sumatera Barat
Sapi Katingan	16 ekor	2010	Kalimantan Tengah
Sapi PO	22 ekor	2006	Jawa Barat
Sapi Pasundan	14 ekor	2014	Jawa Barat
Sapi SO	10 ekor	2006	Nusa Tenggara Timur
Sapi Brahman	17 ekor	2006	Jawa Barat
Sapi Simental	15 ekor	2006	Jawa Timur
Sapi Limousin	18 ekor	2006	Jawa Timur
Total	191 ekor		

bergenotipe ij , n_{ij} = jumlah sampel bergenotipe ij , dan N = jumlah total sampel (Nei & Kumar 2000).

• **Heterozigositas**

Keragaman genetik dapat diketahui melalui estimasi frekuensi heterozigositas pengamatan (H_o) yang diperoleh dari masing-masing populasi dihitung dengan rumus: $H_o = \sum_{i \neq j} \frac{n_{ij}}{N}$ di mana H_o = heterozigositas pengamatan, n_{ij} = jumlah sampel heterozigot dan N = jumlah sampel yang diamati. Heterozigositas harapan (H_e) dihitung dengan rumus:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^q x_i^2$$

Keterangan:

- H_e = Heterozigositas harapan
- x_i = Frekuensi alel dan
- q = Jumlah alel (Nei & Kumar 2000)

• **Keseimbangan Hardy-Weinberg (KHW)**

KHW dihitung dengan rumus:

$$X^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

Keterangan:

- X^2 = Chi-kuadrat
- O = Jumlah pengamatan genotipe ke- i
- E = Jumlah harapan genotipe ke- i .

Derajat bebas (db) untuk uji KHW $db = \text{jumlah kemungkinan genotipe} - \text{jumlah alel}$ (Allendorf *et al.* 2013).

Analisis Hasil Sekuensing

Hasil sekuensing gen MSTN dianalisis dengan software FinchTV dan BioEdit (Hall 2011). Penentuan

SNP menggunakan program *Molecular Evolutionary Genetic Analysis 7* (MEGA 7) (Tamura *et al.* 2011).

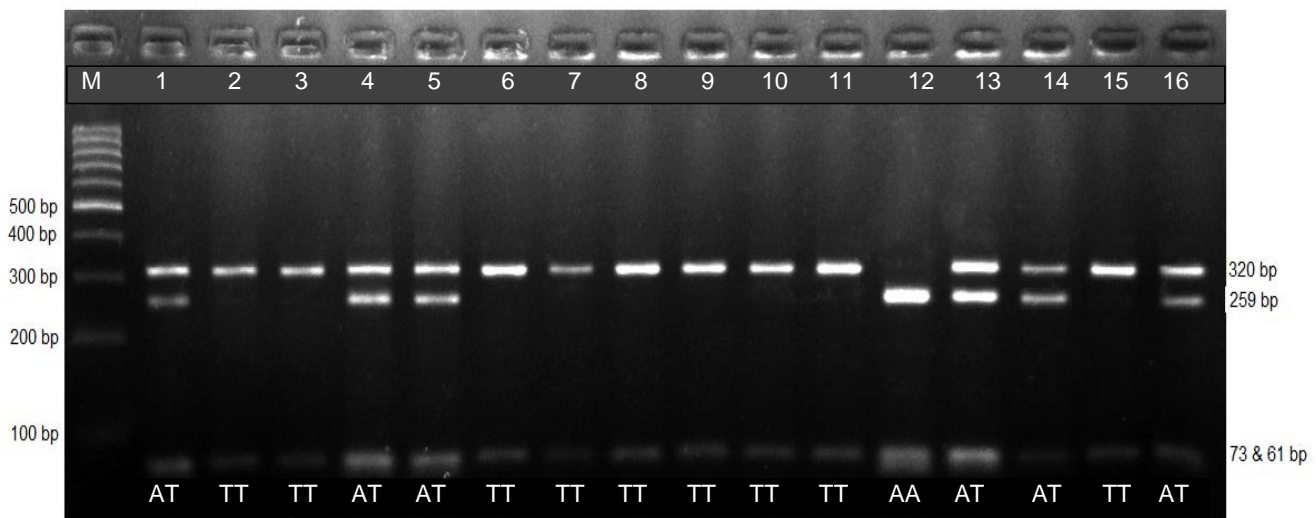
HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi dan Variasi g.-371T>A Gen MSTN

Gen MSTN berhasil diamplifikasi pada suhu *annealing* 60°C selama 30 detik menggunakan mesin *thermal cycler* merk *Esco*. Produk PCR gen MSTN yang dihasilkan adalah sebesar 393 bp. Polimorfisme gen MSTN dikenali oleh enzim restriksi *DraI* disebabkan oleh tranversi T menjadi A pada posisi g.-371 (dihitung dari *start* kodon ATG) yang terletak di bagian promotor (Crisa *et al.* 2003). Promotor merupakan daerah pada *deoxyribonucleic acid* (DNA) sebagai tempat pelekatan RNA polimerase yang mengawali proses transkripsi. Promotor berisi informasi untuk inisiasi dan transkripsi RNA sehingga berperan penting dalam ekspresi suatu gen (Gershon & Kadonaga 2010; Ohler & Wassarman 2010; Lenhard *et al.* 2012). Hasil penelitian menemukan tiga genotipe gen MSTN pada bangsa sapi potong Indonesia, yaitu genotipe TT, TA, dan AA seperti tersaji pada Gambar 1. Alel T tidak terpotong oleh enzim restriksi *DraI* (TTTAAA) yang ditandai dengan 2 pita, yaitu 320 dan 73 bp, sedangkan alel A yang terpotong oleh enzim restriksi *DraI* ditandai dengan 3 pita, yaitu 259, 73, dan 61 bp.

Frekuensi Genotipe dan Alel g.-371T>A Gen MSTN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa variasi g.-371T>A gen MSTN bersifat monomorfik pada sapi PD, sapi MD, sapi PO, sapi BH, sapi BL, dan sapi LM karena frekuensi salah satu alelnya kurang dari 0,01 (Nei & Kumar 2000; Allendorf *et al.* 2013). Frekuensi genotipe dan alel disajikan pada Tabel 2. Sementara itu, sampel sapi Katingan, sapi SO, dan



Gambar 1 Hasil PCR-RFLP bagian promotor gen MSTN menggunakan enzim restriksi *DraI* pada gel agarose 2%. M = marker DNA 100 bp. Sampel 1 sampai 16 = sampel sapi potong. Genotipe TT (320, 73 bp), AT (320, 259, 73, 61 bp), dan AA (259, 73, 61 bp).

sapi Simmental bersifat polimorfik karena frekuensi alel yang diperoleh lebih dari 0,01 (Nei & Kumar 2000; Allendroft *et al.* 2013). Frekuensi alel T yang tinggi pada bangsa sapi potong Indonesia yang diteliti diduga akibat seleksi dan manajemen perkawinan yang dilakukan oleh peternak, bahkan pada beberapa bangsa sapi hanya memiliki satu genotipe TT seperti pada sapi Pasundan, sapi Madura, sapi Pesisir, sapi PO, sapi Brahman, sapi Bali, dan sapi Limousin.

Gen MSTN merupakan anggota *superfamily transforming growth factor-β* (TGF-β) yang berfungsi sebagai inhibitor (*negative regulator*) pertumbuhan jaringan otot rangka (Miyake *et al.* 2010; Huang *et al.* 2011). Variasi g.-371T>A gen MSTN berasosiasi dengan sifat karkas sapi *Hanwoo* Korea dan sifat pertumbuhan pada Nanyang dan Qinchuan China (Zhang *et al.* 2007; Han *et al.* 2012) Sapi *Hanwoo* yang bergenotipe AA memiliki indeks kualitas daging yang lebih tinggi dan memiliki warna lemak punggung yang

lebih terang dibanding genotype T/- (Han *et al.* 2012). Frekuensi alel variasi g.-371T>A gen MSTN pada beberapa bangsa sapi di dunia disajikan pada Tabel 3.

Nilai Heterozigositas dan Keseimbangan Hardy-Weinberg

Variasi g.-371T>A gen MSTN pada bangsa sapi Katingan, SO, dan Simmental relatif rendah dengan nilai Ho dan He masing-masing berkisar antara 0,06–0,20 dan 0,06–0,28. Sementara itu, pada sampel bangsa sapi Pasundan, Madura, Pesisir, PO, Brahman, Bali, dan Limousin tidak dapat dianalisis karena monomorfik. Nilai heterozigositas pengamatan (Ho), heterozigositas harapan (He), dan keseimbangan Hardy-Weinberg (KHW) bangsa sapi potong Indonesia dapat dilihat pada Tabel 4. Nilai heterozigositas merupakan rata-rata persentase lokus heterozigot tiap individu atau rata-rata persentase individu heterozigot dalam populasi (Nei & Kumar 2000). Keragaman

Tabel 2 Frekuensi genotipe dan frekuensi alel g.-371T>A gen MSTN pada sapi potong Indonesia

Bangsa sapi	Jumlah sampel	Frekuensi genotipe			Frekuensi alel	
		TT	TA	AA	T	A
Sapi Simental	15	0,73	0,20	0,07	0,83	0,17
Sapi SO	10	0,80	0,20	0,00	0,90	0,10
Sapi Katingan	16	0,94	0,06	0,00	0,97	0,03
Sapi Pasundan	14	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
Sapi Madura	20	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
Sapi Pesisir	17	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
Sapi PO	22	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
Sapi Brahman	17	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
Sapi Limousin	18	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
Sapi Bali	42	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00

Tabel 3 Frekuensi alel g.-371T>A gen MSTN pada beberapa bangsa sapi di dunia

Bangsa	Spesies/jenis	N	Frekuensi alel		Referensi
			A	T	
<i>Bos taurus</i>	Sapi Belgian Blue	29	0,79	0,21	Crisa <i>et al.</i> 2003
	Sapi Brown Swiss	13	0,15	0,85	
	Sapi Chianina	40	0,14	0,86	
	Sapi Friesian Holstein	19	0,08	0,92	
	Sapi Limousine	10	0,05	0,95	
	Sapi Marchigiana	114	0,15	0,85	
	Sapi Italian Red Pied	11	0,05	0,95	
	Sapi Piedmontese	41	0,06	0,94	
	Sapi Romagnola	76	0,15	0,85	
<i>B. taurus x B. indicus</i>	Sapi Nanyang	210	0,05	0,95	Zhang <i>et al.</i> 2007
	Sapi Qinchuan	93	0,03	0,97	
	Sapi Jiaxian	108	0,04	0,96	
<i>Bos taurus</i>	Sapi Holstein	596	0,03	0,97	Han <i>et al.</i> 2012
	Sapi Jeju hitam	48	0,22	0,78	
	Sapi Hanwoo	212	0,12	0,88	
<i>Bos taurus</i>	Simental	15	0,17	0,83	Hasil penelitian
	Limosin	18	0,00	1,00	
	Sapi Katingan	16	0,03	0,97	
	Sapi Pasundan	14	0,00	1,00	
	Madura	20	0,00	1,00	
	Pesisir	17	0,00	1,00	
<i>Bos indicus</i>	Sapi PO	22	0,00	1,00	
	Brahman	17	0,00	1,00	
	Sapi Bali	42	0,00	1,00	

genetik suatu populasi dapat diukur menggunakan nilai heterozigositas yang bertujuan untuk membantu program seleksi (Marson *et al.* 2005).

Hasil analisis menunjukkan frekuensi variasi g.-371T>A gen MSTN pada bangsa sapi Katingan, SO, dan Simmental berada dalam keadaan keseimbangan *Hardy-Weinberg*. Suatu populasi ternak dinyatakan berada dalam keseimbangan apabila frekuensi genotipe dan frekuensi alelnya konstan dari generasi ke generasi yang diakibatkan oleh penggabungan gamet yang terjadi secara acak dalam populasi yang besar (Allendorf *et al.* 2013).

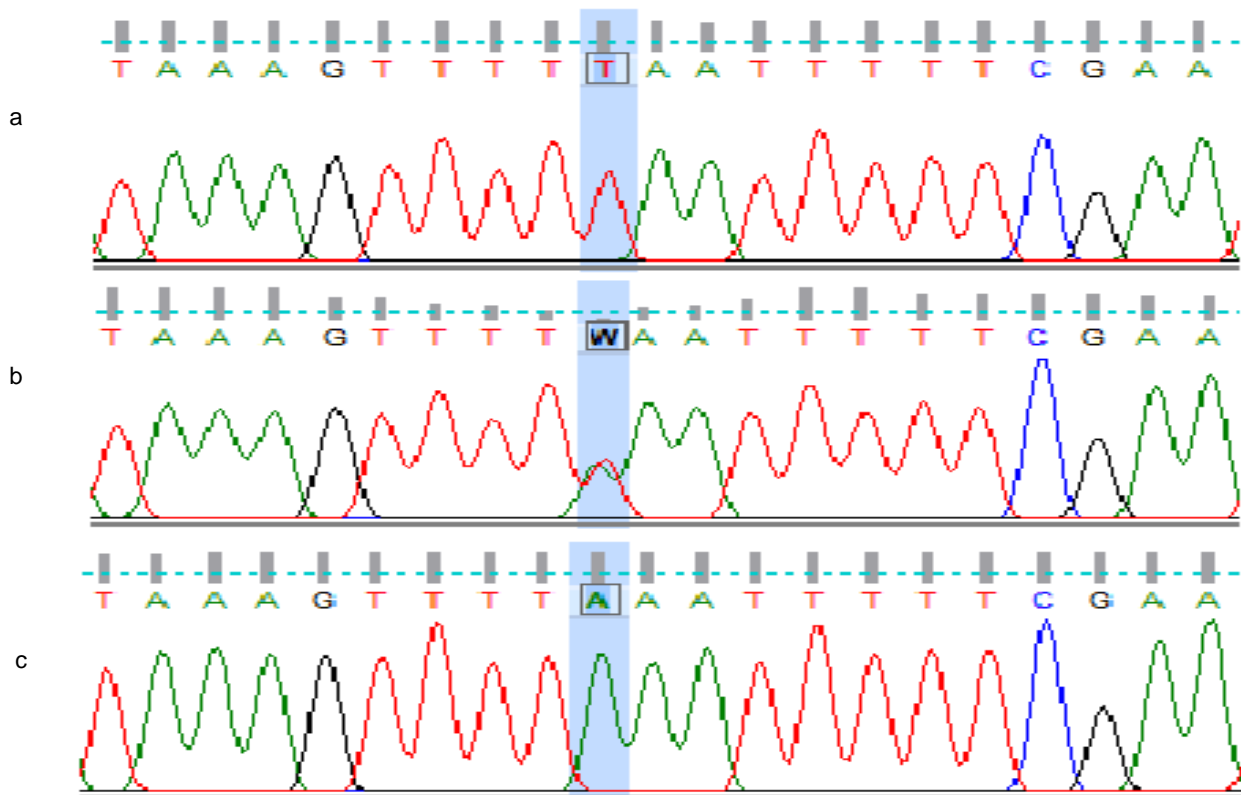
Hasil Sekuensing Bagian Promotor Gen MSTN

Hasil sekuensing ternak yang bergenotipe TT, TA, dan AA disajikan pada Gambar 2. Setelah dilakukan penyejajaran sekuens nukleotida dengan data GenBank (no akses AF348479.1 dan JQ711180.1) menunjukkan bahwa pada genotipe AA terjadi tranversi antara basa timin menjadi adenin (T>A) pada posisi nukleotida ke 134 (dihitung dari primer *forward*) atau pada posisi g.-371 (dihitung dari *start* kodon ATG) dari total genom gen MSTN. Mutasi transversi merupakan mutasi titik yang menyebabkan perubahan basa nitrogen yang tidak sejenis, contohnya

Tabel 4 Nilai heterozigositas dan keseimbangan *Hardy-Weinberg* pada bangsa sapi potong Indonesia

Bangsa sapi	Jumlah sampel	Heterozigositas		KHW
		Ho	He	
Sapi Simental	15	0,20	0,28	1,18 ^{tn}
Sapi SO	10	0,20	0,18	0,12 ^{tn}
Sapi Katingan	16	0,06	0,06	0,02 ^{tn}
Sapi Pasundan	14	0,00	0,00	-
Sapi Madura	20	0,00	0,00	-
Sapi Pesisir	17	0,00	0,00	-
Sapi PO	22	0,00	0,00	-
Sapi Brahman	17	0,00	0,00	-
Sapi Limousin	18	0,00	0,00	-
Sapi Bali	42	0,00	0,00	-
Total	191			

Keterangan: Ho = Heterozigositas pengamatan; He = Heterozigositas harapan; KHW = Keseimbangan *Hardy-Weinberg* (α 5% = 3.841); tn = Tidak nyata (χ^2 hitung < χ^2 tabel);



Gambar 2 Hasil sekuensing g.-371T>A bagian promotor gen MSTN. A) Genotipe TT; b) Genotipe TA; dan c) Genotipe AA; W : nukleotida T dan A.

perubahan basa purin dengan pirimidin (G>C, G>T, A>C, A>T) atau sebaliknya (Keller *et al.* 2007). Mutasi gen MSTN pada posisi g.-371T>A dikenali oleh enzim restriksi *DraI* (TTT|AAA). Semua produk PCR terpotong oleh enzim restriksi *DraI* pada posisi nukleotida ke 73 (dihitung dari *forward*) baik yang bergenotipe TT, TA, maupun AA sehingga ternak yang beralel A (terpotong oleh *DraI*) menghasilkan tiga fragmen sebesar 259, 73, dan 61 bp, sedangkan yang beralel T (tidak terpotong oleh *DraI*) menghasilkan dua fragmen sebesar 320 dan 73 bp.

KESIMPULAN

Gen MSTN g.-371T>A bersifat polimorfik pada sapi Simmental, SO, dan sapi Katingan. Sementara itu, pada sapi Pasundan, Madura, Pesisir, PO, Brahman, Limousin, dan Bali bersifat monomorfik. Polimorfisme g.-371T>A bagian promotor gen MSTN berpotensi untuk dijadikan sebagai kandidat marka genetik sifat pertumbuhan jaringan otot pada sapi Simmental, SO, dan Katingan.

DAFTAR PUSTAKA

- Allendof FW, Luikar G, Aitken SN. 2013. *Conservation and the genetics of population*. 2nd ed. Oxford (UK): Wiley-Blackwell.
- Crisa A, Marchitelli C, Savarese MC, Valentini A. 2003. Sequence analysis of myostatin promoter in cattle. *Cytogenet Genome Res*. 102: 48–52. <https://doi.org/10.1159/000075724>
- Gershon TJ, Kadonaga JT. 2010. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Developmental Biology*. 339: 225–229. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.08.009>
- Hall TA. 2011. BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci*. 2(1): 60–61.
- Han SH, Cho IC, Ko MS, Kim EY, Park SP, Lee SS, Oh HS. 2012. A promoter polymorphism of mstn g.2371T>A and its associations with carcass traits in Korean cattle. *Molecular Biology Reports*. 39: 3767–3772. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1153-z>
- Huang Z, Chen X, Chen D. 2011. Myostatin: A novel insight into its role in metabolism, signal pathways, and expression regulation. *Cellular signalling*. 23: 1441–1446. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.05.003>
- Keller I, Bensasson D, Nichols RA. 2007. Transition-transversion bias is not universal: a counter example from grasshopper pseudogenes. *PLoS Genet* 3(2): 0185–0191. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030022>
- Lenhard B, Sandelin A, Carninci P. 2012. Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nature Reviews Genetics*. 13: 233–245. <https://doi.org/10.1038/nrg3163>
- Marson EP, Ferraz JBS, Meirelles FV, Balieiro JCC, Eler JP, Figuerido LGG, Mourao GB. 2005. Genetic characterization of European-Zebu composite bovine using RFLP markers. *Genetica Molecular Research*. 4(3): 496–505.
- Matukumalli LK, Lawley CT, Schnabel RD, Taylor JF, Allan MF, Heaton MP, O'Connell J, Moore SS, Smith TP, Sonstegard TS, Van Tassell CP. 2009. Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. *PLoS*. 4(4):1–3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005350>
- Miyake M, Hayashi S, Taketa Y, Iwasaki S, Watanabe K, Ohwada S, Aso H, Yamaguchi T. 2010. Myostatin down-regulates the igf-2 expression via alk-smad signaling during myogenesis in cattle. *Journal of Animal Science*. 81: 223–229. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2009.00725.x>
- Nei M, Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York (US): Oxford University Press.
- Ohler U, Wassarman DA. 2010. Promoting developmental transcription. *Development*. 137: 15–26. <https://doi.org/10.1242/dev.035493>
- Sambrook J, Russell D. 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd ed. New York (US): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28(10): 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Zhang RF, Chen H, Lei CZ, Zhang CL, Lan XY, Zhang YD, Zhang HJ, Bao B, Niu H, Wang XZ. 2007. association between polymorphisms of mstn and myf5 genes and growth traits in three chinese cattle breeds. *AJAS*. 20(12): 1798–1804. <https://doi.org/10.5713/ajas.2007.1798>