

# Sıgırlarda Kalpain ve Kalpastatin Gen Polimorfizmlerinin Et Tekstürünün İyileştirilmesi Çalışmalarında Kullanımı

Süleyman Kök<sup>1</sup>, Sertaç Atalay<sup>2</sup>, Güldan Vapur<sup>3</sup>, M. İhsan Soysal<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Trakya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Edirne

<sup>2</sup>Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Merkez Laboratuvarı (NABİLTEM), Tekirdağ

<sup>3</sup>Trakya Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Edirne

<sup>4</sup>Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Tekirdağ

Geliş Tarihi / Received: 29.05.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 24.07.2019

**Özet:** Son yıllarda, tüketici tercihleri doğrultusunda et tekstürünün iyileştirilmesi konusuna ilgi artmış ve özellikle etçi sığır ırklarında bu özelliğini iyileştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Etin gevrekliğinden üç enzim;  $\mu$ -kalpain (CAPN1) ve m-kalpain (CAPN2) ile bunların inhibitörü olan kalpastatin (CAST) sorumludur. Yapılan çok sayıda çalışmada, kalpain-kalpastatin sisteminin normal iskelet kası gelişimi için önemli olduğu ve CAST ile CAPN1 lokuslarındaki bazı SNP'lerin et tekstürü ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Çalışmaların çoğunda, CAST ve CAPN1 gen polimorfizmleri ile *musculus longissimus dorsi* (MLD) kasının Warner Bratzler Shear Force (WBSF) tekstür bıçağının kesme direnci arasında bir ilişkinin olduğu belirlenmiştir. Et sığırcılığında, kalpain geni (CAPN1 316, CAPN1 530 ile CAPN1 4751) ve kalpastatin geni (UoG-CAST, CAST-T1) ile bu genlerdeki varyantlar et tekstürü için aday gen olarak kabul edilmektedir. Sığır eti kalite özelliklerinin erken yaşta belirlenmesi için bu SNP'ler önemli bir fırsat sağlamaktadır. Genetik marker teknolojisinin, çiftlik hayvanlarının genetik gelişimi için gelecek vaad eden umut verici bir araç olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** CAPN1, CAST, et tekstürü, polimorfizm, sığır

## The Use of Calpain and Calpastatin Gene Polymorphisms in the Improvement of Meat Texture in Cattle

**Abstract:** In recent years, interest in the improvement of meat tenderness in line with consumer preferences has increased and studies have been conducted to improve this feature especially in beef cattle breeds. Actually three enzyme which are  $\mu$ -calpain (CAPN1) and m-calpain (CAPN2) and calpastatin (CAST) as their inhibitor are responsible for the process of meat tenderization. Numerous studies have reported that, the calpain-calpastatin system is important for normal skeletal muscle development and that some SNPs in CAST and CAPN1 loci are associated with meat sensitivity. The important relationship also between CAST or CAPN1 gene polymorphism and Warner Bratzler Shear Force (WBSF) of *musculus longissimus dorsi* (MLD) has been determined in most of the studies. In beef cattle, calpain (CAPN1 316, CAPN1 530, CAPN1 4751) and calpastatin (UoG-CAST, CAST-T1) gene and their variants in these genes are accepted as candidate genes for meat tenderness. These SNPs provide an important opportunity to determine beef quality characteristics at an early age. The genetic marker technology is thought to be a promising tool for the genetic development of livestock.

**Key words:** CAPN1, CAST, beef tenderness, polymorphism, cattle

## Giriş

Günümüzde moleküler genetik alanındaki teknolojik gelişmelere paralel olarak, çiftlik hayvanlarını da kapsayan özgün moleküler genetik araştırma yöntemleri geliştirilmiş ve bu yöntemler pratik olarak hayvancılık işletmelerinde uygulanabilir hale gelmiştir. Özellikle canlılarda görülen polimorfizm ile ilgili moleküler genetik çalışmalar çiftlik hayvanlarında önem kazanmıştır. Polimorfizm, bir canlı popülasyonunda farklı allellere bağlı olarak

iki veya daha çok alternatif yapının görülmesidir ve tüm birey düzeyinde olabildiği gibi, proteinler (protein polimorfizmi) veya DNA düzeyindeki farklılıklar (nükleotid polimorfizmi) şeklinde de görülmektedir [8]. Evcil hayvanların kantitatif özelliklerini kontrol eden genleri ve bu genler ile fenotipler arasındaki ilişkilerin ortaya konmasını amaçlayan Evcil Hayvanların Genomigi (livestock genomic) ve Avrupa Sığır Genom Haritası (Bovine Gene Mapping Project, BovMap) projeleri ile sı-

ğırların markır genom haritaları çıkarılarak hayvan ıslahı çalışmalarında daha etkin araçlar haline getirilmiştir [3]. Avrupa Birliği tarafından finanse edilen başka bir proje kapsamında (GeMQual, QLRT-CT2000-0147, www.gemqual.org), Avrupa sığır ırklarındaki kantitatif verim özellikleri ile bu özellikleri determine eden aday genlerdeki Tek Nokta Polimorfizmleri (SNP) arasındaki ilişkiler belirlenmiştir. Et kalitesine etkisi olan SNP'ler de araştırmaya dâhil edilmiştir [19, 24, 38]. Bazı kantitatif özellikteki lokusların (QTL) moleküler olarak araştırılabilmesi hayvanların damızlık değerlerinin önceden tahmin edilmesinde daha ayrıntılı ve objektif veriler sağlayabileceği bildirilmektedir [42, 46]. Et sığırcılığında yaygın kullanım alanı olan gen markırları, bir genin (coding ve/veya non-coding bölge) DNA dizisindeki et verimi veya kalitesi ile ilişkili varyantlar olarak tanımlanmaktadır [17]. Tüketici memnuniyeti üzerinde büyük bir etkiye sahip olan et tekstürü, et kalitesinin önemli bir göstergesi olup sığır eti üretiminde en önemli konulardan biridir [36]. Et tekstürü, tüketim açısından, özellikle parça etlerde çok büyük öneme sahiptir. İnsanın eti çiğneme ve yeme özelliğine en yakın tekstür ölçümünü yapan Warner Bratzler Shear Force (WBSF) cihazıdır [22]. Kesim sonrası ette, artan kalsiyum aktivitesi ile et tekstürü arasındaki olumlu ilişkiden  $\mu$ -kalpain (CAPN1) ve m-kalpain (CAPN2) ile bunların inhibitörü olan kalpastatin (CAST) enzimleri sorumludur [25, 31]. Çiftlik hayvanların normal iskelet kas gelişimi için de etkili olan CAPN1 ve CAST genleri, etlerin tekstürü ile ilgili aday genler olarak kabul edilmektedir [43]. Aday genlerin QTL'ından faydalanılarak, etçi sığırların karkas ve et kalitesini geliştirmek için erken yaşta markır destekli seleksiyonla (MAS) damızlık seçimi mümkündür [39, 48]. Sığır ıslahında, genetik markırların kullanılmasıyla yapılan endirekt seleksiyon yöntemi hayvan ıslahının etkinliğini arttırmaktadır [23]. Islah edilmesi istenen et tekstürüne ilişkin gen markırlarının kullanımı ile seleksiyonda isabet derecesinin arttırabileceği düşünülmektedir [21]. ABD'de genetik markırlar kullanılarak et tekstürünün iyileştirilmesini amaçlayan bir seleksiyon programı ile hedeflenen başarının elde edileceği ve 20 yıl sonunda 7.6 milyar dolarlık ekonomik fayda sağlanacağı hesaplanmıştır [49]. Et tekstürüne ilişkin fenotipik testler, genellikle WBSF tekstür cihazıyla *MLD* kasına kesimden 7., 14. ve 21. gün sonra yapılan kesim

işleminde uygulanan kuvvetin şiddetine göre yapılmaktadır [13]. Ancak, sığır eti gevrekliğini (tekstürünü) tanımlamak için WBSF değerlerine ilişkin bir referans aralığı geliştirilmemiştir. Referans olarak, sığır ırkları arası veya ırk içi markır genotiplerinden kaynaklı bireysel farklılıklara bağlı oluşan WBSF (kg/cm<sup>2</sup>) verileri tartışılmaktadır. Irk içi veya ırklar arası ölçülen sığır etlerinin WBSF değerleri yüksek olanlar, kas lif direnci yüksek etler olup sert olduğu, ölçülen düşük WBSF değerindeki etler ise tekstür bakımından iyi et olarak değerlendirilmektedir [50]. Ayrıca Tenderometer cihazı (Tenderometer score, kPa=Kilopascals) ile de et tekstürü belirlenebilmektedir [37]. Bu derlemede sığırlarda et tekstürü ile CAST ve CAPN1 genleri arasındaki ilişkinin etkisi ortaya konularak, bu genleri et tekstürünün iyileştirilmesinde markır olarak kullanılıp/kullanılmayacağı sorusuna cevap aranması amaçlanmıştır.

### 1. Kalpastatin Geni (CAST)

Sığırlarda 7. kromozom (BTA7) üzerinde bulunan CAST geninin et tekstürü üzerine etkili olduğu, farklı genotipteki bireylerin farklı kesme kuvveti değerlerine (WBSF) sahip olduklarının ortaya konulması ile bu gen et tekstürü için aday gen olarak kabul edilmiştir [7, 13, 48]. CAPN'in nötr bir proteaz inhibitörü olan CAST, endojen CAPN inhibitörü olarak hücrede CAPN aktivitesinin düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar ve CAPN haricinde diğer proteazları inhibe etmez. [30].

CAST et tekstürü üzerine dolaylı yoldan, yani CAPN üzerinden etki gösterir. CAST, CAPN ile beraber hücre sitozolünde ve membranda bulunur. CAST dört adet inhibitör bölge içerir ve 1 molekül CAST 4 molekül CAPN'i inhibe eder [6]. Proteazları CAPN1 ve CAPN2'dir. Kesim sonrası soğuk hava depolarında etin olgunlaşması ve gevrek hale gelmesinde, ayrıca proteolitik sistemde anahtar rolü oynamaktadır [26, 27]. CAST geni, karkasın yağlanması üzerine de etki etmektedir [28, 52].

CAST geni içindeki SNP'ler belirlenmesi amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Juszczuk-Kubiak ve ark.[28] sığır CAST lokusunun 12. intron içinde (*AluI*, *BseYI* ve *NdeI* enzimleri kullanılarak) 4 SNP belirlemişlerdir. *Bos taurus* sığırların CAST geninde çalışan Allais ve ark. [2] da 8. intron içinde CAST-1 (A/G positions 97531815 on Btau 4.0) ve 30. Ekzon içinde 3'UTR de CAST-3 (A/G positions 97576054 on Btau 4.0) iki yeni SNP belirlemiştir.

*Bos indicus* sığırlarda, et tekstürü ile ilişkilendirilen CAST geninde CAST-brahman olarak adlandırılan 3'UTR de bir A/T SNP [3, 18] ve melezlerin de de (*Bos taurus* × *Bos indicus*) bir C/T (Adenin/Guanin) SNP belirlenmiştir [3, 9, 18]. Sığır CAST geni 3'UTR bölgesinde, PCR-RFLP metodu ile *TaqI*, *BamHI* [10, 35] ve *EcoRI* [35] endonükleazlar kullanılarak SNP'ler belirlenmiştir. 5 farklı restriksiyon enzimiyle (*BglII*, *DraI*, *PstI*, *EcoRI* ve *BamHI*) çalışan Lonergan ve ark. [35], yalnız *EcoRI* ve *BamHI* restriksiyon enzimlerinin kesim yaptığı yerlerin polimorfik olduğunu ve bu polimorfizme-

rin et tekstürü için gen markırı olarak kullanılması gerektiği, ancak diğerlerinin monomorfik olduğu sonucuna varmışlardır.

*Bos taurus* ve *Bos indicus*'ların CAST geninde, et tekstürü ile olumlu ilişkisi genellikle UoG-CAST [13, 16, 20, 34, 42, 43, 45] ve CAST-T1 [2, 3, 11, 13, 37, 47, 48] adı verilen iki markır SNP üzerinde yoğunlaşmıştır. Sığır CAST ve CAPN1 genleri içinde et tekstürü ile ilişkili olduğu bildirilen SNP'lerin bazılarının isimleri ve gevreklik için olumlu allel frekansları Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Sığır CAST ve CAPN1 genlerinde et tekstürü ile ilişkili olduğu bildirilen SNP'lerin bazıları ve et tekstürü için olumlu allel geni frekansları

Gen İsmi	Kromozom	SNP Markır İsmi	Markırın Yayınlardaki Diğer İsmi	Markırın Yeri	Pozisyonu (Btau 4.0)	Genbank Erişim Numarası Ve Baz Uzunluğu	SNP	Et Tekstürü İçin Olumlu Gen Markırı Alleli ve Frekansları (%)	Kaynak Araştırmacı	
<sup>1</sup> CAST	7	CAST-1	-	Intron 8	97531815		A/G	G (75-86)	[2]	
		CAST-2	CAST-T1	Ekzon 30 (3'UTR)	97574736 97574679		A/T A/G	G (17-23)	[2, 3]	
		CAST-3	-	Ekzon 30 (3'UTR)	97576054		A/G	G (23-35)	[2]	
		UoG-CAST	CAST RsaI	İntron 5		AY008267-282	G/C	C (62.9-75)	[12, 20, 34, 43, 45, 48]	
		CAST-T1		Ekzon 30 (3'UTR)		AF159246-2959	A/G C/T	A (71.8-99.5) T (72-65.8)	[3, 9, 11, 14, 37, 42, 47, 48]	
		CAST		İntron 6			A/B	B (58)	[1]	
		CAST		Ekzon ve intron1'in L bölgesi			L14450-622	M/N	M (73 Holstein, 22.5 Manda)	[53]
		CAST gen SNP2870					AF159246	A/G	A (33-53)	[11]
		CAST-Brahman			3'UTR	97574736		A/T	A (97,1)	[18]
<sup>2</sup> CAPN1 (μ-calpain)	29	CAPN1-1	-	Ekzon 6	45219395		A/G	G (47-80)	[2, 41]	
		CAPN1-2	CAPN 316	Ekzon 9	45221250	AF252504-5709	G/C	C (3.1-68)	[2, 11, 12, 13, 20, 33, 37, 40, 41, 42, 47, 48]	
		CAPN1-3	CAPN 530	Ekzon 14	45237834	AF248054-4558	A/G	G (63-91)	[2, 11, 12, 40, 41]	
		CAPN1-4	-	İntron 19	45241089		A/G	G (45-63)	[2, 41]	
			CAPN 4751	Intron 17			AF248054-6545	C/T	C (5-64)	[9, 14, 20, 33, 42, 47, 48, 51]
		5331 ve 4753	İntron 21					[8, 51]		

<sup>1</sup>Kalpastatini ilk Bishop ve ark.[7]; <sup>2</sup>Kalpaini ilk Smith ve ark. [46] aday gen olarak kabul etti; UTR = Çevrilmemiş bölge.

### 1.1. UoG-CAST (CAST/RsaI) Polimorfizmi

Sığır CAST geninin 5. ve 6. ekzonları arasındaki Sitozin/Guaninin (G/C) bazlarının değişimine

UoG-CAST polimorfizmi (AY\_008267.1:g282C>G SNP) adı verilmiştir [45]. Aynı polimorfizm CAST/RsaI olarak ta bilinir [34, 43]. CAST/RsaI poli-

morfizminin belirlenmesi amacıyla yapılan PCR-RFLP işlemi sonunda %2 yoğunluktaki agaroz jel elektroforezi ile bireylerin genotipleri belirlenir. Elektroforez sonunda CC genotipli bireylerde 523 bp (baz çifti) uzunluğunda bir bant, GG genotipli bireylerde 257 ve 266 bp uzunluğunda iki bant ve GC genotipli bireylerde ise 523, 257 ve 266 bp uzunluğunda üç bant görülür [13, 34, 45]. UoG-CAST SNP'de et tekstürüne olumlu etkisi olan allel C allelidir [13, 32, 45]. Schenkel ve ark. [45] *Bos taurus* sığırlarına ilişkin bildirdiği frekans sonuçları ile Trakya'dan örnek alınan (Boz Irk ve melezleri) *Bos taurus* frekans sonuçları benzerdir [34]. Quaes ve ark. [42], Van Eenennaam ve ark. [48], Gill ve ark. [20], Curi ve ark. [13] ve Reardon ve ark. [43]. *B. taurus* sığırlarının melez populasyonlarında C allelinin ortalama frekanslarının sırasıyla; %72, %72, %64, %69.3 ve %75 olduğunu ve saf Boz Irk sığırların C allel frekansından (%50.7) daha yüksek olduğu görmüŐlerdir [34]. Gill ve ark. [20] tarafından Aberdeen Angus sığırlarda (0.64) ve Curi ve ark. [13] tarafından *Bos indicus* sığırların saf Nellore ırkında (0.623) bildirilen C allel frekansı, Boz Irk × İŐvire Esmeri melez sığırlarda belirlenen frekansa (0.623) benzerlik göstermiŐtir.

Kök ve ark. [34] saf Boz Irk sığırlarda UoG-CAST CC, CG ve GG genotip frekanslarını sırasıyla 0.257, 0.499 ve 0.243 olarak belirlemiŐken, Boz Irk × İŐvire Esmeri G<sub>1</sub> melez sığırlarda sırasıyla; 0.388, 0.470 ve 0.142 olarak belirlemişlerdir. Aynı genotipik frekansları saf Aberdeen Angus ırkı sığırlarda sırasıyla 0.410, 0.470 ve 0.120 [20], *Bos taurus* ırkından olan melez sığırlarda; 0.430, 0.398 ve 0.172 [45] ve *Bos indicus*'tan köken alan Nellore ırkına ait örneklerde ise 0.377, 0.491 ve 0.132 olarak belirlemişlerdir [13]. Bu veriler dikkate alındığında Türkiye'de yetiŐtirilen yerli bir ırk olan Boz ırkta et tekstürü için olumlu CC genotip frekansının düşük olduğu görülmektedir.

Saf Angus, Limuzin, Şarole, Simental ve melezlerinde, kesim sonrası 21. günde *MLD* kasına uygulanan WBSF (kg/cm<sup>2</sup>) ortalaması, tüm örnek alınan sığır ırkların CC genotipli bireylerde 4.53 ± 0.12 kg/cm<sup>2</sup> olduğu ve GG genotipli bireylerle arasındaki farkın (-0.34 ± 0.13 kg/cm<sup>2</sup>) istatistiksel olarak önemli (P<0.05) olduğu bildirilmiştir [45]. Curi ve ark. [13] *B. Indicus*'tan köken alan Nellore ve *B. taurus* × *B. indicus* melez sığırların *MLD* kasındaki

WBSF ortalamasını CC genotipinde 3.47±0.007 kg/cm<sup>2</sup>, CG genotipinde ise 3.63±0.07 kg/cm<sup>2</sup> olduğu ve farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu (P<0.05) bildirmiŐlerdir. Türkiye'de yetiŐtirilen yerli Boz Irk sığırlarında *MLD* kasına uygulanan WBSF ortalamasının 3.943±0.441 kg/cm<sup>2</sup> olduğu bildirilmiştir [32]. Bu veriler ile daha önce saf Angus, Limuzin, Şarole, Simentalve melezinden elde edilen WBSF verileriyle [13, 20, 32, 45, 48] karŐılaŐtırıldıĖında, Boz Irk etinin daha gevrek olduğu, buna karŐın *B. indicus* (Nellore) ve *B. taurus* × *B. indicus* ırklarına ait WBSF verileriyle [13] karŐılaŐtırıldıĖında Boz Irk'tan elde edilen etlerin daha sert olduğu gözlenmiŐtir. *B. indicus* ve *B. taurus* × *B.indicus* melezlerin de postmortem dönemde *MLD* kasına uygulanan kesme direnci ile UoG-CAST (CAST/*RsaI*) polimorfizmi yönünden CC genotipi arasında pozitif bir ilişki olduğu, CC genotipli bireylerin etlerinin CG ve GG genotipli bireylere göre daha gevrek olduğu bildirilmiştir [13, 20, 32, 45, 48].

## 1.2. CAST-T1 (CAST/*DdeI*) Polimorfizmi

Sığır CAST geninin CAST-T1 polimorfizmi iki farklı genetik varyant olarak tanımlanmıŐtır [2, 3, 11, 13, 37, 47, 48]. Bunlardan biri genin 30. ekzonunda (2959A>G) bulunurken diğeri genin 3'UTR bölgesinde (C/T) bulunan polimorfizmdir. Yapılan bir PCR-RFLP iŐlemin sonunda 30. ekzonda bulunan polimorfizm yönünden GG genotipli bireylerde 269 bp uzunluğunda bir bant, AA genotipli bireylerde 132 ve 137 bp uzunluğunda iki bant ve AG genotipli bireylerde ise 132, 137 ve 269 bp uzunluğunda   bandın elde edildiği bildirilmiştir [14]. *B. taurus* ve *B. taurus* × *B. indicus* sığır ırkı sürülerinde QTL alıŐan araŐtırmacıardan Van Eenennaam ve ark. [48], Smith ve ark.[47], Casas ve ark. [9], Curi ve ark. [14] ve Morris ve ark. [37] et tekstürü için olumlu CAST-T1 SNP'de ortalama A allel frekansını sırasıyla; %72, %65.8, %16.7-28.1, %71.8 ve %84.4-99.5 olarak belirlemişlerdir.

Curi ve ark. [14] *B.indicus* (Nellore) ve *B. taurus* × *B. indicus* melez sığırlarda 3'UTR bölgesinde CAST-T1 TT genotipli bireylerde *MLD* kası WBSF kesilme direnci etkisini ortalama 3.46±0.07 kg/cm<sup>2</sup> ve diğer genotiplere (TC, CC) oranla farkın önemli (P < 0.05) olduğunu belirlemiştir. Kesim sonrası 14. günde et tekstürünü belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda, CAST-T1 TT genotipindeki Brahman

ırkı danaların WBSF ortalaması  $3.74 \pm 0.06$  kg/cm<sup>2</sup> olduğu [47] ve aynı ırk üzerine çalışan Casas ve ark.'nın [9] yaptığı araştırma ile uyumlu olup TT genotipindeki sığır etlerinin diğer genotipteki sığır (CC, CT) etlerinden daha gevrek etli olduğu belirlenmiştir ( $P < 0.05$ ).

### 1.3. Diğer CAST Geni Polimorfizmleri

*Bos indicus* sığırların CAST geninin 3'UTR bölgesindeki "CAST-Brahman SNP" adı verilen nükleotid polimorfizminde, AA genotipindeki Brahman sığırların diğer genotiplere (AT, TT) göre daha gevrek et ürettiği belirlenmiştir [18]. *B. taurus* sığırların CAST geninin 12. intronunda üç SNP (*AluI* T/C, *BseI* T/A ve *NdeI* A/G) de yapılan çalışmaları ile de *NdeI* A allelini taşıyan ve TTA/TTG haplotipindeki sığırların diğerlerine nazaran daha gevrek etli olduğu belirlenmiştir [27]. CAST geninin diğer SNP'lerindeki yapılan çalışmalarda, Holstein sığırı ile mandaların CAST geninin (L14450-622) L Ekzon bölgesinde ve 1. intron'un da birer M/N polimorfizmi (M allel frekansı Holstein'da %73 ve Manda'da %22.5) [53], Nellore sığır ırkının CAST geninin 6. intron'unda da bir A/B polimorfizmi (B allel frekansı %58) [1], *B. taurus* sığırların CAST geni SNP2870 (AF159246) A/G polimorfizmi (A allel frekansı %33-53) [11] ve İrlanda et ırkının Calpain II polimorfizmleri [12] ile et tekstürü arasında olumlu bir ilişki kurulamamıştır ( $p > 0.05$ ).

### 2. Kalpain Geni (CAPN)

Canlı hayvanlarda sarkoplazmada inaktif halde bulunan kalpainler kesim sonrasında etin pH değerinin düşmesiyle aktif hale geçerler. Kalpainler doğal proteinazlar olarak kalsiyuma bağlı aktivite göstermekte, miyofibriler proteinleri denatüre ederek etin tekstürünü arttırlar. Kalpainlerden, CAPN 1 ve 2'nin lokuslarındaki SNP genotiplerine [4, 8, 33, 41, 51] göre etin tekstürüne olan olumlu ya da olumsuz etkileri [14, 48] tespit edilmesine rağmen, diğer kalpainlerin (CAPN 5, 7, 10, 12, 14, 15) etkileri tam olarak belirlenememiştir [37].

Kalpain I (CAPN1)'in aktif hale geçmesi, normal olarak kesimden yaklaşık 6 saat sonra veya pH 6.3'e düştüğünde olmaktadır [29]. Kalpain II (CAPN2) ise yaklaşık olarak 16 saatte aktif hale

gelmekte, ancak kısmi aktivite göstererek büyük bir kısmı ette inaktif halde kalmaktadır [29, 45]. Aktif CAPN hücre zarında, CAST ise hücre zarında ve sitoplazma da bulunur [26]. Sığır etinin tadı, suluğu, tekstürü et kalite parametreleri üzerine ayırt edilemez etkisi, karmaşık seleksiyon işlemleri yerine özellikle CAPN1 geni lokuslarındaki polimorfizmleri kıymetlendirmektedir. SNP çalışmasıyla alınan genotipik sonuçların MLD'ye uygulanan WBSF testleriyle fenotipe direk etkisi kanıtlanmıştır [14, 48]. CAPN geni 29'uncu kromozom üzerinde bulunmaktadır [46]. Page ve ark. [41] CAPN1 geni amplikasyonu için 38 primer çifti kullanmış ve 10 SNP içinden yalnız CAPN1 316 ve CAPN1 530 markırlarını et tekstürü ile ilişkilendirmiştir. CAPN1 geninde et tekstürü ile ilişkili olan markırlardan üçü (CAPN 316, CAPN 530 ve CAPN1 4751) üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır [4, 8, 33, 41, 51].

#### 2.1. CAPN1 316 Polimorfizmi

CAPN 316 SNP (AF\_252504.2:g.5709C>G), CAPN1 geni içinde 9. Ekzon da bir Guanin/Sitozin (G/C) baz değişiminden kaynaklı genin 316. amino asitinde (Glisin/Alanin) protein polimorfizmine neden olmaktadır [2, 13, 33]. CAPN 316 SNP polimorfizminin belirlenmesi amacıyla yapılan Amplifikasyon Reflektör Mutasyon Sistemi-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (ARMS-PCR) işlemi sonunda %2 yoğunluktaki agaroz jel elektforezi ile bireylerin genotipleri belirlenir. Elektforez sonucunda CC genotipli bireylerde 228 ve 466 bp uzunluğunda iki bant, CG genotipli bireylerde 446, 269, 228 bp uzunluğunda üç bant, GG genotipli bireylerde ise 446 ve 269 bp uzunlukta ikişer bant olarak gözlenirler [13, 33, 44]. CAPN 316 C allel frekansı, *B. taurus* ve *B. indicus* sığırlarında et tekstürü ile olumlu bir ilişkisi olduğu belirlenmiştir [8, 13, 20, 37, 41, 48, 51]. *B. taurus* ve *B. taurus* × *B. indicus* melez sığırlar da CAPN 316 SNP'nin et tekstürü için olumlu C alleli frekansını; Kök ve ark. [33], Curi ve ark. [13], Page ve ark. [40], Smith ve ark. [47], Gill ve ark. [20], Allais ve ark. [2], Corva ve ark. [11] ve Morris ve ark. [37] sırasıyla %11, %6, %17-20, %3.1, %22, %4-27, %29-46 ve %23-68 olarak belirlemişlerdir (Tablo 2).

**Tablo 2.** Bazı hayvan ırkları ve melezlerinde et tekstürü ile ilişkili Kalpastatin geni (CAST) ile Kalpain geninde (CANP1) 316 ve 4751 SNP alleli ve genotipik frekansları

İrklar	Hayvan sayısı	UoG-CAST (CAST/RsaI) Allel frekansı		UoG-CAST (CAST/RsaI) Genotip Frekansı			Araştırmacılar
		C	G	CC	CG	GG	
Boz Irk	71	0.507	0.493	0.257	0.499	0.243	Kök ve ark. [34]
Boz Irk × Esmer İsviçre G <sub>1</sub> Melez	61	0.623	0.377	0.388	0.470	0.142	
AberdeenAngus	443	0.640	0.360	0.41	0.470	0.120	Gill ve ark. [20]
<i>B. taurus</i> × <i>B. Indicus</i> Melezi	300	0.693	0.307	0.487	0.413	0.100	Curi ve ark. [13]
		CAST-T1 Allel frekansı		CAST-T1 Genotip Frekansı			
		A	G	AA	AG	GG	
Nellore	114	0.557	0.443	0.342	0.430	0.228	Curi ve ark. [14]
Canchim	41	0.695	0.305	0.448	0.415	0.097	
		T	C	TT	CT	CC	
Simental Melezleri	20	0.900	0.100	0.800	0.200	0.000	Frylinck ve ark. [18]
		CAPN 316 (μ-calpain) Allel frekansı		CAPN 316 (μ-calpain) Genotip Frekansı			
		C	G	CC	CG	GG	
Aberdeen Angus	443	0.220	0.78	0.050	0.350	0.610	Gill ve ark.[20]
Brahman Melezleri	20	0.025	0.975	0.000	0.050	0.950	Frylinck ve ark. [18]
Simental Melezleri	20	0.050	0.950	0.000	0.100	0.900	
<i>B. taurus</i> × <i>B. indicus</i> Melezleri	300	0.060	0.940	0.000	0.120	0.880	Curi ve ark. [13]
Boz Irk	130	0.110	0.890	0.012	0.198	0.789	Kök ve ark. [33]
		CAPN 4751 Allel frekansı		CAPN 4751 Genotip Frekansı			
		C	T	CC	CT	TT	
Aberdeen Angus	439	0.650	0.350	0.410	0.480	0.110	Gill ve ark.[20]
Nellore	114	0.105	0.895	0.000	0.210	0.790	Curi ve ark. [14]
Canchim	41	0.205	0.646	0.073	0.561	0.366	
Brahman Melezleri	20	0.184	0.816	0.530	0.263	0.684	Frylinck ve ark. [18]
Simental Melezleri	20	0.225	0.775	0.050	0.350	0.600	
Boz Irk	130	0.565	0.435	0.320	0.491	0.189	Kök ve ark. [33]

Page ve ark. [40] Amerikan Simental, Angus, Hereford ve melez ırkların CAPN 316 CC genotipine sahip olanlarının etlerinin diğer genotiptekilerden (GC ve GG) daha gevrek olduğunu belirlemiştir. Piedmontese ve Angus sığırlarda GG genotiplilerin kesim sonrası 14. günde ortalama WBSF değerini  $3.34 \pm 0.05$  kg/cm<sup>2</sup> olarak belirlenmiştir [41]. CC genotipindeki sığır etlerine WBSF değerini belirlemek için uygulanan kesme kuvveti CG genotiplilerden %10 ve GG genotiplilerden %14.6 daha fazla olduğu bildirilmiştir [11]. Allais ve ark. [2] en sert etlerin G alleli taşıyan Şarole ırkında gözlemiştir (P=0.01). Benzer durum Brahman ırkı için de geçerlidir [20]. CG genotipli Brahman tosunlarda kesim sonrası 14. günde belirlenen WBSF değeri  $3.50 \pm 0.15$  kg/cm<sup>2</sup> dir. [47]. Boz ırk sığır örneklerinde çalışan Kök ve Atalay [32] da, CAPN1 316-GC genotipli sığırlarda ortalama WBSF değerini  $3.869 \pm 0.721$  kg/cm<sup>2</sup>, CAPN1 316-GG genotipindeki sığırlarda ise

$4.565 \pm 1.102$  kg/cm<sup>2</sup> olarak belirlemiştir. Costello ve ark. [12], İrlanda et ırkında CC genotipli sığırlarda kesimden sonraki 14. günde belirlenen düşük WBSF değeri ile arasında olumlu bir ilişki kurmuş (P<0.05) ve araştırmacılar GC genotipindeki sığırların etlerinin GG genotipindekilere göre daha gevrek yani tekstür bakımından iyi olduğunu ve elde edilen bulguların Page ve ark. [40]'nın sonuçları ile benzer olduğunu gözlemlemişlerdir

## 2.2. CAPN1 4751 Polimorfizmi

CAPN1 4751 (AF\_248054.2:g.6545C>T), CAPN1 içinde 17. intron da 6545. pozisyonda bir (C/T) sitozin/timin bazlarının yer değişimine bağlı tek nükleotid polimorfizmdir [14]. CAPN 4751 SNP polimorfizminin belirlenmesi amacıyla yapılan ARMS-PCR işlemi sonunda %2 yoğunluktaki agaroz jel elektreforezi ile bireylerin genotipleri belirlenir. Elektreforez sonucunda 334 bp uzunluğundaki he-

def DNA parçası ile birlikte C alleli 158 ve T alleli 231 bp uzunluğunda bantlar oluşturur. Dolayısıyla CC genotipli bireylerde 334 ve 158 bp uzunluğunda iki bant, CT genotipli bireylerde 334, 231 ve 158 bp uzunluğunda üç bant, TT genotipindeki bireylerde 334 ve 231 bp uzunlukta iki bant olarak agaroz jelde gözlenirler [14, 33].

Et tekstürü için olumlu etkileri bulunan CAPN1 4751 C alleli ortalama frekansını; Kök ve ark. [33] Boz Irk sığırlarda %56.5, White ve ark. [51] *B. taurus* sığırlarda %57.5-63.9 aralığında, *B. Indicus* sığırlarda %10.8, Smith ve ark. [47] Brahman tosunlarda %5.0, Van Eenennaam ve ark. [48] Şarole × Angus, Brangus, Kırmızı Angus, Brahman, Hereford sığır popülasyonlarında %6.0 - 64.0 aralığında, Curi ve ark. [14] Nellore, Angus × Nellore, Rubia Gallega × Nellore, Canchim, Brangus melezleri ve Braunvieh ırkları üzerine yaptığı çalışmada popülasyon ortalamasını %20.5 (%10.5 – 42.1) olduğunu belirlemiştirler (Tablo 2).

Sığırlar da, CAPN1 4751 SNP genotiplerine göre et tekstürüne olan etkisini WBSF bıçağı kullanarak yapılan araştırmalarda; CAPN1 4751-CT genotipli Brahman sığır örneklerinde WBSF değerini ortalamasını  $3.64 \pm 0.11$  kg/cm<sup>2</sup> [47], CT genotipteki Nellore sığırların ortalamasını  $3.43 \pm 0.08$  kg/cm<sup>2</sup> ve TT genotipteki sığırlara göre WBSF değerini daha küçük ve farkı önemli ( $P < 0.05$ ) bulmuşlardır [14]. CAPN1 4751-CC genotipinde örnek hayvan olmadığı için değerlendirememişlerdir [14, 47]. CAPN1 4751-TT genotipindeki *B. taurus* sığır etlerin kesimine uygulanan WBSF değerine göre diğer genotipteki (CC, CT) etlere daha az WBSF kesme gücü uygulanmıştır [51]. CAPN1 4751-CC genotipindeki *B. taurus* × *B. indicus* melezi sığır etlerine de, CT genotipindeki sığır etlerinden daha az WBSF uygulandığı için etlerin tekstürünün daha iyi olduğu ve genotipler arası farkın önemli olduğu belirtilmiştir ( $P < 0.001$ ) [51]. Casas ve ark. [9] da üç sığır popülasyonunda CAPN1 4751-TT genotipindeki sığırlar ile diğer (CC ve CT) genotiptekileri karşılaştırmış, CC ve CT genotipindekilerin daha gevrek et ürettiklerini ve fakın önemli olduğunu ( $P < 0.05$ ) belirlemiştirler. Boz Irk sığır et örneklerinde yapılan benzer çalışmada da WBSF uygulanmıştır. CAPN1 4751-CC genotipindeki Boz Irk sığırların etlerinin (WBSF ortalaması  $4.221 \pm 0.873$  kg/cm<sup>2</sup>), TT genotipindekilerin etlerine ( $4.986 \pm 1.303$  kg/cm<sup>2</sup>) göre

daha sert etli olduğu ve CC genotipli sığır et tekstürünün daha iyi olduğu bildirilmiştir [32]. Genel olarak araştırma sonuçları, CAPN1 4751-CC genotipli sığırların etlerinin diğer genotiptekilere (CC ve CT) nazaran daha gevrek et ürettiğini yani et tekstürünün daha iyi olduğunu belirlemiştirler [14, 32, 47, 51]. Ancak, Gill ve ark. [20] ise CAPN1 4751 SNP'nin Aberdeen Angus sığırların et tekstürü üzerine önemli bir etkisinin olmadığını bildirmiştir.

### 2.3. CAPN1 530 Polimorfizmi

CAPN 530 SNP (AF248054:g.4558A>G), CAPN1 içinde 14. Ekzon da bir adenin/guanin (A/G) bazlarının değişimine bağlı olarak proteinin 530. aminoasitinde (valin/izolösin) değişimine neden olan bir aminoasit polimorfizmidir [41, 40, 51]. CAPN 530 markırı için gevreklik ile olumlu ilişkili olan allel G allelidir. G allel frekansının; *B. taurus* ve *B. taurus* × *B. indicus* melezi popülasyonlarda %63-72 aralığında olduğu [40], Limousin ve Blond d'Aquitaine ırklarında %64, Şarole ırkında %76 [2], İrlanda et ırkında %87.8 [12], Angus, Hereford ve Limousin melezlerinde ise sırasıyla %85, %91 ve %82 olarak belirlenmiştir [11].

Amerikan Simental ırkı CAPN 530 A alleli (izolösin) taşıyan Limousin × Jersey melezi sığır etleri WBSF değerinin, G alleli (valin) taşıyan (CAPN 530 GG genotipli) sığır etlerine göre daha fazla olduğu gözlenmiş ve sonuç olarak GG genotipindeki sığırların et tekstürünün daha iyi olduğu ifade edilmiştir [41]. Yine Amerikan Simental, Angus, Hereford ve bunların melez ırklarında araştırma yapan Page ve ark. [40] da, CAPN 530 GG genotipindeki sığır etlerin WBSF değerini diğer genotipteki (AG ve AA) sığır etlerinden daha düşük olarak belirlemiştir ( $P=0.04$ ). Başka bir araştırmada da, GG genotipindeki sığır etlerinin, GA genotipindekilerden %11.5 daha az kesilme direnci gösterdiği belirlenmiştir [11]. Araştırma sonuçları [11, 40, 41], WBSF değerine göre CAPN 530 GG genotipindeki sığır etlerinin diğer (AG ve AA) genotipteki sığır etlerine göre daha gevrek olduğunu desteklemektedirler.

### 2.4. Diğer CAPN Geni Polimorfizmleri

Araştırmacılar İrlanda et ırkında CAPN II/HhaI SNP de [12] ve Brahman ırkında ise CAPN1 5331

ve 4753 SNP'ler de çalıŐmıŐlar [8, 51] ancak et tekstürü ile SNP'ler arası olumlu ilişki kuramamıŐlardır.

### 3. Markır Kombinasyonu ile Sığır Eti Tekstürünün Değerlendirilmesi

*B. taurus* CAPN 316/CAST-T1 polimorfizm çalıŐmasında eti en sert sığırların GG/AG, en gevrek etlilerin ise CC/AA genotipindeki sığırlar olduğu gözlenmiŐtir [37]. Şarole imes Angus melezi, Hereford, Brahman, Brangus, Kırmızı Angus ve Boz Irk sığırlarda yapılan çalışmalarda UoG-CAST GG, CAPN 4751TT, CAPN 316 GG genotipine sahip sığırların en sert, C/C/C haplotipine sahip olan sığırların da en yumuŐak ete sahip oldukları bildirilmiştir [32, 42, 48]. CAPN 316/530 SNP markır kombinasyonlarına göre oluşan genotipteki sığırların etleri WBSF değerleri bakımından incelenmiŐ ve yapılan karŐılaŐtırmada, GG/GG ve CC/GG genotipik kombinasyonundaki sığır etlerin WBSF değeri bakımından aralarındaki fark  $0.69 \pm 0.36$  kg/cm<sup>2</sup> olup CC/GG genotipindeki sığır etlerinin daha gevrek etli hayvanlar olduğu belirlenmiştir [40]. CAPN1 316/530 haplotipleri ile WBSF fenotipik etkilerini karŐılaŐtırıldıĖında; C/G gevrek, G/G orta gevreklikte, G/A sert etli hayvanlardan oluŐtuĖunu, C/A  rnek azlığından değerlendirilemediğini ve haplotip G/A'nın et gevrekliğini d Ő rd Ėu gözlenmiŐtir [41]. Angus, Hereford ve Limousin melezlerinde yapılan çalışmada CAPN316/530 CC/GA genotipindeki sığırların diğer genotiptekilere göre etlerinin daha gevrek, haplotip G/G sığırların ise daha sert etli oldukları ifade edilmiştir [11]. *B. taurus* imes *B. indicus* melezi sığırlarda, CAPN 316 markır genotipteki sığırların kesim sonrası 14. günde (P<0.05) ve CAPN 4751 markır genotipteki sığırların kesim sonrası 7. ve 14. günlerde (P<0.08) belirlenen WBSF değerleri ile SNP genotipleri arasında ilişki kurulmuŐtur [47]. *B. taurus* sığırların CAPN 316, CAPN530 ve CAPN4751 markırların sırasıyla oluŐturduĖu CGC ve GGC haplotiplerine sahip sığır etleri GGT ve GAT haplotipindekilerden daha düşük WBSF değerine sahip olup daha gevrektirler (P<0.01). CAPN4751 markırın CAPN 316 ve CAPN 530 markırlarına nazaran gevreklik ile arasında daha g cl  bir iliŐkisinin olduğu belirtilmiştir [51].

Gevreklik ile ilişkili olduğu görülen SNP'lerden UoG-CAST markırını Igenity Tender Gene Markır (Merial Ltd., Atlanta, GA) ve CAST-T1 ile CAPN

316 markırları için GeneSTAR Tests (Genetic Solutions Pty Ltd., Albion, Australia) adlarıyla ticari Őirketler tarafından gen markırları geliŐtirilmiŐtir [48, 51]. ABD Ulusal Et Irkı Sığır GeliŐtirme Birliği (US National Beef Cattle Evaluation Consortium) tarafından bu genetik testlerin etkisi onaylanmıŐtır. ABD'de sığır eti gevrekliğini geliŐtirebilmek için yetiŐtiricilere, CAPN1 316/4751 haplotip C/C frekansı oranının populasyon içinde arttırılması önerilmiŐtir [48]. Araştırmacılar CAPN1 genindeki CAPN 316 ve CAPN 4751 markırlarını *Bos taurus*larda [2, 40] ve *Bos indicus*larda [8, 13, 14] çalıŐmıŐ ve bu markırların gevreklik ile ilişkili olduğunu bildirmiŐlerdir. Ancak, Gill ve ark. [20] tenderometer cihazıyla yaptıkları ölçümlerde UoG-CAST ve CAPN1 4751 markırlarının gevreklik üzerine genetik guruplarda önemli bir etkisinin olmadığını ortaya koymuŐlardır.

### Sonuç

Genetik markır teknolojisi çiftlik hayvanlarının genetik gelişimi için gelecek vadeden bir araçtır. CAST ve CAPN1 geni lokuslarındaki SNP'ler, et gevrekliği açısından önemli gen etkileri ile iliŐkilidir. Yayınlanan araŐtırmaların çoğunda CAST ve CAPN1 genleri polimorfizmi ile *MLD'* nin kesilme direnci arasında bir ilişkinin olduğu görülmüŐtür. Sığırların, CAST ve CAPN1 genleri gevreklik ile ilişkili olan olumlu markırlar taŐıyorsa, bunlar DNA testleriyle belirlenerek erken yaşta sığırlar damızlık veya sert, orta sert ve yumuŐak (gevrek) etli sığırlar olarak sınıflandırılarak değerlendirilebilirler. Et gevrekliği için aday gen olarak kabul edilmiŐ CAST (UoG-CAST, CAST-T1) ve CAPN1 (CAPN1 316, CAPN1 530 ile CAPN1 4751) gen markırları daha gevrek et üretimi için genetik potansiyeli tanımlanmıŐ hayvan yetiŐtiriciliĖi açısından uygun gen markırları arasında yerini almıŐtır.

### Kaynaklar

- Alireza M, Jothi MP, Awis QS, Siti S (2009): Characterization of bovine calpastatin gene in Nelore cattle using polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphisms. American Journal of Animal and Veterinary Sciences. 4(4): 92-94.
- Allais S, Journaux L, Lev ziel H, Payet-Duprat N, Raynaud P, Hocquette JF, Lepetit J, Rousset S, DenoyelleC, Bernard-Capel C (2011): Effects of polymorphisms in the calpastatin and  -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. Journal of animal science. 89(1): 1-11.



3. Anonim, (2019) Development of genetic and physical marker maps of the bovine genome (Bovine Gene Mapping project). <https://cordis.europa.eu/project/rcn/5322/factsheet/en>. Erişim 13.07.2019
4. Barendse W (2002): DNA markers for meat tenderness. International patent application No. 2002, PCT/AU02/00122. World Intellectual Property Org. Int. Publication No. WO 02/064820.
5. Barendse WG (2009): DNA markers for meat tenderness. United States Patent 625698.
6. Barendse WG, Harrison BE, Hawken RJ, Ferguson DM, Thompson JM, Thomas MB, Bunch RJ (2007): Epistasis between calpain 1 and its inhibitor calpastatin within breeds of cattle. *Genetics*. 176(4): 2601-2610.
7. Bishop M, Koohmaraie M, Killefer J, Kappes S (1993): Rapid communication: restriction fragment length polymorphisms in the bovine calpastatin gene. *Journal of animal science*. 71(8): 2277.
8. Casas E, White S, Riley D, Smith T, Brennen R, Olson T, Johnson D, Coleman S, Bennett G, Chase Jr C, (2005): Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in Bos indicus cattle. *Journal of animal science*. 83(1):13-19.
9. Casas E, White S, Wheeler T, Shackelford S, Koohmaraie M, Riley D, Chase Jr C, Johnson D, Smith T (2006): Effects of calpastatin and  $\mu$ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *Journal of Animal Science*. 84(3): 520-525.
10. Cockett NE, Shay TL, Green RD, Hancock DL (1995): Rapid communication: a TaqI restriction fragment length polymorphism in the bovine calpastatin gene. *J. Anim. Sci.* 73: 3790.
11. Corva PM, Soria L, Schor A, Villarreal EL, Cenci MP, Motter M, Mezzadra C, Melucci LM, Miquel C, Paván E (2007): Association of CAPN1 and CAST gene polymorphisms with meat tenderness in Bos taurus beef cattle from Argentina. *Genetics and Molecular Biology*. 30(4): 1064-1069.
12. Costello S, O'Doherty E, Troy D, Ernst C, Kim KS, Stapleton P, Sweeney T, Mullen A (2007): Association of polymorphisms in the calpain I, calpain II and growth hormone genes with tenderness in bovine M. longissimus dorsi. *Meat Science*. 75(4): 551-557.
13. Curi RA, Chardulo LAL, Giusti J, Silveira AC, Martins CL, de Oliveira HN (2010): Assessment of GH1, CAPN1 and CAST polymorphisms as markers of carcass and meat traits in Bos indicus and Bos taurus-Bos indicus cross beef cattle. *Meat Science*. 86(4): 915-920.
14. Curi RA, Chardulo LAL, Mason M, Arrigoni M, Silveira AC, de Oliveira HN (2009): Effect of single nucleotide polymorphisms of CAPN1 and CAST genes on meat traits in Nelore beef cattle (Bos indicus) and in their crosses with Bos taurus. *Animal genetics*. 40(4): 456-462.
15. Djadid ND, Nikmar M, Zakeri S, Gholizadeh S (2011): Characterization of calpastatin gene in Iranian Afshari sheep. *Iran J Biotechnol*. 9(2): 145-149.
16. Eneña AV (2006): Marker assisted selection in beef cattle. Department of Animal Science. University of California. Davis, CA USA.
17. Elmacı C, Öner Y (2007): Et sığırcılığında moleküler genetik yaklaşımlar. *Hayvansal Üretim*. 48(2).
18. Frylinck L, van Wyk G, Smith TP, Strydom PE, van Marle-Köster E, Webb EC, Koohmaraie M, Smith MF (2009): Evaluation of biochemical parameters and genetic markers for association with meat tenderness in South African feedlot cattle. *Meat science*. 83(4): 657-665.
19. Gigli S, Failla S, Iacurto M, Contò M, Sañudo C, Olleta JL, Alberti P, Panea B, Hocquette JF, Richardson I, Ertbjerg P, Christensen M, Nute GR, Williams JL (2006): Performance at slaughter and beef quality characteristics of some Mediterranean beef breeds compared to Central and North European breeds (GemQual EU Project). *Mediterranean livestock production: Uncertainties and opportunities: CIHEAM / CITA. A series, No:78, Pp 173-182, May 18-20, Zaragoza, Spain*
20. Gill JL, Bishop SC, Mc Corquodale C, Williams JL, Wiener P (2009): Association of selected SNP with carcass and taste panel assessed meat quality traits in a commercial population of Aberdeen Angus-sired beef cattle. *Genetics Selection Evolution*. 41(1): 36.
21. Gollapudi G (1999): Evaluation of growth hormone as a candidate gene in dairy cattle breeding. Mc Gill University, Canada.
22. Gökalp HY, Kaya M, Tülek Y, Zorba Ö (1995): Et ve Ürünlerinde Kalite Kontrolü ve Laboratuvar Uygulama Klavuzu. Atatürk Üniversitesi Yayınları No:751. Erzurum
23. Gupta M, Chyi YS., Romero-Severson J, Owen JL (1994): Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*. 89 (7-8): 998-1006
24. Hocquette JF, Renand G, Levéziel H, Picard B, Cassar-Malek I (2005): Genetic effects on beef meat quality. *The Science of Beef Quality, 8th Annual Langford Food Industry Conference, Proceedings of the British Society of Animal Science*. Pp 13-19, May 18 – 19, Langford, Kanada.
25. Iso-Touru T, Pesonen M, Fischer D, Huuskonen A, Sironen A (2018): The effect of CAPN1 and CAST gene variations on meat quality traits in Finnish Aberdeen Angus and Nordic Red Cattle populations. *Agricultural and Food Science*, 27 (4): 227–231. <https://doi.org/10.23986/afsci.75125>
26. Juszcuk-Kubiak E, Flisikowski K, Wicińska K, Połoszynowicz J, Rosochacki S (2009): Identification of the new polymorphisms in the promoter region of the CAST gene in cattle. *Meat science*. 82(2): 278-283.
27. Juszcuk-Kubiak E, Słoniewski K, Oprządek J, Wicińska K, Połoszynowicz J, Rosochacki S (2009): The effect of polymorphisms in the intron 12 of CAST gene on meat quality of young bulls. *Animal Science Papers and Reports*. 27(4): 281-292.
28. Juszcuk-Kubiak E, Wysznińska-Koko J, Wicińska K, Rosochacki S (2008): A novel polymorphisms in intron 12 of the bovine calpastatin gene. *Molecular biology reports*. 35(1): 29-35.
29. Koohmaraie M (1994): Muscle proteinases and meat aging. *Meat science*. 36(1-2): 93-104.
30. Koohmaraie M (1996): Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat science*. 43: 193-201.
31. Koohmaraie M, Whipple G, Kretchmar D, Crouse J, Mersmann H (1991): Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *Journal of Animal Science*. 69(2): 617-624.
32. Kök S, Atalay S (2018): The Use of Various SNPs in CAST and CAPN1 Genes to Determine the Meat Tenderness in Turkish Grey Cattle. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 24(1): 1-8.
33. Kök S, Atalay S, Eken HS, Savaşçı M (2017): The genetic characterization of Turkish grey cattle with regard to UoG Cast, CAPN1 316 and CAPN1 4751 markers. *Pakistan Journal of Zoology*. 49(1).
34. Kök S, Atalay S, Savaşçı M, Eken HS (2013): Characterization of calpastatin gene in purebred and crossbred Turkish Grey Steppe cattle. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 19(2): 203-206.
35. Lonergan SM, Ernst C, Bishop M, Calkins CR, Koohmaraie M (1995): Relationship of restriction fragment length polymorphisms (RFLP) at the bovine calpastatin locus to calpastatin activity and meat tenderness. *Journal of animal science*. 73(12): 3608-3612.
36. Miller M, Huffman K, Gilbert S, Hamman L, Ramsey C (1995): Retail consumer acceptance of beef tenderized with calcium chloride. *Journal of animal science*. 73(8): 2308-2314.

37. Morris C, Cullen N, Hickey S, Dobbie P, Veenvliet B, Manley T, Pitchford W, Kruk Z, Bottema C, Wilson T (2006): Genotypic effects of calpain 1 and calpastatin on the tenderness of cooked M. longissimus dorsi steaks from Jersey× Limousin, Angus and Hereford-cross cattle. *Animal genetics*. 37(4): 411-414.
38. Negrini R, Nicoloso L, Crepaldi P, Milanese E, Colli L, Chegdani F, Pariset L, Dunner S, Leveziel H, Williams JL (2008): Assessing SNP markers for assigning individuals to cattle populations. *Animal Genetics*. 40: 18–26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01800.x>
39. Özbeyaz C, Bayraktar M, Alpan O, Akcan A (1991): Jerseylerde süt protein polimorfizmi ve ilk laktasyon süt verimiyle ilişkisi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 31(3-4): 27-33.
40. Page B, Casas E, Quaas R, Thallman R, Wheeler T, Shackelford S, Koohmaraie M, White S, Bennett G, Keele JW (2004): Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *Journal of animal science*. 82(12): 3474-3481.
41. Page B, Casas E, Heaton M, Cullen N, Hyndman D, Morris C, Crawford A, Wheeler T, Koohmaraie M, Keele JW (2002): Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *Journal of animal science*. 80(12): 3077-3085.
42. Quaas R, Li J, Thallman R, Van Eenennaam A, Fernando R, Gill C (2006) Validation of commercial DNA tests for quantitative beef traits. in 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. 13–18 August, Belo Horizonte, MG, Brasil.
43. Reardon W, Mullen A, Sweeney T, Hamill R (2010): Association of polymorphisms in candidate genes with colour, water-holding capacity, and composition traits in bovine M. longissimus and M. semimembranosus. *Meat Science*. 86(2): 270-275.
44. Rincon G, Medrano JF (2006): Assays for genotyping single nucleotide polymorphisms in the bovine CAPN1 gene. *Animal genetics*. 37(3).
45. Schenkel FS, Miller SP, Jiang Z, Mandell IB, Ye X, Li H, Wilton JW (2006): Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of animal science*. 84(2): 291-299.
46. Smith TPL, Casas CE, Rexroad C, Kappes CM, Keele JW (2000): Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. *Journal of animal science*. 78(10): 2589-2594.
47. Smith TPL, Thomas M, Bidner T, Paschal J, Franke D (2009): Single nucleotide polymorphisms in Brahman steers and their association with carcass and tenderness traits. *Genetics and Molecular Research*. 8(1): 39-46.
48. Van Eenennaam AL, Li J, Thallman RM, Quaas RL, Dikeman ME, Gill CA, Franke DE, Thomas MG (2007): Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *Journal of animal science*. 85(4): 891-900.
49. Weaber RL, Lusk JL (2010): The economic value of improvements in beef tenderness by genetic marker selection. *American Journal of Agricultural Economics*. 92(5): 1456-1471.
50. Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M (1997): Standardizing collection and interpretation of Warner-Bratzler shear force and sensory tenderness data. In Proceedings 50th annual reciprocal meat conference, Pp 68-77, Ames, IA.
51. White S, Casas CE, Wheeler T, Shackelford S, Koohmaraie M, Riley D, Chase Jr C, Johnson D, Keele JW, Smith T (2005): A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of Bos indicus, Bos taurus, and crossbred descent. *Journal of animal science*. 83(9): 2001-2008.
52. Xiaomei S, Xiuxiang W, Yongliang F, Yongjiang M, Dejun J, Bizhi H, Zhangping Y (2018): Effects of polymorphisms in CAPN1 and CAST genes on meat tenderness of Chinese Simmental cattle. *Archives Animal Breeding*, 61: 433-439.
53. Yousefi S, Azari MA (2012): Study of Calpastatin Gene Polymorphism in Holstein Cattle and Buffalo. *Anim. Sci. Biotech*. 45: 285-288.