JABG
Journal of Animal Breeding & Genomics

JABG. 2024 September, 8(3)61-67
https://doi.org/10.12972/jabng.20240302

Print ISSN 1226-5543
Online ISSN 2586-4297

Research Article

Causal inference using genome-wide association study results of Hanwoo carcass traits: Mendelian randomization analysis

Ji Yeong Kim[1], Ho Chan Kang[1], Cheol Hyun Myung[1], Hyun Tae Lim[1,2*]

[1]Department of Animal Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

[2]Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

***Corresponding author:** s_htim@gnu.ac.kr

ABSTRACT

Setting breeding objectives to enhance carcass traits in Hanwoo is essential for increasing the profitability of the Hanwoo industry and ensuring that consumers receive high-quality meat. Key carcass traits, including carcass weight (CWT), eye muscle area (EMA), back-fat thickness (BFT), and marbling score (MS), are genetically correlated. Understanding the causal relationships among these traits is vital for comprehending the complex biological systems of Hanwoo. This study analyzed data from 392 Hanwoo using a Genome-Wide Association Study (GWAS) to identify genetic variants. These variants were subsequently employed as instrumental variables in a Mendelian Randomization (MR) analysis to infer causality. With CWT as the exposure variable and MS as the outcome variable, the selected instrumental variables were validated for their assumptions through tests for heterogeneity and pleiotropy. The MR analysis revealed that, except for the MR-Egger model, significant positive relationships were observed across all models, indicating that an increase in CWT causally influences an increase in MS, beyond mere genetic correlations. It was confirmed that a 1 kg increase in CWT results in an approximate 0.01-point increase in MS. Thus, this study underscores the importance of utilizing genetic variants identified through GWAS as instrumental variables for inferring causal relationships between CWT and MS via MR analysis. These findings can contribute to developing effective breeding strategies and improve our understanding of the biological mechanisms related to carcass traits.

Key words: carcass trait, causal inference, Genome-Wide Association Study, Hanwoo

INTRODUCTION

한우의 도체형질 개량을 위해 육종 방향의 설정은 매우 중요한데, 이는 한우산업의 소득 증가뿐만 아니라, 소비자에게 높은 품질의 고기를 제공하는데 필수적이기 때문이다. 2024년 한우 육질 등급 1등급이상 출현율 74.6%, 육량 A, B등급이상 출현율은 79.7%로 고품질의 고기 생산은 성공적으로 이루어졌다 평가된다(KAPE, 2024). 한우의 도체형질에는 등급 판정에 영향을 미치는 도체중(Carcass weight; CWT), 등심단면적(Eye-muscle area; EMA), 등지방두께(Back-fat thickness; BFT), 근내지방도(Marbling score; MS)가 대표적이며, 이들 형질은 서로 유전적 상관관계를 가지고 있어 개량 시 영향을 끼칠 수 있다(Park et al., 2020; Alam et al., 2021). 유전적 상관관계는 형질들 간의 잠재적인 유전적 영향을 시사하지만, 이는 인과적 관계가 있다고 볼 수 없다. 단순한 상관관계 분석으로는 한계점이 있으며, 특정 형질을 개량하는 과정에서 다른 형질에 미치는 실제 원인-결과의 관계를 파악하는 것은 상당히 중요한 부분이다.

인과 추론은 사회 경제적 분야에서 고안된 통계적 방법의 하나로, 인과 추론은 원인과 결과 사이의 인과관계를 추론하는 과정으로서, 상관관계는 예측을 주 목적으로 삼는 반면, 인과관계는 원인을 설명한다는 것을 목표로한다는 것에 큰 차이가 있다. 인과 추론은 GWAS 분석을 통한 유전인자를 탐색하는 것에서 그치지 않고, 유전인자의 인과성을 평가하기 위한 directed acyclic graphs (DAG)를 도

Received September 03, 2024 **Revised** September 20, 2024 **Accepted** September 20, 2024

Copyright © 2024 Journal of Animal Breeding and Genomics.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

출한다. DAG는 가정과 조건을 명시적이고, 직관적인 방식으로 인과관계를 나타낸다. Mendelian Randomization (MR)은 관찰데이터로부터 confounding 요인이 있음에도 인과적인 효과를 추정하는데 사용가능하고, 도구변수의 기법을 유전자형에 적용한 방법이다. 유전자형이 관심있는 변수에 대한 도구변수로 작용하며, MR의 정확도는 많은 가정들에 의존하게 된다. MR은 대규모의 GWAS 데이터를 분석에 이용하여 인간의 질병에서 다양한 연구가 보고되고 있다(Hemani et al., 2018; Walker et al., 2022). Two-stage MR은 두 단계로 구분하여, 첫번째에는 노출변수와 도구변수와의 회귀, 두번째는 결과변수와 노출변수와의 회귀를 나타내어 각기 독립적인 GWAS 결과를 이용할 수 있다. 한우의 복잡한 생물학적 시스템을 효율적으로 관리하기 위해서는 인과 메커니즘의 파악은 중요한 요소이지만, 한우에서 각 도체 표현형질들간의 인과적 관계가 있는지에 대한 고려는 미비한 실정이다. 따라서, 본 연구는 GWAS로 탐색된 유전 변이를 도구변수로 사용하여, 한우 도체형질간 인과적 관계를 파악하고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

Test group and Data collection

본 연구에 사용된 검정 집단은 2017년부터 2022년까지 수정란 이식으로 생산된 한우의 개체이력번호를 추적하고, (사)한국종축개량협회에서 개체이력번호를 조회하여 혈통 정보를 수집하였다. 가계 구축을 위하여 부, 모의 유전체 정보를 모두 보유한 후대축 중 분석의 용이성을 위해 가계 중 도축된 후대축 5두 미만과 도체 성적에 이상치가 있는 후대축을 제외하여 최종적으로 Korean proven bull's number (KPN) 4마리와 공란우 14마리로 15개의 가계를 구성하고 후대축 374두를 선발하여 392두의 가족 데이터를 분석에 이용하였다.

표현형 정보는 농림축산식품부에서 고시한 제2014-4호 축산물등급판정 세부 기준에 따라 측정되었다. 도체중은 좌우 냉도체 중량의 합으로 측정 하였으며, 등심단면적은 좌우 흉추와 제 1요추 사이를 척추골과 직각으로 절개하여 최후 흉추 쪽의 면적을 면적자로 측정하였다. 등지방두께는 등심단면적의 오른쪽 면을 따라 복부 쪽으로 3분의 2 들어간 지점을 측정하였으며, 근내지방도는 등심단면적 측정부위에서 근육 내 지방 침착도를 기준표(1 = Devoid and 9 = abundant)와 비교하여 육안으로 측정하였다.

SNP genotyping and Quality Control

SNP 유전자형은 Bovine SNP50K BeadChip v2, 3과 Hanwoo SNP50K BeadChip v1 (Illumina, SanDiego, CA, USA)을 사용하여 각 54,609개, 53,218개, 53,866개의 SNP 유전자형을 확보하였다. Marker 선발을 위해Quality Control은 Plink v1.9 program (Purcell et al., 2007)을 사용하여 상염색체 중 minor allele frequency (MAF)가 5% 미만, missing genotype (geno)은 10% 초과, Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE)은 10^{-6} 이하인 SNP marker를 제거하였고, 성염색체를 제외한 3가지 버전의 공통된 45,953개 중 34,468개의 마커가 사용되었다.

Genome-Wide Association Study

GEMMA v0.93 (Zhou and Stephens, 2012) program에서 생년월일, 도축일령, 나이, 성별을 고정 효과 공변량으로 하여 Univariate Linear Mixed Model 옵션을 이용해 각 도체 형질에 대한 GWAS 분석을 수행하였다. Threshold level은 adjusted Bonferroni threshold = 1 / number of SNP marker ($p = 2.90 \times 10^{-5}$)로 유의 마커를 동정하였다.

Instrumental variables selection

멘델리안 랜덤화(Mendelian randomization) 분석은 각 형질의 유의한 SNP 마커를 도구변수로 하여 1) 노출변수에 고유한 영향을 미치며, 2) 결과변수와 직접적인 관련이 없으며, 3) 노출변수와 관련된 경로를 통해 결과에만 영향을 미친다는 가정을 충족한 것만을 선발하였다. 각 도구변수의 가정을 평가하기 위하여 이질성(heterogeneity) 및 다형성(pleiotropy) 검정을 실시하였다(He et al., 2021).

특정 대립 유전자가 표현형을 나타내지 않고, 같은 표현형을 여러 다른 대립 유전자가 나타낼 경우, 이질성(heterogeneity)이 있다 평가하며, 하나의 SNP가 하나의 표현형과 연관되어 있지 않고, 결과변수에 영향을 주는 다른 표현형과도 연관이 있는 경우 다형성이 있음을 의미한다. 이질성 검정은 Q 통계량이 작을수록 다형성으로부터 자유로우며, 다형성 검정은 Inverse Variance Weighted (IVW)의 민감도 분석인 MR-Egger 회귀분석으로 IVW의 회귀모형에 다형성 잔차항이 포함되어 *p*-value가 0.05 이상을 기준으로 도구 변수를 평가하였다.

Mendelian randomization analysis

두 개의 독립적인 GWAS 결과를 하나의 GWAS 결과로 통합하기 위해 two-sample MR 분석을 이용하였다. 분석은 R(https://mrcieu.github.io/TwoSampleMR/)에서 TwoSampleMR 패키지를 사용하여 임계값을 충족하는 SNP 마커를 통합했으며(Hemani et al., 2018), 통계적 유의성은 0.05 미만의 *p*-value를 기준으로 결정하였다.

RESULTS AND DISCUSSION

Basic statistics

도체 형질 표현형 자료의 기초통계량을 Table 1에 나타내었으며, 도체중, 등심단면적, 등지방두께 및 근내지방도의 평균 및 표준편차는 각각 490.28±80.85kg, 103.96±16.87㎠, 11.71±4.50㎜ 및 6.69±2.22점으로 나타났다. 2023년 전국 한우 도체 등급 판정의 도체중, 등심단면적, 등지방두께 및 근내지방도의 평균은 416.0kg, 91.9㎠, 12.8㎜, 5.3점으로 나타났고, Bhuiyan et al. (2024)의 연구에서는 441.20±50.88kg, 95.81±12.21㎠, 14.26±4.92㎜ 및 5.95±1.85점(16,971두)으로 보고하였다(KAPE, 2024). 선행연구와 비교하였을 때, 본 연구의 검정 집단은 다소 우수한 도체 성적을 보이며, 등지방두께와 근내지방도의 변동 계수가 도체중과 등심단면적에 비해 약 두배 이상 높아 표현형 변이가 다양한데 이는 한우의 특성으로 보인다(Naserkheil et al., 2021).

Table 1. Test group carcass trait statistics.

Trait	Number of animal	Mean	Min	Max	SD	CV (%)
CWT (kg)	392	490.28	204	691	80.85	16.49
EMA (㎠)	392	103.96	39	146	16.87	16.23
BFT (㎜)	392	11.71	2	39	4.50	38.47
MS (1~9)	392	6.69	1	9	2.22	33.15

SD, standard deviation; CV, coefficient of variation; CWT, carcass weight; EMA, eye muscle area; BFT, back fat thickness; MS, marbling score.

Instrumental variables (IV) selection

GWAS 분석은 일반적으로 각 SNP에 대해 관심 표현형질에 대한 효과 크기를 알 수 있어 대립유전자의 비율을 파악할 수 있다. 따라서 각 도체형질 별로 GWAS를 분석하고 도체중 7개, 등지방두께 3개, 근내지방도 6개의 유의 마커를 확인하였다(Table 2).

육우에 있어서 도체중의 증가는 육질 등급에 선형적인 영향을 끼친다는 연구는 꾸준하게 보고되고 있으나(Bertrand et al., 1983; Moon et al., 2003), 도체중과 근내지방도의 상관관계는 연구마다 음 또는 양의 관계로 달라지는 결과로 혼란을 야기할 수 있으며(Bhuiyan et al., 2017), 육량과 육질 간의 인과적 관계는 한우의 고급육 생산 전략에 상당히 중요한 부분이다. 따라서, 도체중을 노출 변수로 하고 근내지방도를 결과 변수로 하여 유전 변이에 기반한 인과 관계를 추론하고자 방향성 비순환 그래프(DAG)를 시각화 하였다(Fig. 1). 가족 데이터를 통합하면 노출 변수에 대한 편향을 줄이는 것으로 입증되었으며, 이는 자손과 부모 유전자형 간의 상관관계를 활용하는 방식을 이용한다(Hwang et al., 2021). 선발된 SNP 마커를 도구변수로 활용하기 위해 실시한 Q 검정 결과에서

p-value가 0.05 이상이므로 귀무 가설을 기각해 이질성 검정을 통과하였고(Table 3), 다형성 검사를 위한 MR-egger는 *p*-value 0.87로 선발된 도구변수는 다형성 검정을 만족하였다(Table 4). 따라서, 도체중을 노출변수, 근내지방도를 결과변수로 설정하여 7개의 도구변수가 가정에 만족하여 MR 분석에 활용가능함을 확인하였다.

Table 2. Significant SNP list of Hanwoo carcass traits.

Trait	Chr	SNP	Position (bp)	Allele	MAF	*p*-value
CWT	14	ARS-BFGL-NGS-109902	4,984,674	A/G	0.298	1.72×10^{-5}
	14	UA-IFASA-6356	20,347,849	A/G	0.458	6.08×10^{-6}
	14	rs133832329	24,920,882	G/A	0.488	1.22×10^{-5}
	19	ARS-BFGL-NGS-114966	35,555,115	A/G	0.347	3.85×10^{-7}
	19	ARS-BFGL-NGS-36183	41,926,734	C/G	0.263	4.31×10^{-6}
	19	BTA-123276-no-rs	41,950,232	A/G	0.32	6.25×10^{-6}
	25	BTA-101631-no-rs	32,089,261	A/G	0.318	2.48×10^{-5}
BFT	4	BTB-00183304	47,909,532	A/G	0.194	2.58×10^{-5}
	6	ARS-BFGL-NGS-94213	94,668,310	G/A	0.258	6.00×10^{-6}
	16	ARS-BFGL-NGS-89740	6,168,426	A/G	0.499	3.90×10^{-7}
MS	1	ARS-BFGL-NGS-94206	73,048,145	A/G	0.172	2.46×10^{-5}
	2	ARS-BFGL-NGS-63440	134,792,816	A/G	0.165	1.41×10^{-6}
	11	ARS-BFGL-NGS-112032	30,968,132	A/G	0.051	1.95×10^{-5}
	14	rs133053966	50,206,540	C/A	0.077	2.08×10^{-5}
	19	ARS-BFGL-NGS-33447	13,313,876	A/G	0.07	1.35×10^{-5}
	22	ARS-BFGL-NGS-26408	49,402,072	A/G	0.051	4.80×10^{-6}

Chr, chromosome; bp, base pair; MAF, minor allele frequency; CWT, carcass weight; BFT, back fat thickness; MS, marbling score.

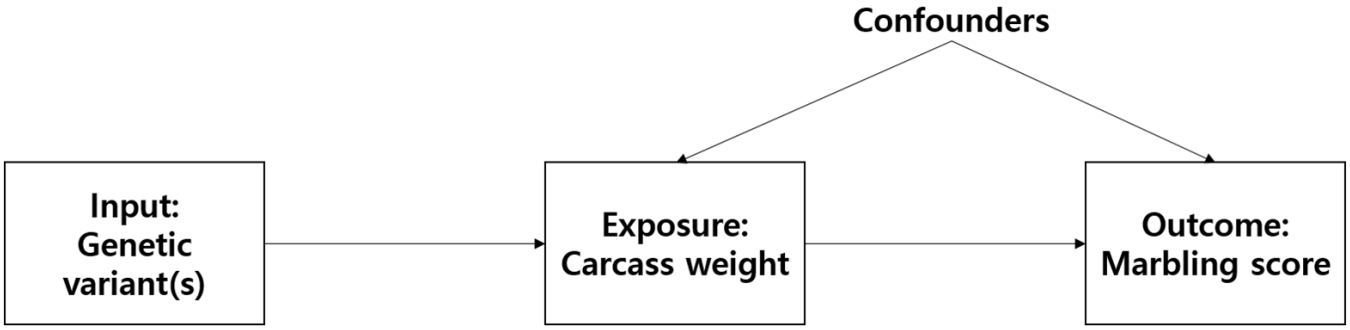

Figure 1. Direct Acyclic Graph (DAG) depicting the relationship between Hanwoo carcass traits, including Instrumental Variables (Genetic Variants), exposure variable (Carcass Weight), and outcome variable (Marbling Score).

Table 3. Results of the heterogeneity evaluation of Instrumental Variables.

Exposure	Outcome	Method	Q	*p*-value
CWT	MS	MR-Egger	6.51	0.26
		Inverse variance weighted	6.86	0.33

CWT, carcass weight; MS, marbling score.

Table 4. Results of the pleiotropy evaluation of Instrumental Variables.

Exposure	Outcome	Method	Intercept	se	*p*-value
CWT	MS	MR-Egger	-0.005	0.03	0.87

CWT, carcass weight; MS, marbling score.

Mendelian randomization analysis

도체형질 간의 인과 관계를 설명하기 위한 멘델리안 무작위화 (MR) 분석 결과는 산점도로 시각화 하고 MR 분석의 회귀 계수와 95% 신뢰구간을 테이블로 나타내었다(Fig. 2 and Table 5). IVW, Weighted Median, Simple Mode, Weighted Mode 방법에서 모두 한우 도체중과 근내지방도간의 통계적 유의성을 보여, 유의미한 양의 관계로 도체중 1kg의 증가는 MS의 약 0.01점의 증가를 나타내었다. 이는 두 형질 간의 잠재적인 인과 관계 또는 강한 연관성을 시사하는데, MR 분석에서의 유의성이란, 한 형질의 변화가 다른 형질의 변화를 초래할 수 있음을 의미한다. MR-Egger 방법을 제외한 모든 모델은 도체중과 근내지방도간 양의 상관관계를 나타낸 반면, MR-Egger 방법은 유의한 결과값이 나타나지 않았다. 이는 MR-Egger 회귀분석은 도구변수로 사용된 SNP가 기본 가정을 만족하지 않고, 다형성이 존재할 때 사용하는 것으로 이러한 결과는 본 연구에서 사용된 도구변수가 다형성이 없음을 나타낸다. Nellore 소에서 소의 성장 동안 근육량이 증가하면 고기가 더 질겨지는 육질 연도와 도체 중량 간의 인과 관계를 나타냈으며, 이는 근섬유 유형과 관련이 있을 가능성이 크다(Tiago et al., 2022). 또한, Picard et al. (2014)도 *Bos taurus*에서 근육 단백질과 연도 간의 연관성을 보고했습니다. 따라서, 도체중의 증가는 근내지방도 점수의 증가에 영향을 미치지만, 근육 내 지방 침착은 지질 대사에 관여하는 다양한 대사 경로에 의해 조절되며, 품종 간에 차이가 있다 보고되어 자세한 생물학적 경로의 파악이 필요하다 사료된다(Hoa et al., 2023). 또한, MR 검정력은 표본 크기에도 크게 영향을 받기 때문에 추가적으로 집단을 축적하여 분석할 필요가 있다 판단된다.

따라서, 본 연구결과는 연관 분석을 통한 인과 추론의 사용은 인과 유전자를 식별하고 동일한 변이가 여러 형질에 영향을 미치는지 여부를 결정하는 데 유용하게 활용될 수 있을 것이라 사료된다(Widmer et al., 2021; Pan et al., 2022). 이후 GWAS 분석 표본 수를 증가시켜 추가 분석을 실시한다면, 이러한 접근방식은 복잡한 형질 간의 유전적 관계를 더욱 명확하게 파악하고, 육종 전략 수립에 도움될 수 있을 것으로 기대된다.

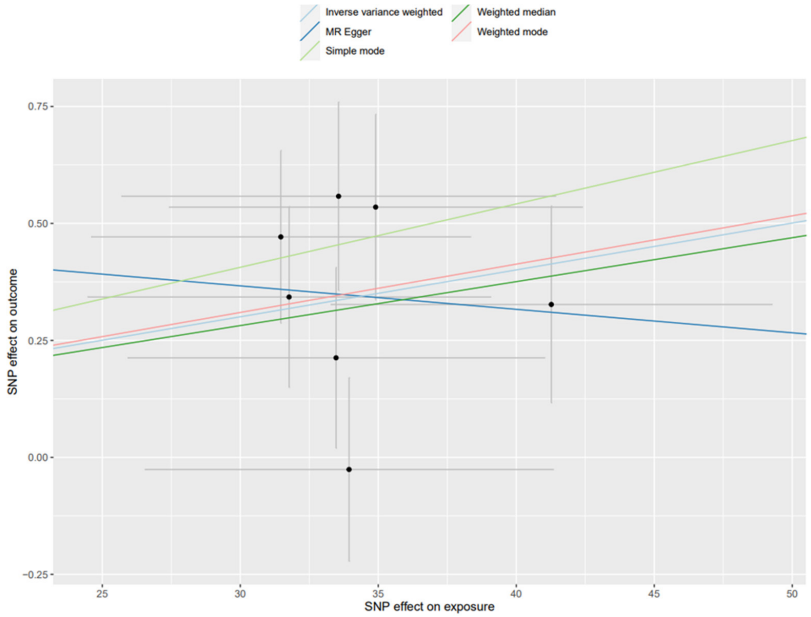

Figure 2. Schematic scatter plot showing causal associations in Mendelian Randomization (MR) analysis using bovine genetic variants as Instrumental Variables. The X-axis Represents Carcass Weight and the Y-axis Represents Marbling Score.

Table 5. MR regression coefficients.

Method	Regression coefficient	95% confidence interval
Inverse variance weighted	0.010	0.005 ~ 0.015
Weighted median	0.009	0.003 ~ 0.015
Simple mode	0.014	0.004 ~ 0.023
Weighted mode	0.010	0.001 ~ 0.020
MR Egger	-0.005	-0.062 ~ 0.052

CONCLUSION

본 연구는 한우 도체형질 간의 인과적 관계를 파악하기 위해 GWAS 데이터를 활용한 Mendelian Randomization 분석을 수행하였다. 분석 결과, 도체중과 근내지방도 간에는 통계적으로 유의한 인과 관계가 있음을 확인하였다. 특히, MR-Egger 방법을 제외한 모든 모델에서 도체중의 증가는 근내지방도의 증가와 양의 상관관계를 보였으며, 이는 도체중 증가가 근내지방도 점수 향상에 긍정적인 영향을 미친다는 것을 의미한다. 이러한 결과는 도체형질 간의 유전적 상관관계가 단순한 상관관계를 넘어 실제 인과적 영향을 미칠 수 있음을 시사한다. 따라서, GWAS 분석을 통한 유전 변이 탐색과 MR 분석을 통해 도체형질 간의 인과적 관계를 명확히 이해함으로써, 한우의 도체형질 개량 전략을 더욱 효과적으로 수립할 수 있을 것으로 기대된다.

CONFLICT OF INTERESTS

No potential conflict of interest relevant to this article is reported.

ACKNOWLEDGEMENTS

농촌진흥청(Rural Development Administration) 공동연구사업(과제번호: RS-2021-RD010297)의 지원에 의해 이루어진 것이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

Alam M, Lee SH, Lee DH, Cho C, Park MN. 2021. Genetic Analysis of Major Carcass Traits of Korean Hanwoo Males Raised for Thirty Months. Animals 11(6):1792. https://doi.org/10.3390/ani11061792.

Bertrand JK, Willham RL, Berger PJ. 1983. Beef, dairy and beef× dairy carcass characteristics. Journal of Animal Science 57(6):1440-1448. https://doi.org/10.2527/jas1983.5751154x

Bhuiyan MSA, Kim HJ, Lee DH, Lee SH, Cho SH, Yang BS, Kim SD, Lee SH. 2017. Genetic parameters of carcass and meat quality traits in different muscles (longissimus dorsi and semimembranosus) of Hanwoo (Korean cattle), Journal of Animal Science 95(8):359-369. https://doi.org/10.2527/jas.2017.1493

Bhuiyan MSA, Kim YK, Lee DH, Chung Y, Lee DJ, Kang JM, Lee SH. 2024. Evaluation of non-additive genetic effects on carcass and meat quality traits in Korean Hanwoo cattle using genomic models. Animal 18(5):101152. https://doi.org/10.1016/j.animal.2024.101152

He C, Zhang M, Li J, Wang Y, Chen L, Qi B, Wen J, Yang J, Lin S, Liu D, Dong Y, Wang L, Wang Q, Chen P. 2022. Novel insights into the consequences of obesity: a phenotype-wide Mendelian randomization study. European Journal of Human Genetics. 30(5):540-546. https://doi.org/10.1038/s41431-021-00978-8.

Hemani G, Zheng J, Elsworth B, Wade KH, Haberland V, Baird D, Laurin C, Burgess S, Bowden J, Langdon R et al. 2018. The MR-Base platform supports systematic causal inference across the human phenome. elife 7: e34408. https://doi.org/10.7554/eLife.34408

Hoa VB, Song DH, Seol KH, Kang SM, Kim HW, Bae IS, Kim ES, Park YS, Cho SH. 2023. A Comparative Study on the Carcass and Meat Chemical Composition, and Lipid-Metabolism-Related Gene Expression in Korean Hanwoo and Brindle Chikso Cattle. Current Issues in Molecular Biology 45: 3279-3290. https://doi.org/10.3390/cimb45040214.

Hwang LD, Davies NM, Warrington NM, Evans DM. 2021. Integrating Family-Based and Mendelian Randomization Designs. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 11(3):a039503. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a039503.

Korea Institute of Animal Products Quality Evaluation (KAPE) Statistical Yearbook for Livestock product grade determination in 2023. [(accessed on 27 March 2024)]. Public Notion No. 2024.03.27. Available online: https://www.ekape.or.kr/board/list.do

Moon SS, Hwang HH, Jin SK, Joo ST, Park GB. 2003. Carcass Traits Determining Quality and Yield Grades of Hanwoo Steers. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 16(7): 1049-1054. https://doi.org/10.5713/ajas.2003.1049

Naserkheil M, Lee DH, Kong HS, Seong J, Mehrban H. 2021. Estimation of genetic parameters and correlation between yearling ultrasound measurements and carcass traits in Hanwoo cattle. Animals 11(5): 1425. https://doi.org/10.3390/ani11051425

Pan S, Liu X, Liu T, Zhao Z, Dai Y, Wang YY, Jia P, Liu F. 2022. Causal Inference of Genetic Variants and Genes in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Frontiers in Genetics 13: 917142. https://doi.org/10.3389/fgene.2022.917142.

Park B, Choi TJ, Park MN, Oh SH. 2020. Estimation of environmental effects and genetic parameters of carcass traits on Chikso (Korean brindle cattle). Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 33(4): 525-530. https://doi.org/10.5713/ajas.19.0136.

Picard B, Gagaoua M, Micol D, Cassar-Malek I, Hocquette JF, Terlouw CEM. 2014. Inverse Relationships between Biomarkers and Beef Tenderness According to Contractile and Metabolic Properties of the Muscle. Journal of Agricultural and Food Chemistry 62(40): 9808-9818. https://doi.org/10.1021/jf501528s.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker, PI, Daly MJ, Sham PC. 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. The American Journal of Human Genetics 81(3):559-575. https://doi.org/10.1086/519795.

Tiago B, Tiago LP, Camila UB, Anderson ACA, Roberto C, Luiz ALC, Guilherme JMR, Lucia GA. 2022. Investigating potential causal relationships among carcass and meat quality traits using structural equation model in Nellore cattle. Meat Science 187:108771. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.108771.

Walker VM, Zheng J, Gaunt TR, Smith GD. 2022. Phenotypic causal inference using genome-wide association study data: Mendelian randomization and beyond. Annual review of biomedical data science 5:1-17.

Widmer S, Seefried FR, von Rohr P, Häfliger IM, Spengeler M, Drögemüller C. 2021. A major QTL at the *LHCGR*/*FSHR* locus for multiple birth in Holstein cattle. Genetics Selection Evolution 53:57. https://doi.org/10.1186/s12711-021-00650-1

Zhou X, Stephens M. 2012. Genome-wide efficient mixed-model analysis for association studies. Nature Genetics 44(7): 821-824. https://doi.org/10.1038/ng.2310.

AUTHORS INFORMATION

Ji Yeong Kim: https://orcid.org/0000-0001-8458-2789, kkk22501@naver.com

Ho Chan Kang: https://orcid.org/0000-0002-2948-5895, khc4236@gmail.com

Cheol Hyun Myung: https://orcid.org/0000-0001-8697-1657, mch0921@naver.com

Hyun Tae Lim: https://orcid.org/0000-0001-6221-4942, s_htim@gnu.ac.kr3