



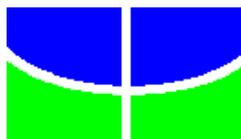
**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA**

MAPEAMENTO COMPARATIVO DO CROMOSSOMO 14 BUBALINO (*Bubalus bubalis*), EM PAINEL DE CÉLULAS SOMÁTICAS HÍBRIDAS IRRADIADAS.

STÉPHAN RAMOS GALVÃO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF
MARÇO DE 2009**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

MAPEAMENTO COMPARATIVO DO CROMOSSOMO 14 BUBALINO (*Bubalus bubalis*), EM PAINEL DE CÉLULAS SOMÁTICAS HÍBRIDAS IRRADIADAS.

ALUNO: Stéphan Ramos Galvão

ORIENTADOR: Dr. Alexandre Rodrigues Caetano

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 11/2009

BRASÍLIA/DF
MARÇO DE 2009

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

MAPEAMENTO COMPARATIVO DO CROMOSSOMO 14 BUBALINO (*Bubalus bubalis*), EM PAINEL DE CÉLULAS SOMÁTICAS HÍBRIDAS IRRADIADAS.

STÉPHAN RAMOS GALVÃO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ANIMAIS, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADA POR:

**ALEXANDRE RODRIGUES CAETANO, Livre Docência (EMBRAPA Recursos
Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN)
(ORIENTADOR)**

**CONCEPTA MARGARET MCMANUS PIMENTEL, Pós-doutorado (UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA - UNB)
(EXAMINADOR INTERNO)**

**SAMUEL REZENDE PAIVA, Doutorado (EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia -
CENARGEN)
(EXAMINADOR EXTERNO)**

BRASÍLIA/DF, 13 DE MARÇO DE 2009

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

GALVÃO, S.R. **Mapeamento comparativo do cromossomo 14 bubalino (*Bubalus bubalis*), em painel de células somáticas híbridas irradiadas.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 74 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado/tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

GALVÃO, Stéphan Ramos. **Mapeamento comparativo do cromossomo 14 bubalino (*Bubalus bubalis*), em painel de células somáticas híbridas irradiadas.** Orientador: Alexandre Rodrigues Caetano Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2009. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2009.

1. Búfalo de rio. 2. Genômica. 3. Mapa RH.

4. Mapeamento cromossômico.

CDD ou CDU

Agris / FAO

Este trabalho é dedicado primeiramente a Deus, que me conduz e me guarda a cada dia; aos meus pais e família, que apoiaram a minha educação integralmente e incondicionalmente; aos ótimos amigos que fiz nessa jornada, e que tanto me ajudaram no decorrer do caminho; e ao meu orientador, o Dr. Alexandre Rodrigues Caetano pela amizade, paciência, confiança e persistência sempre presentes.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer pelos iniciadores (primers) gentilmente cedidos pelo Dr. John L. Williams; pelo apoio financeiro da Capes; às instituições públicas Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a Universidade de Brasília; e a todo o povo brasileiro investe sempre para que o Brasil se destaque no cenário mundial como centro de referência em pesquisas.

ÍNDICE

Capítulos/Sub-capítulos	Página
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
CAPITULO 1	1
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Problemática e Relevância	2
1.2. Objetivos	3
1.2.1. Geral	3
1.2.2. Objetivo específico	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. A Bubalinocultura no Brasil	4
2.2. Características Produtivas da Espécie	5
2.3. Características Raciais, Genéticas e Sintênicas do Búfalo	6
2.4. O mapeamento Genômico e o Mapa RH	7
2.5. Mapeamento Comparativo	12
2.6. Construção de Mapas RH para outras espécies	14
2.7. Estado da Arte do Mapa Bubalino	15
CAPITULO 2 – ARTIGO ÚNICO	16
1. INTRODUÇÃO	16
2. METODOLOGIA	17
2.1. Painel de Células Somáticas Híbridas Irradiadas	17
2.2. Seleção dos Marcadores	18
2.3. Otimização das Condições de Amplificação dos Marcadores da Reação de PCR	20
2.4. Genotipagem do Painel RH de Búfalo	20
2.5. Análise de dados para construção do mapa RH	21
2.6. Construção do Mapa Comparativo	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
3.1. Otimização da Reação de PCR	23
3.2. Genotipagem do Painel RH de Búfalo	25
3.3. Análise de dados para construção do mapa RH	27
3.4. Desenho do mapa e mapeamento comparativo	29
4. CONCLUSÃO	35
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXOS	45

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura	Página
Figura 2.4.1: Esquema geral da construção do painel de células híbridas irradiadas.	9
Figura 2.4.2: Esquema geral da estabilização dos fragmentos nas linhagens.	10
Figura 2.4.3: Representação de uma parte do cariótipo de diferentes linhagens de um painel RH, mostrando a variabilidade de conjuntos de fragmentos de DNA.	11
Figura 2.5.1: Exemplo de um mapa comparativo.	13
Figura 3.1.1: Produtos da otimização do marcador S612 com reação de gradiente em gel de agarose 2%.	24
Figura 3.1.2: Exemplo de produtos de otimização dos marcadores com temperaturas fixas em gel de agarose 2%.	24
Figura 3.2.1: Gel de agarose a 2,0% mostrando as diversas linhagens do painel (números) genotipadas com o marcador S612.	27
Figura 3.4.1: Mapa RH preliminar do cromossomo BBU14 em comparação com o mapa molecular do BTA13 – versão 4.0 e ancorado ao mapa citogenético do cromossomo BBU14.	30
Figura 3.4.2: Comparação entre os mapas do cromossomo 14 bubalino gerados nesse estudo e pelo CIMRHGB com o mapa bovino.	31
Figura 3.4.3: Comparação entre os mapas do cromossomo 14 bubalino gerados nesse estudo e pelo CIMRHGB.	33
Figura 3.4.4: Comparação entre os mapas do cromossomo 6 bubalino: o preliminar e o gerado pelo CIMRHGB.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tabela 2.2.1 – Relação de marcadores utilizados na otimização das condições de PCR, com a descrição dos primers utilizados e as respectivas referências.	18
Tabela 3.2.1 – Relação dos marcadores genotipados, tipo, tamanho do produto de PCR em bovinos e em bubalinos, temperatura de anelamento e frequência de retenção.	25
Tabela 3.3.1: Resultado das análises para construção do mapa RH preliminar do BBU14 com o programa Carthagene.	28

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

- ABCB** – Associação Brasileira de Criadores de Búfalos
- BBU** – Cromossomo bubalino
- BTA** – Cromossomo bovino
- CENARGEN** – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
- CIMRHGB** – Consórcio Internacional de Mapeamento RH do Genoma Bubalino
- CPATU** – Embrapa Amazônia Oriental
- cM** – centimorgans (Medida de distância do mapa genético, ou de ligação)
- cR** – centiRays (Medida de distância do mapa RH)
- DMEM-HAT** – Meio de cultura seletivo
- DNA** – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucléico)
- EST** – *Expressed Sequence Tag* (Etiqueta de sequência expressa)
- FAO** – *Food and Agriculture Organization* (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)
- FISH** – Hibridação *in situ* fluorescente
- FR** – Frequência de retenção
- IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IBILCE-UNESP** – Instituto de Biociências, Letras, e Ciências exatas – Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”
- ISH** – *In Situ Hybridization* (hibridação *in situ*)
- Kbp** – 1.000 pares de bases
- LOD** – Log₁₀ do “Odds Ratio” (Medida estatística)
- NCBI** – *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional para a Informação Biotecnológica)
- PCR** – *Polymerase Chain Reaction* (Reação da Polimerase em Cadeia)
- PEG** – Polietilenoglicol
- QTL** – *Quantitative Trait Loci* (*Loci* de característica quantitativa)
- Rad** – Medida de dosagem de radiação
- RH** – *Radiation Hybrid* (Híbrido por radiação)
- SCH** – *Somatic Cell Hybrids* (Híbridos de célula somática)
- SNP** – *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo único de nucleotídeo)
- STS** – *Sequence Tagged Sites* (Locais com sequências etiquetadas)
- TAMU** – Universidade do Texas A&M
- TBE** – Solução tampão
- TK** – Timidino-quinase
- TK⁻** – Células com ausência de Timidino-quinase
- USP** – Universidade de São Paulo

RESUMO

MAPEAMENTO COMPARATIVO DO CROMOSSOMO 14 BUBALINO (*Bubalus bubalis*), EM PAINEL DE CÉLULAS SOMÁTICAS HÍBRIDAS IRRADIADAS.

ALUNO: Stéphan Ramos Galvão¹

ORIENTADOR: Dr. Alexandre Rodrigues Caetano^{1,2}

¹UNB – Universidade de Brasília, Brasília - DF

²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF

O desenvolvimento de ferramentas genômicas e a geração de informações moleculares para o búfalo (*Bubalus bubalis*) ainda estão em uma fase inicial em relação a outras espécies de interesse zootécnico. Nesse contexto, esse trabalho será de grande importância para a condução de estudos para identificação das bases genéticas e mecanismos moleculares que resultam em diferenças significativas entre bubalinos e bovinos, tanto na fisiologia quanto na qualidade e composição da carne e leite. A ferramenta genômica de última geração para construção de mapas físicos é o painel de células somáticas híbridas irradiadas (Painel RH), que permite a utilização de marcadores derivados de seqüências gênicas conservadas entre espécies e úteis para mapeamento comparativo. Recentemente, um consócio internacional foi estabelecido para a construção de um mapa RH bubalino de primeira geração, e o presente estudo foi realizado como contribuição a esse consócio. Foram testadas condições de amplificação para 49 marcadores derivados de genes do cromossomo bovino 13 (BTA13), que possui alto grau de sintonia com o cromossomo bubalino 14 (BBU14). Obteve-se condições ideais de amplificação para um total de 37 marcadores, que foram testados no mínimo duas vezes em todas as linhagens do Painel para minimizar a ocorrência de resultados falsos positivos ou negativos. O software Carthogene foi utilizado para analisar os dados e gerar o mapa. Marcadores com LOD dois pontos < 3 foram excluídos da análise final. O mapa produzido contém um total de 28 marcadores, com taxa de retenção média de 20,7%. Para a construção do mapa comparativo, ancorou-se o mapa RH gerado ao mapa citogenético bubalino, e comparou-se a localização dos genes mapeados no mapa da Montagem do Genoma Bovino v4.0. O resultado obtido mostrou uma alta conservação sintênica entre os cromossomos BTA13 e BBU14, com algumas discordâncias, que não foram sustentadas pelo mapa final gerado pelo consócio. Este estudo foi importante para a construção do primeiro mapa RH do genoma do búfalo de rio.

Palavras-chave: Búfalo de rio, Genômica, Mapa RH, Mapeamento cromossômico.

ABSTRACT

RIVER BUFFALO (*Bubalus bubalis*) CHROMOSSOME 14 COMPARATIVE MAPPING IN RADIATED HYBRID SOMATIC CELL PANEL

The development of genomic tools and the generation of molecular data for the river buffalo (*Bubalus bubalis*) are still in an initial phase in relation to other species of interest to animal production activities. In this context, this work will be of great importance for studies geared to identifying the genetic basis and molecular mechanisms that result in significant differences between buffaloes and cattle, both in production physiology and meat and milk quality and composition. The last generation genomic tool for constructing physical maps is the Radiation Hybrid Panel (RH Panel), because it allows the use of markers derived from related species and useful for comparative mapping. Recently, an international consortium was established for the construction of a first generation buffalo RH map, and the present study was carried out as a contribution to the International Consortium. PCR amplification conditions were tested for 49 markers derived from bovine gene sequences located on chromosome 13 (BTA13), which has a high degree of synteny with buffalo chromosome 14 (BBU14). Ideal amplification conditions were obtained for a total of 37 markers, which were tested at least twice in all RH cell lines to minimise the occurrence of false positive or negative scorings. The program Carthagene was used to analyze the data and generate the RH map. The result obtained showed high syntenic conservation between chromosomes BTA13 and BBU14, with some discrepancies, which were not supported by final map generated by the consortium. This study was important for the construction of the first generation RH genome map of river buffalo.

Keywords: Chromosome mapping, Genomics, RH Map, River buffalo.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Existe uma gama considerável de ferramentas, informações e conhecimentos moleculares e biotecnologias associadas, gerados para espécies de animais de interesse zootécnico (p.ex. bovinos, suínos, aves, etc). Estes, associados aos programas de melhoramento genético de cada espécie têm trazido melhorias qualitativas e quantitativas na produtividade dos rebanhos e ainda têm potencial para trazer grandes avanços. Essas ferramentas têm sido utilizadas para identificação de genes de interesse econômico: (a) de maneira direta, quando o estudo é feito com populações da espécie (ex: DGAT1, Grisart et al. 2004); como também (b) de maneira indireta, em estudos comparativos, quando o gene/mutação é identificado em uma espécie e a informação é utilizada em outra espécie que apresenta as mesmas características (ex: GDF8, cujas mutações dão origem ao fenótipo da Musculatura Dupla em bovinos, e que fora descoberto graças a estudos de mapeamento comparativo com uma mutação *knockout* em camundongo, por McPherron et al. (1997) e Kambadur et al. (1997)).

A geração das ferramentas moleculares necessárias para que se possa realizar estudos sistemáticos de prospecção e caracterização de genes de interesse econômico para a bubalinocultura está muito atrasada em relação a outras espécies. Com a realização desse trabalho, contribuiu-se para um esforço internacional para a construção do mapa RH de búfalo. O resultado será de grande utilidade para a realização de estudos de mapeamento comparativo, os quais permitirão que informações genômicas importantes geradas em outras espécies sejam utilizadas em estudos de bubalinos, e vice-versa. Além disso, a geração de um mapa comparativo entre o búfalo e o bovino permitirá também avanços no conhecimento sobre a evolução cromossômica entre essas duas espécies e sobre os mecanismos de

rearranjos cromossômicos que acompanharam a evolução dos mamíferos, em especial da família *Bovidae* (Womack, 2002).

1.1. Problemática e Relevância

As informações e ferramentas moleculares disponíveis para o búfalo (*Bubalus bubalis*) ainda estão em uma fase muito inicial de desenvolvimento. Para a espécie bovina já existem mapas genéticos e RH (construído com a técnica do painel de células somáticas híbridas irradiadas), saturados com microsátélites e marcadores moleculares para genes funcionais (The Institute for Genomic Research, 2006; ARKDB, 2008; Institut National de La Recherche Agronomique, 2007; National Animal Genome Research Program, 2008; NCBI, 2008). Além disso, a seqüência genômica bovina, com cobertura de aproximadamente 8X, foi liberada e está em fase de anotação (NCBI, 2008; Texas A&M University, 2008).

Na espécie bubalina, os mapas genéticos e RH atuais estão em fase de construção, apresentando apenas alguns cromossomos mapeados (Amaral et al. 2007; Stafuzza et al., 2007; Mizziara et al., 2007; Goldammer et al., 2007; Ianella et al., 2008). Assim, o mapeamento genômico bubalino encontra-se atrasado quando comparado a outras espécies como humanos, espécies modelo (macaco, chimpanzé, peixe-zebra, rato e camundongo), animais de companhia (cão e gato) e animais de produção (ave, suíno, ovino, equino e bovino - Rutgers University, 2008; Institut National de La Recherche Agronomique, 2008).

A maioria das características economicamente importantes do búfalo de rio, como em outros animais domésticos, é de natureza quantitativa e poligênica. Os estudos de mapeamento de QTL e a prospecção de genes de interesse econômico requerem mapas saturados com marcadores moleculares polimórficos (microsátélites, SNPs – *Single Nucleotide Polymorphism* / Polimorfismo de Base Única) e genes funcionais. Dessa forma, para que se possa trazer o búfalo para a era da genômica, é imprescindível que se trabalhe no sentido de melhorar os mapas genômicos da espécie, tendo em vista a importância que esta apresenta na pecuária mundial.

1.2. Objetivos

1.2.1. Geral

Criação do mapa RH bubalino utilizando um painel de células somáticas híbridas irradiadas, construindo um mapa comparativo que evidencie as porções de conservação de sintenia entre o genoma bubalino e os genomas de outras espécies de mamíferos.

1.2.2. Objetivo específico

Construir o mapa RH preliminar e o mapa comparativo do cromossomo 14 do búfalo, utilizando cerca de 30 marcadores moleculares desenhados originalmente com base em seqüências gênicas de bovino, priorizando a utilização de marcadores tipo I (derivados de genes e ESTs).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Bubalinocultura no Brasil e no Mundo

Existem particularidades no sistema estatístico oficial do Brasil onde, em muitas situações, o registro de bubalinos se confunde com o de bovinos, resultando em eventuais discrepâncias e subestimativas da dimensão real do rebanho. Apesar disso, estimativas do IBGE (2008) e do CPATU - Embrapa Amazônia Oriental (2006) reportam que o Brasil possui entre 1,2 e 1,6 milhões de cabeças, respectivamente. Já a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB, 2007) estima, por levantamentos indiretos e avaliações de abate/desfrute, que o rebanho bubalino brasileiro atinge hoje cerca de 3,5 milhões de animais.

No último levantamento realizado pela FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação - 2006), também se confirma o crescimento mundial da bubalinocultura. Segundo a FAO (2006), o rebanho bubalino mundial apresentou crescimento numérico de 50% nos últimos 28 anos, com estimativa atual de 190 milhões de animais. No mesmo relatório, observou-se um aumento de 200% na produção de leite para o período, a qual atinge na atualidade 57 bilhões de litros de leite/ano - que equivale a 10% do leite produzido no mundo. Consideradas em conjunto, essas estatísticas demonstram as possibilidades futuras da bubalinocultura como atividade emergente no Brasil e no mundo.

Como dito anteriormente, a população bubalina aumentou significativamente e percebe-se que os programas de melhoramento têm gerado uma melhoria geral na capacidade produtiva da espécie (Drost, 2007). Uma das características que diferenciam o búfalo dos outros ruminantes é a sua grande eficiência na conversão de fibra de baixa qualidade em energia disponível para crescimento e produção (Borghese, 2005). Outras características

importantes do búfalo são a sua rusticidade, sua capacidade de adaptação a climas diferentes e as taxas de fertilidade altas, sempre superiores às do bovino (Borghese & Mazzi, 2005).

2.2. Características Produtivas da Espécie

Os bubalinos apresentam deposição mais precoce de gordura subcutânea, e assim, apresentam uma carne mais magra, quando comparada à do bovino (Jorge, et al., 1997(a); Oswin, 1999). Além disso, em condições de alimentação e manejo semelhantes, os búfalos apresentaram taxas de ganho de peso, rendimento de carcaça e conversão alimentar semelhantes a bovinos zebuínos (Jorge, et al., 1997(b)).

O leite de búfala apresenta uma composição físico-química muito particular, destacando-se o elevado teor de sólidos totais, além dos elevados percentuais de proteína e gordura, que proporcionam um alto valor nutritivo, e conseqüentemente, um alto valor comercial (Macedo et al., 2001; Jorge et al., 2002). Sua industrialização gera produtos diferenciados, como a mozzarella italiana, provolone e ricota, que possuem um valor de mercado superior aos produtos oriundos do leite bovino.

Verruma e Salgado (1994) estudaram a composição química do leite de búfala em relação ao leite de vaca. O leite de búfala apresentou, nesse estudo, níveis de gordura, proteína, sólidos totais, calorias, vitamina A (Anexo A - Tabela 1) e cálcio (Anexo A - Tabela 2) mais elevados em relação ao leite de vaca. Os teores de aminoácidos do leite de búfala estimados no mesmo estudo também foram superiores aos do leite de vaca, à exceção de cistina e triptofano (Anexo A - Tabela 3).

Entre as características inerentes à espécie, destacam-se: rusticidade, adaptabilidade, vida útil até os 15 anos, precocidade sexual/produtiva, docilidade e elevada taxa de produtividade de leite, carne e trabalho, aliadas às taxas de natalidade superior a 80% e mortalidade inferior a 3% ao ano (Moreira et al., 1994). Todos esses fatores positivos ajudam a explicar as taxas de expansão da bubalinocultura no Brasil e no mundo.

2.3. Características Raciais, Genéticas e Sintênicas do Búfalo

O búfalo é uma espécie originária da Ásia e África e que foi difundida para praticamente todos os continentes (ABCB - Associação Brasileira de Criadores de Búfalo, 2007). Os búfalos são mamíferos pertencentes à grande família dos bovídeos, cuja subfamília Bovinae compreende seis gêneros: *Bos*, *Bison*, *Bibos*, *Syncerus*, *Anga* e *Bubalus*. O gênero *Bubalus* contém a espécie *Bubalus bubalis* (búfalos d'água), com três subespécies (Marques, 2000):

***Bubalus bubalis fluviatilis*, (variedade bubalis)** – é o búfalo doméstico ou indiano, abrangendo os búfalos da Índia, Paquistão, China, Turquia e de vários outros países da Europa e América. Os búfalos provenientes da Itália também pertencem a esta subespécie. É denominado mundialmente de búfalo de rio, ou “river buffalo”. Encontram-se as raças Murrah, Mediterrâneo e Jafarabadi;

***Bubalus bubalis*, variedade fulvus** – apresenta tamanho adulto menor que a anterior e de coloração pardacenta ou avermelhada, nativo das regiões altas do nordeste da Índia, especialmente do Assam, vivendo geralmente em estado selvagem ou subdoméstico. É coloquialmente chamado de Baio;

***Bubalus bubalis limneticus*, (variedade kerebau)** – é encontrado no Ceilão, Indochina, Ilhas da Indonésia e Filipinas. Compreende o Carabao e o Tipo Rosilho, mundialmente é conhecido como búfalo do pântano ou “swamp buffalo” (Marques, 2000).

No Brasil, segundo a FAO (2007), existem seis raças: Murrah, Jafarabadi, Mediterrâneo, Carabao, Baio e Rosilho, sendo apenas as quatro primeiras raças são reconhecidas oficialmente pela ABCB.

O búfalo de rio apresenta um cariótipo de $2n=50$ e representa cerca de 80% da população de búfalos no mundo, enquanto que o búfalo de pântano (Carabao) apresenta um cariótipo de $2n=48$. (Iannuzzi, 1994). O cariótipo do búfalo de rio consiste em cinco pares de autossomos submetacêntricos e 19 acrocêntricos, mais os cromossomos sexuais, enquanto que o do bovino doméstico (*Bos taurus*) possui 29 pares de autossomos acrocêntricos e um par de cromossomos sexuais. Portanto, o número de braços cromossômicos é idêntico entre as espécies.

O alto grau de conservação sintênica entre os mamíferos e especificamente entre os bovídeos tem sido demonstrado (Gallagher & Womack; 1992; Othman, 2004). O mapeamento comparativo físico e citogenético têm mostrado que a identidade do bandejamento cromossômico entre espécies proximamente relacionadas é um bom indicador de homologia genética (El Nahas et al. 1996).

A alta conservação dos grupos sintênicos entre os bovinos e os bubalinos tem sido evidenciada com diferentes metodologias (de Hondt et al. 1991; El Nahas et al. 1993; Othman, 2004). Na análise citogenética, a comparação de padrões de bandejamento entre o búfalo do rio e o bovino revelou um alto grau de homologia entre bandas. O estudo revelou que cinco cromossomos submetacêntricos do búfalo do rio são oriundos de cinco fusões cêntricas envolvendo dez cromossomos bovinos (Iannuzzi, 1994). Dessa forma, o número de braços cromossômicos é idêntico entre as espécies. Assim, observou-se também que o cromossomo 14 bubalino (BBU14) é homólogo ao cromossomo bovino 13 (BTA13).

O cromossomo bovino BTA13 possui diversos *loci* de características quantitativas (QTL do inglês *Quantitative Trait Loci*) de importância econômica, tais como produtividade e composição do leite, maciez da carne e peso ao nascimento (Li et al. 2005). No bovino, o cromossomo 13 contém o gene PRPN, cujos variantes alélicos estão associados à susceptibilidade/resistência ao desenvolvimento da encefalite espongiforme bovina, conhecida popularmente como “doença da vaca louca”. Espera-se, portanto, que esses genes estejam localizados no BBU14.

2.4. O mapeamento Genômico e o Mapa RH

O mapeamento genômico em animais e plantas, tem sido um poderoso e avançado instrumento para o melhoramento agropecuário, seja por meio de mapas físicos ou de ligação (Womack, 2002). Entretanto, o sucesso das técnicas de clonagem de genes economicamente importantes depende da geração de mapas físicos e genéticos saturados com grandes números de marcadores moleculares.

Os mapas são ferramentas utilizadas para descoberta/prospecção de marcadores de interesse. São utilizados tanto por geneticistas humanos para localizar genes e mutações de interesse médico que predisõem à doença ou de interesse terapêutico, para gerar testes diagnósticos e eventualmente desenvolver tratamentos terapêuticos. Além disso, são

também ferramentas importantes para geneticistas que trabalham com plantas e animais, interessados em identificar genes e mutações que afetam características de produtividade, qualidade do produto e resistência às doenças, com o objetivo de aumentar a frequência de alelos favoráveis em programas de melhoramento (Chowdhary & Raudsepp, 2005).

Os mapas genéticos (também chamados de mapas de ligação) são construídos a partir de estimativas da distância entre os genes e/ou marcadores moleculares, com base na frequência de recombinação meiótica, durante a formação dos gametas. Porém, os mapas de ligação não podem ser utilizados para determinar a posição absoluta (física) de um gene ou marcador nos cromossomos da espécie em questão. Para tal, são utilizados os mapas físicos, que segundo Chowdhary & Raudsepp (2005), podem ser construídos através de quatro técnicas distintas: (a) análise de células somáticas híbridas (SCH, do inglês *Somatic Cell Hybrids*), (b) análise de células híbridas irradiadas (RH, do inglês *Radiation Hybrid*), (c) hibridação *in situ* (ISH, do inglês *In Situ Hybridization*) e (d) sequenciamento do genoma (também referido como mapa molecular). Os mapas são frequentemente comparados e/ou relacionados entre si, no intuito de minimizar o viés inerente a cada técnica. Com os mapas gerados ancorados a outros, obtém-se uma melhor acurácia na posição e distância entre os marcadores.

A estratégia de mapeamento utilizando painéis de células somáticas híbridas irradiadas (mapeamento RH) foi primeiramente descrita por Goss e Harris (1975) e redescoberta por Cox e colaboradores (1990). A técnica permite determinar a ordem linear e a distância dos marcadores utilizados nos respectivos cromossomos, além de permitir a construção de mapas comparativos entre diferentes espécies, uma vez que as análises dos marcadores de DNA, tanto aqueles apresentando polimorfismo quanto aqueles sem polimorfismo, são realizadas independentemente da variação alélica (Murphy et al. 2000). Em particular, o método pode gerar mapas de resolução intermediária entre os mapas genéticos de ligação e entre os outros mapas físicos, proporcionando assim, a coesão necessária para integrar diversos tipos diferentes de dados de mapeamento (Slonim et al., 1997).

O painel de células híbridas irradiadas (painel RH) é construído a partir da exposição de células da espécie “doadora” em questão (neste caso, células de búfalo) a radiações gama, causando quebras aleatórias dos cromossomos (Agarwala et al., 2000). Os fragmentos de DNA são então “resgatados” através da fusão das células irradiadas com células receptoras sadias de outra espécie (neste caso, células imortalizadas de hamster). Os fragmentos de DNA das células doadoras são incorporados aleatoriamente nos cromossomos

das células receptoras (Figura 2.4.1 - esquerda). Em seguida, esse conjunto de células é colocado em um meio seletivo, para que cresçam apenas as linhagens híbridas (Figura 2.4.1)

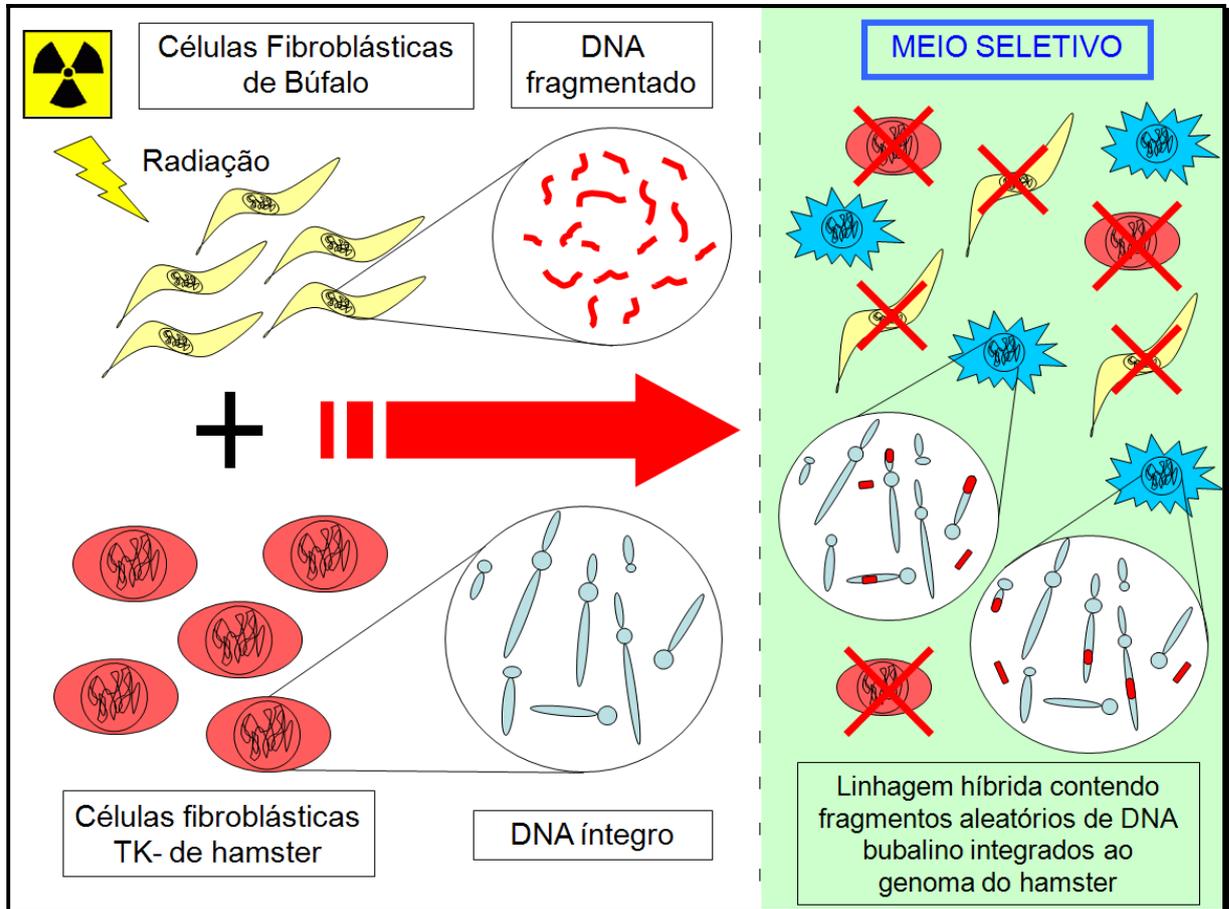


Figura 2.4.1: Esquema geral da construção do painel de células híbridas irradiadas: No lado esquerdo da linha pontilhada, as células do doador (búfalo) têm o seu DNA fragmentado aleatoriamente por radiação. As células do doador são então fusionadas às células do receptor (hamster), que tem o seu cariótipo parcialmente representado nesse esquema. Em seguida (lado direito da linha pontilhada), as células são colocadas em um meio seletivo, onde crescem apenas as células do receptor que incorporaram ao seu genoma conjuntos aleatórios do DNA fragmentado do doador. São formadas então as linhagens híbridas, compostas de DNA de hamster mais os fragmentos de DNA de búfalo (pontos destacados nos cromossomos).

Na medida em que essas células vão se multiplicando, os fragmentos de DNA menos estáveis do doador vão sendo excluídos do genoma das células híbridas, de modo que as células de gerações posteriores tendem a conter fragmentos mais estávelmente incorporados ao seu genoma. Dessa forma, há um momento em que, devido à estabilidade de incorporação desses fragmentos ao genoma do hamster, não mais se observa a perda de fragmentos, surgindo então grupos (linhagens) de células com o mesmo conjunto de fragmentos retidos de DNA bubalino (Figura 2.4.2).

retenção dos marcadores nas linhagens celulares. Por conseqüência, quanto maior a distância entre dois marcadores, menor a probabilidade de encontrá-los na mesma linhagem celular (Cox et al., 1990). Dessa forma, após a seleção dos marcadores que serão utilizados no painel RH, testa-se a presença de cada marcador em cada linhagem, para que se possa estimar as distâncias entre os marcadores e construir o mapa de cada cromossomo (Figura 2.4.3).

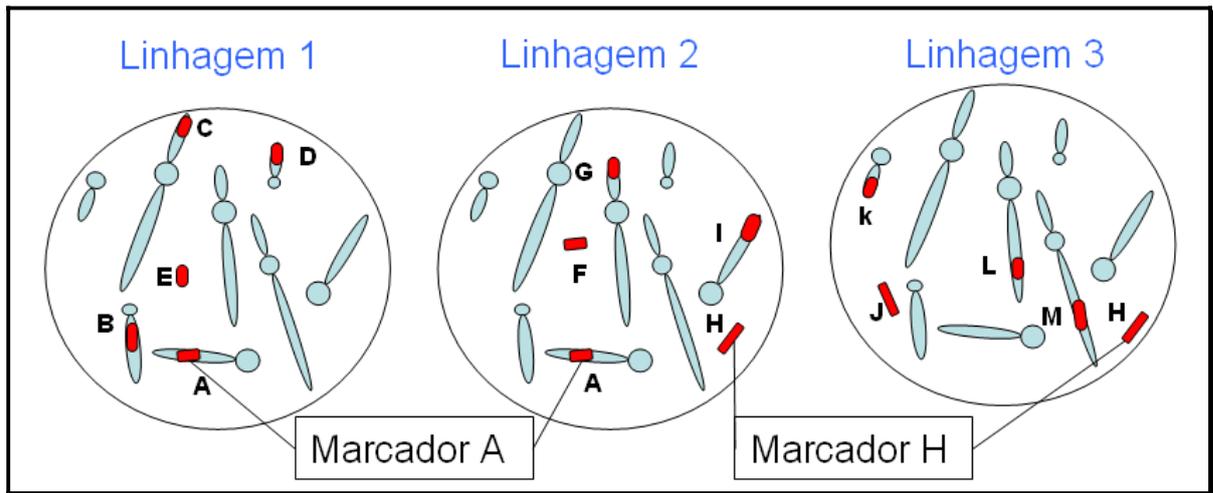


Figura 2.4.3: Representação de uma parte do cariótipo de diferentes linhagens de um painel RH, mostrando a variabilidade de conjuntos de fragmentos de DNA do doador (pontos destacados no cromossomo) incorporados ao genoma do receptor. A análise estatística do padrão de presença ou ausência dos marcadores moleculares presentes no fragmento de DNA do doador (letras), e sua relação com cada linhagem, revela a posição relativa desses marcadores no cromossomo.

A presença/ausência de um marcador em cada linhagem do painel RH é geralmente determinada com a utilização da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). Após a otimização das condições de amplificação de um marcador com especificidade para a espécie doadora, utilizando-se controles positivos (ex: DNA de búfalo) e negativos (ex: DNA de hamster), cada linhagem do painel RH é testada em duplicata. É gerada então uma matriz de ausência ("0") e presença ("1") que pode ser analisada com diferentes metodologias estatísticas para construção do mapa que comumente utilizam algoritmos e funções de máxima verossimilhança (Lange et al., 1995; Boehnke et al., 1991).

Os painéis RH podem ser construídos com diferentes dosagens de radiação gama, geralmente 5.000rads ou 10.000rads. Quanto maior a dosagem maior o número de quebras dos cromossomos e por conseqüência, menor o tamanho dos fragmentos gerados e menor é a taxa de retenção dos fragmentos de DNA nas células híbridas resultantes. Painéis produzidos com dosagens de radiação mais altas permitem o ordenamento de mais marcadores com mais precisão, permitindo a construção de mapas mais densos.

As distâncias estimadas entre os marcadores mapeados, normalmente expressas em centiRays (cR), variam principalmente de acordo com a dosagem de radiação usada e com a densidade de marcadores no mapa. A relação da distância entre os marcadores e a dosagem de radiação é expressa por uma fórmula simples: uma distância de 1 cR entre dois marcadores corresponde a aproximadamente 1% de frequência de quebra entre eles após a exposição a uma determinada dosagem de radiação. As distâncias estimadas com o mapeamento RH são proporcionais às distâncias físicas (Kbp) entre marcadores (Chowdhary & Raudsepp, 2005).

Um painel RH típico compreende cerca de 90 linhagens de células híbridas. Esse número pode ser mais alto, variando entre 83 (Stewart et al., 1997) e 180 (Liu et al., 2003; Computational Genetics, 2008). Quanto maior o número de linhagens celulares, maior é a precisão do mapeamento dos marcadores e, portanto, maior é o poder de resolução e precisão dos algoritmos utilizados para ordenar os marcadores no mapa (Chowdhary & Raudsepp, 2005).

2.5. Mapeamento Comparativo

A genômica comparativa é um método de análise do genoma que busca deduzir informações em uma espécie usando informações existentes sobre o genoma de outra espécie. Entre os mamíferos, espera-se que a genômica comparativa auxilie numa maior compreensão da diversidade fisiológica, fenotípica e metabólica, tanto em níveis moleculares quanto sistêmicos (Larkin et al., 2003). Dessa forma, genomas seqüenciados de mamíferos representam padrões de referência que permitirão o uso da genômica comparativa como ferramenta para compreender as bases moleculares da diversidade fenotípica dentro desta classe de vertebrados (O'Brien et al., 2001).

O mapeamento comparativo usa representações estruturais do genoma na construção de mapas, inferindo conhecimentos a respeito da evolução daquelas espécies e detectando relações entre os objetos mapeados, tais como marcadores com seqüências idênticas entre espécies diferentes, denominados na literatura como “marcadores âncoras” (O'Brien et al., 2001). A aplicação sistemática do mapeamento em diferentes espécies de mamíferos, também denominado de mapeamento paralelo (Figura 2.5.1), leva a uma nova

geração de mapas comparativos que focam a ordem dos genes dentro dos segmentos de sintenia conservados.

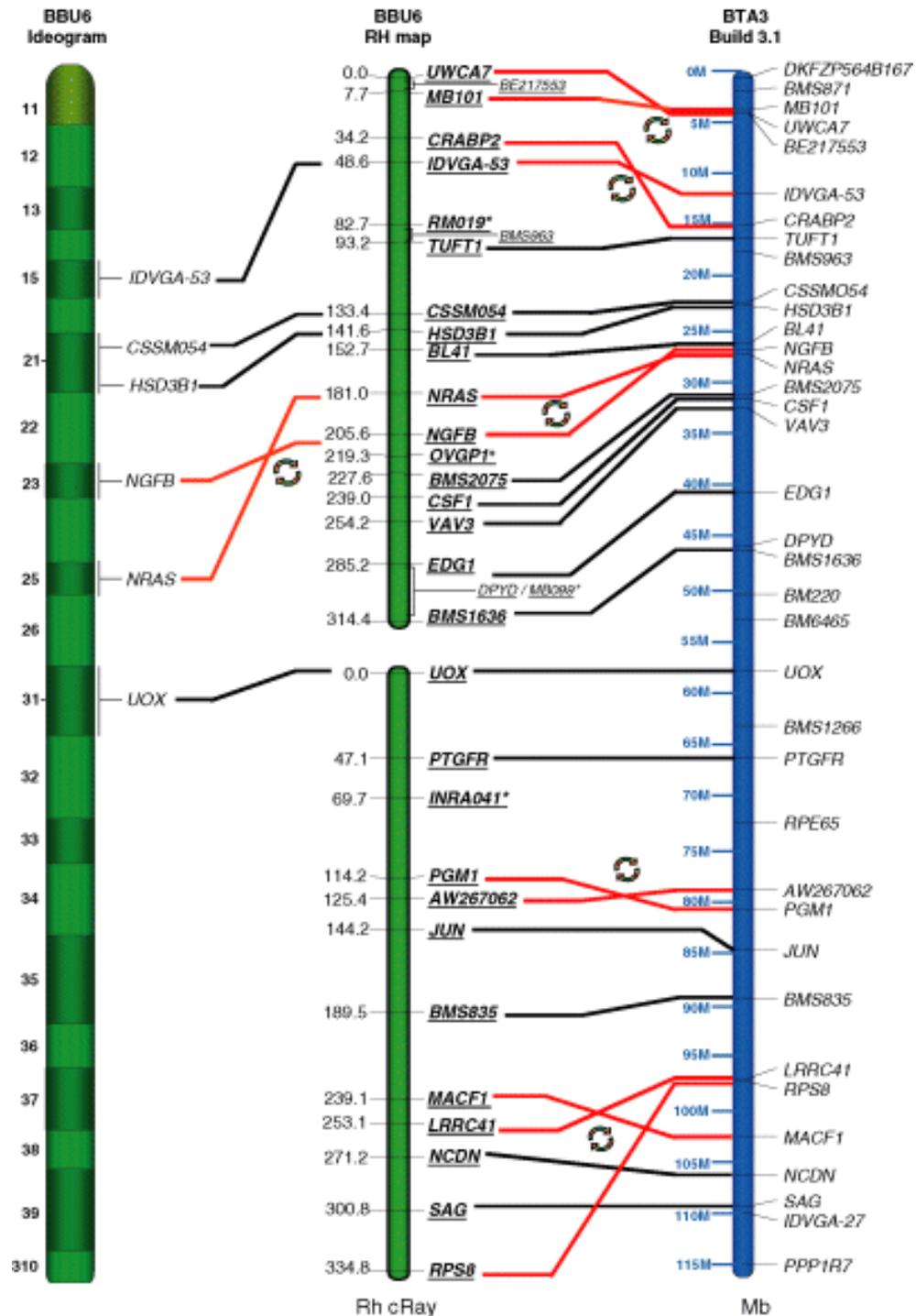


Figura 2.5.1: Comparação do mapa RH (centro) e do mapa citogenético (esquerda) do cromossomo 6 do búfalo de rio (BBU6) com a sequência do genoma bovino para o cromossomo bovino BTA13 (direita). Fonte: Stafuzza et al., 2007.

2.6. Construção de Mapas RH para Outras Espécies

O genoma humano, como espécie de maior interesse no mundo científico, apresenta mapas RH completos, construídos com diferentes níveis de resolução (Hudson et al. 1995). Foram também construídos mapas RH saturados para os genomas de outras espécies de interesse pecuário ou científico, como os bovinos, suínos, caninos, felinos, e peixe-zebra (Murphy et al, 2001); rato, camundongo, babuíno, cavalo e macaco (Computational Genetics, 2008); e frango (Ross, 2001).

O genoma de *Bos taurus* possui atualmente um mapa de ligação de aproximadamente 3.200 centimorgans (cM), onde se encontram localizados 3.898 seqüências repetitivas do tipo microsátélites, 921 marcadores SNP, e 64 outros tipos de marcadores (Sonstegard & Van Tassel, 2004). Na base de dados de bovinos do Institut National de La Recherche Agronomique, (2008), encontram-se catalogados 4.357 *loci*, 1.603 genes e 2.402 microssatélites em diversos mapas. Uma busca na base de dados de bovinos do NCBI (2008) retornou 1.560.061 seqüências EST (Expressed Sequence Tag), 2.223.033 SNP (Single Nucleotide Polymorphism), 64.154 genes, e 18.141 STS (Sequence Tagged Sites).

No mapa RH de bovinos disponível na base de dados do NCBI (2008), o cromossomo 13 bovino apresenta 125 marcadores, somando um total de 856 cR (NCBI, 2008; Everts van der Wind et al., 2005).

2.7. Estado da Arte do Mapa Bubalino

Na espécie bubalina os mapas físicos são de baixa densidade, havendo apenas três mapas citogenéticos desta espécie descritos por Iannuzzi e colaboradores (1998), El Nahas et al. (2001) e Di Meo et al. (2008), representando respectivamente um total de 171 genes e 122 microsátélites mapeados no genoma bubalino. Do total de 293 loci distintos, 247 foram mapeados por hibridação in situ (FISH), 15 por ambos: FISH e análise de células somáticas híbridas, e o restante foi mapeado somente pela análise de células somáticas híbridas (Iannuzzi et al., 2003; Navani et al., 2002).

Recentemente, foram produzidos os mapas RH dos cromossomos bubalinos 1, 3, 6, 7, 10 e X, contendo no total 185 marcadores, sendo 114 genes, 61 microsátélites, e 10 EST (Amaral et al. 2007; Stafuzza et al., 2007; Miziara et al., 2007; Goldammer et al., 2007; Ianella et al., 2008).

CAPÍTULO 2

1. INTRODUÇÃO

Estudos iniciados em 2004, em uma colaboração entre o Centro de Biotecnologia Animal e Genômica da Universidade Texas A&M (TAMU) e o Laboratório de Genômica Comparativa do IBILCE-UNESP, produziram um Painel RH de Búfalo. Mais recentemente, um consócio internacional (Consórcio Internacional de Mapeamento RH do Genoma Bubalino – CIMRHGB) foi estabelecido para a construção de um mapa RH de primeira geração, com o objetivo de mapear cerca de 1.200 a 1.500 marcadores, nos moldes do que fora realizado para bovinos (Everts-van der Wind et al. 2004). É um projeto que envolve mais de uma dezena de laboratórios do mundo e visa construir uma ferramenta de livre acesso.

O presente trabalho foi executado em associação ao CIMRHGB, para a construção do mapa RH preliminar do cromossomo 14 do búfalo (BBU14), contribuindo assim, juntamente com os outros laboratórios do Brasil que participam do trabalho (ex: UNESP-IBILCE), e com outros grupos/instituições brasileiras que realizam pesquisas genéticas com bubalinos (UF do Pará, UNESP-Botucatu, UNESP-Jaboticabal, USP, Embrapa, etc), para firmar uma posição de liderança para o Brasil nas pesquisas genômicas com a espécie.

2. METODOLOGIA

2.1. Pannel de Células Somáticas Híbridas Irradiadas

O pannel de células somáticas híbridas irradiadas que foi utilizado na execução desse projeto foi construído no *Center for Animal Biotechnology and Genomics*, ABM University, Texas/USA em colaboração com o Laboratório de Genômica Comparativa da UNESP-IBILCE. A construção do pannel representou o primeiro passo para que o mapeamento do genoma bubalino pudesse ser realizado.

O pannel RH de búfalo contém 90 linhagens de células somáticas híbridas irradiadas, geradas a partir da fusão entre fibroblastos de búfalo e células imortais (TK-) de hamster. A fragmentação dos cromossomos do genoma bubalino foi obtida submetendo-se as células a um total de 5.000 *rads*. As células irradiadas foram fusionadas com linhagens de células TK- em meio de cultura com polietilenoglicol (PEG). As linhagens de células somáticas híbridas búfalo/roedor foram selecionadas em meio de cultura DMEM-HAT (meio seletivo) e submetidas ao crescimento inicial em frascos de cultura de 25 cm². As culturas celulares foram então expandidas em garrafas de cultura de 850 cm² para a extração de DNA. O DNA foi extraído com fenol/clorofórmio/álcool iso-amil (Amaral et al., 2007), visando a obtenção de DNA de alto peso molecular.

2.2. Seleção dos Marcadores

Com o objetivo de estabelecer uma base de comparação entre o mapa RH bubalino e a seqüência do genoma bovino (NCBI, 2008), utilizou-se iniciadores (*primers*) para PCR mapeados no cromossomo bubalino 14 por técnicas citogenéticas (Gallagher et al, 1999; Ianuzzi et al.) e marcadores do tipo I previamente utilizados no mapeamento do cromossomo 13 bovino (Itoh et al, 2005; Everts-van der Wind et al., 2005; Jann et al., 2006; 2003 Institut National de la Recherche Agronomique, 2007). Procurou-se identificar marcadores igualmente espaçados pelo cromossomo, com base no cromossomo 13 bovino do mapa disponível na época (NCBI, 2007). Objetivou-se também mapear os genes já previamente mapeados na espécie bubalina por técnicas citogenéticas (Ianuzzi et al. 2003), no intuito de ancorar o mapa preliminar produzido ao mapa citogenético bubalino. No total, foram testadas condições de amplificação para um total de 49 marcadores (Tabela 2.2.1).

Tabela 2.2.1 – Relação de marcadores utilizados na otimização das condições de PCR, com a descrição dos primers utilizados e as respectivas referências.

Marcador	Primer Forward	Primer Reverse	Ref.*
ADA	GACCCGCTCATCTTCAAGTC	TCTTCAGGGAGGAAACTGGA	1
AHCY	AAAGACAAGAGGAATGACAG	TATTAACCCACCTTCTTGCT	1
ANKRD26	TTGGTCAAGTAAGTCTCCATGC	TGGAGAAGCAGCAGAACAGA	2
AV742111	TTTGTAAGCCCGGCTCGTA	CCTTTGTGGCCCATCTGTGTAT	3
B4GALT5	AAGTGGCTTGATCTGGGTGT	GATGATGGTGATTGGGCAGT	1
BFSP1	AAGAACTGGGAGAGAAGGGAT	CCAAAGAACCTTGTACCCTTGT	1
BS69	GGAAATGTGCAACCGTGTCAAC	TGGTCCAGACGACGTAAGTACTGAGAA	1
BZ908049	GGTGGATGTCTGTGGAGGCTCTG	AGGAATGCTTGGTGGAGGAGTATGG	3
BZ948834	TGAAGGCAGAGCAGGTAGACTTATG	CGTGGTGAAGTCCGCGGTTTC	3
C10orf7	GGCCAGCAGTAATACGATGTGAC	CGTCTTAACAGCTGCCGTGATCAA	2
C20orf104	AGAACAGTTTCCAGTGCTCCAG	CCACTTCAGTGTGCTTCCCTAA	3
C20orf140	CCCTTCCATGGACAGATG	AAGGCATCCATGGACAGG	3
CC470305	CACTAGGCAGTTGTTAATCGTTGTC	CAGGAGTTAGTTTCCATCTGCTATG	3
CC578975	CTGGCAACATCTTCTGGGCTGAC	ACAGAATAACTGCCAAGGTCGTGAC	3
CHGB	TCCACCACTTCACTGAAAGACC	CTATTAGACCAAGGGAAGCTGC	3
COMMD3	GGGTAAAGAGGGAATTTCTGC	ACTGTCTGCTTCCTTTTGGA	2
CRFG	GGTGAAGAAGGCCAAGACAA	CCAGCTTTCCTCTTTCTGA	3
CSNK2A1	CAGTTGGTGAGGATAGCCAAGG	TAGATGAGCCCATTCGAGCCTG	1

*Legenda - Ref. Referência; 1 - Institut National de la Recherche Agronomique, 2007; 2 - Jann et al., 2006; 3 - Everts-van der Wind et al., 2005.

Tabela 2.2.1 (continuação) – Relação de marcadores utilizados na otimização das condições de PCR, com a descrição dos primers utilizados e as respectivas referências.

Marcador	Primer Forward	Primer Reverse	Ref.*
CST3	ATTAACAGGCAGGCCACTGACC	GATCAGACAATGCCCAAGGAGC	3
CUGBP2	AAACTGTAAGACCATTTGAGT	GCAGAGAGAGAAACAAGTATT	1
DNAJC5	CTGACCTGTGCGGGAGTGTTTG	CTGGATGACGATCGGCGTGT	1
GNAS_(5)	TGCTCTAAGAAGGGAACCTCCA	CTTGAGGGAAAGGAAAGGTTGC	3
HCK	GCTGCCAACATCTTGGTCTCTG	AGCTGTCCACTTGATGGGGAAC	1
IDH3B	AAGTCTTGGCAGGTGGCATAAC	CCAACCTCACAAGGACCATACA	1
IL2RA	GCTGATGTGGAGTTCTTCGTATTC	TCGGTGATGACTGAGGCAAAG	1
ITGB1	AGTGCCGAGCCTTCAATAAA	AACAGTGGCCTCATTGTTCC	2
LBP	GTCAATCAGGAGGTGCAGGGTT	GCAGCCTTAGCCCTTGAAGAA	3
LOC128710_(5)	GGTAATACTTCAAAGGACCACC	GGCTTGCTGAAATGTCATGTAG	3
MAPRE1	AGTGCTACCAGCATCCACAAAG	GTTTGAGTTAGGAGCGTTTACC	1
MJ53F20	TTCAGGCATGACAATCAGGA	ACACTCAGGGTGCTCAGCTT	2
MLLT10	GCTCACAGCTCAGGTCAAAG	AACAGTTATAAGCAAAAAGT	1
NCOA5	CCATGGGCAGAAGAGAGCAGAT	CTCCTACCTGTTGCGTTCTAAG	1
NET1	AGGGTGGTGGACACACATGAAA	CAATTGCCTTCCCTCTTGCT	3
OXT	TCCACAGCACTTACCACCCCTAAC	CAGTTCATTGGCATGGCTGGTC	1
PLCB4	GTGAAATTGGAAGCCGAGAT	CACCAAGCTCATTTACTTGTGA	1
PLCG1	CCCTCAACTTCCAGACCC	TGCAGCACGTAGCCACAG	1
POLR3F	CCGTTTGGGTTTGGAGTAAGTA	GGACGCAGACTTGGAGCATGAG	1
PPP1CA	GATGACATGGAGCCCAGCACAGTG	AGAGAACAGAGGAAGCCGGGTGAG	2
PRNP	CACTGGGGGGAGCCGATAC	CACTTGGTTGGGGTAACGGTACA	1
PROCR	AGGTAGACATGGTACTCGGCTT	ACCACTACCTCTATTGCACCAG	3
PTGIS	CAACTTCCTGTGCCTGTGTTCA	ATTTCCATAACGGTGGGAGGAGC	1
S612	ACGTGGATAGAGGTGTCTGGTTCC	GTCGTAACACCATTCCCTGGCTAC	2
SNRPB2	ACCAATGCGAATCCAGTATGCC	CAGTTGTTGCAGTCTGTTCCAC	3
SVIL	CCTGGGTGGTCACTTTCATAAC	GAGAGCTGGTCACTTCAGGTTT	3
TDE1	GGGCTGCCTTCTTCATCCTCATTC	AGCACGATGCAGTATGGCTCTCAT	2
TGM2	GGGCCCTTTGGAATCGAATGTA	CAATCAGTTTGGTGGGTGGTCA	3
THBD	GCACCTTAGCTGGCGTCAGAAT	ATCCCTGCTCGCTTGTCTGATG	1
TOP1	GTCACAGCATCAACCAGAGGTCCT	AGGAAGTCATCAGGAAGTGGGCCT	2
YWHAB	GCAGCTGCTTAGGGACAATC	TCACAAAGCACGGTAGACAT	2

*Legenda - Ref. Referência; 1 - Institut National de la Recherche Agronomique, 2007; 2 - Jann et al., 2006; 3 - Everts-van der Wind et al., 2005.

2.3. Otimização das Condições de Amplificação dos Marcadores da Reação de PCR

Foram feitas reações de PCR com DNA de hamster, búfalo e bovino com cada um dos primers listados na Tabela 2.2.1 para que fosse possível identificar as condições de amplificação de fragmentos búfalo-específicos, úteis para mapeamento RH. Cada reação de PCR foi realizada em um volume final de 10µl contendo: 15ng de DNA; 1,5mM de MgCl₂; 10mM de Tris-HCl; 50mM de KCl; 0,2mM de cada dNTP (dGTP, dTTP, dATP e dCTP); 10pmol de cada primer (forward e reverse) e 0,5U de Taq DNA polimerase (Promega).

As reações foram realizadas em placas de PCR de 96 poços em termocicladores com o software de reação de gradiente. As condições de PCR incluíram 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de 95,0°C por 30 segundos, 50,0-65,0°C por 30 segundos, e 72,0°C por 30 segundos, com um ciclo de extensão final de 72,0°C por 7 minutos.

Dois métodos foram utilizados para identificação das temperaturas ótimas de anelamento para amplificação de fragmentos búfalo-específicos. Primeiramente, foi utilizado um termociclador com bloco de gradiente com variação entre 50,0°C e 65,0°C (50,0; 50,4; 51,2; 52,5; 54,2; 58,9; 61,0; 62,7; 63,9; 64,7 e 65,0°C). Esse método foi utilizado com 17 marcadores. No segundo método, foram testadas as seguintes temperaturas de anelamento, individualmente: 55,0; 58,0; 60,0; 62,0; 64,0 e 66,0°C. Esse método foi utilizado com os 32 marcadores restantes.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese a uma voltagem de 160V, durante 50 minutos em gel de agarose a 2% com tampão TBE 0,5X, e corado com brometo de etídeo. Os resultados foram visualizados com o fotodocumentador “Eagle Eye II” (Stratagene).

2.4. Genotipagem do Pannel RH de Búfalo

As condições ótimas de amplificação de fragmentos búfalo-específicos identificadas na fase de otimização foram aplicadas para genotipar o pannel RH. O pannel foi genotipado pelo menos duas vezes com cada um dos 44 marcadores otimizados. Os outros cinco marcadores otimizados foram excluídos.

O padrão de amplificação (presença/ausência) de cada marcador foi analisado em cada duplicata, individualmente. Nos casos de discordância entre as duplicatas, as imagens dos géis foram re-analisadas para identificação de erros de leitura dos géis. No caso de diferenças reais entre as duas genotipagens, novas amplificações dos clones discordantes foram realizadas. Uma tabela contendo o genótipo final de cada linhagem (presente = 1, ausente = 0 ou indefinido =2) para cada marcador foi gerada.

2.5. Análise de dados para construção do mapa RH

Os dados de genotipagem do painel RH de búfalo gerados com cada marcador avaliado foram analisados com o programa Carthagene v.1.0 (de Givry et al., 2005), o qual implementa a função de máxima verossimilhança como descrita por Lange et al. (1995) e utiliza o parâmetro LOD (\log_{10} do “Odds Ratio”). O Conjunto de dados e parâmetros utilizados no programa Carthagene v1.0 para a construção do mapa do cromossomo bubalino 14 encontra-se no Anexo B.

O programa MapChart[®] v.2.2 (Voorrips, 2002) foi utilizado para desenhar o mapa do cromossomo bubalino BBU14 com base no resultado das análises realizadas a partir da ordem dos marcadores resultantes no mapa e suas respectivas distâncias em centiRays (cR) (Anexo C.1.).

2.6. Construção do Mapa Comparativo

Com a construção do mapa RH do cromossomo BBU14 foi possível construir um mapa comparativo com a seqüência do cromossomo bovino BTA13 v4.0 (NCBI, 2008). As coordenadas descritas no BTA13 (em Mpb - Anexo C.2) foram levantadas do NCBI para todos os marcadores mapeados no búfalo. O programa MapChart[®] v.2.2 foi utilizado para desenhar um mapa a partir dessas informações. Adicionalmente, o mapa citogenético do BBU14 (Di Meo et al., 2008) também foi utilizado na construção do mapa comparativo – um total de quatro marcadores mapeados por FISH (IL2RA, PRNP, THBD, OXT) foi utilizado para ancorar o mapa RH no BBU14.

Além desses, utilizou-se também o mapa do cromossomo bubalino 14 produzido pelo CIMRHGB (Amaral et al., 2009), para que fosse possível avaliar a consistência do mapa preliminar produzido nesse estudo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Otimização da Reação de PCR

Um total de 49 marcadores moleculares Tipo I, derivados de ESTs (*Expressed Sequence Tags*), RNAs mensageiros completamente sequenciados, sequencias de pontas de BAC, e genes do cromossomo BTA13 foram testados. Desses, condições para amplificação de fragmentos búfalo-específicos, úteis para o mapeamento RH, foram obtidas para um total de 44 marcadores.

Dos marcadores excluídos, 03 não amplificaram nenhum fragmento, 01 amplificou mais de um fragmento e 01 amplificou fragmentos do mesmo tamanho tanto no búfalo quanto no hamster e, portanto, não puderam ser utilizados para genotipar o painel RH.

As reações de otimização dos primers se deram num primeiro momento através da utilização de um termociclador com bloco de gradiente de temperatura (Figura 3.1.1). Essa metodologia, embora bastante prática, trouxe resultados inconsistentes na fase posterior de genotipagem do painel RH com os marcadores otimizados. Em seguida, utilizou-se uma otimização das reações de PCR através do teste de vários marcadores a uma determinada temperatura fixa (Figura 3.1.2). Essa metodologia trouxe resultados mais consistentes na fase de genotipagem do painel.

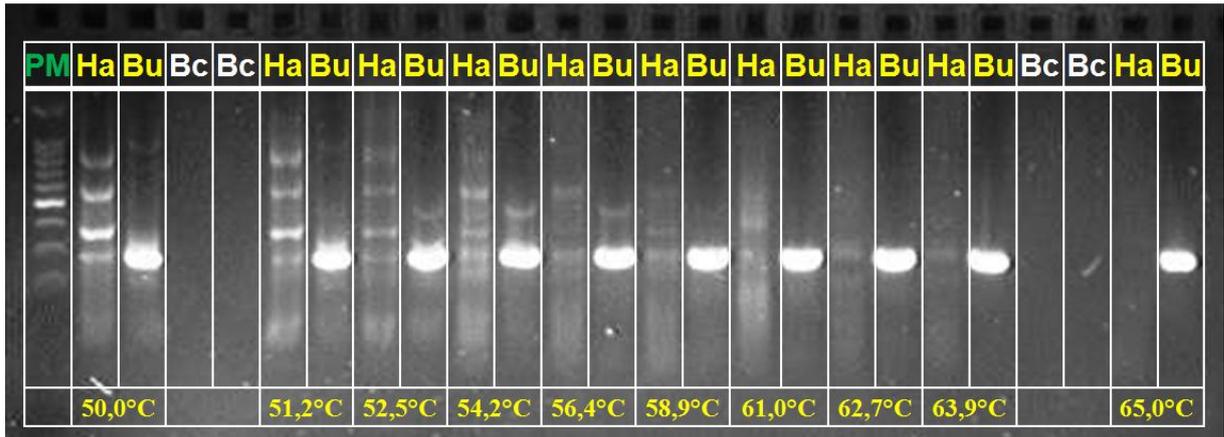


Figura 3.1.1: Produtos da otimização do marcador S612 com reação de gradiente em gel de agarose 2%: Os DNAs de búfalo (**Bu**) e de hamster (**Ha**) são testados em diferentes temperaturas, para amplificação de um fragmento búfalo-específico. Procurou-se a temperatura mais alta em que exista amplificação para búfalo, mas não em hamster. **PM:** Padrão de peso molecular (100pb); **Bc:** Branco.

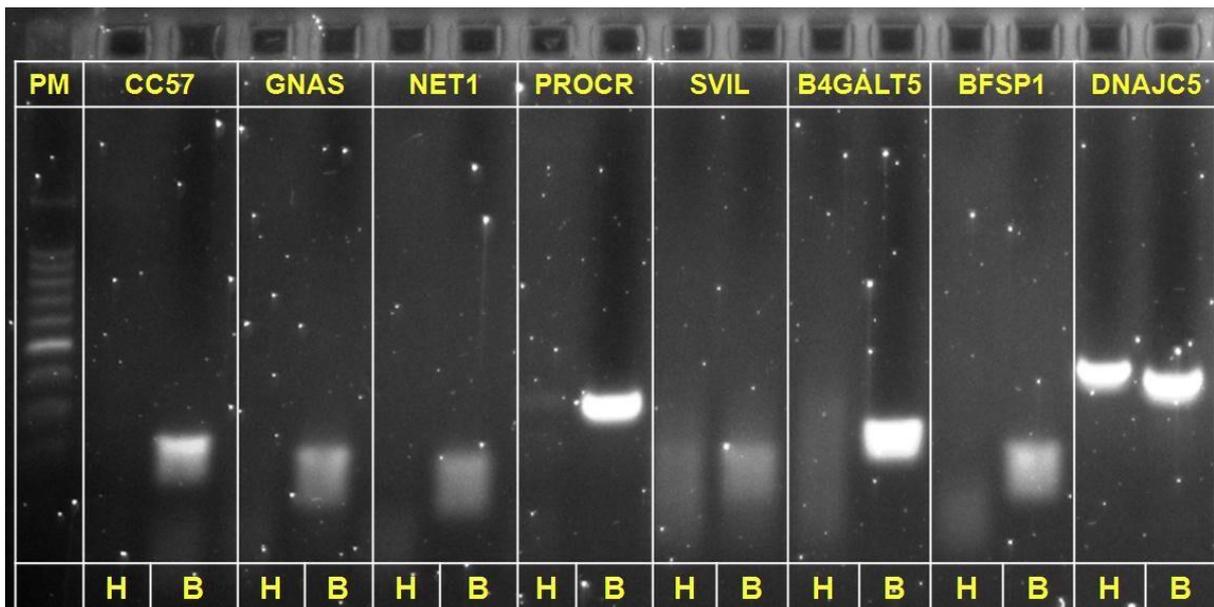


Figura 3.1.2: Exemplo de produtos de otimização dos marcadores com temperaturas fixas em gel de agarose 2%: Os DNAs de búfalo (**B**) e de hamster (**H**) foram testados com os marcadores (**CC57**, **GNAS**, **NET1**, **PROCR**, **SVIL**, **B4GALT5**, **BFSP1** E **DNAJC5**) a uma temperatura de anelamento fixa de 64°C. Outras reações de PCR foram realizadas com outras temperaturas fixas diferentes, a fim de se observar as amplificações ótimas de fragmentos búfalo-específicos. **PM:** Padrão de peso molecular (100pb).

3.2. Genotipagem do Painel RH de Búfalo

Um total de 44 marcadores foi utilizado para genotipar o painel RH de búfalo. Desses, 37 (84,1%) apresentaram resultados consistentes (Tabela 3.2.1). Essa proporção se encontra dentro da variação encontrada nos mapas RH previamente gerados de bovinos e bubalinos, onde o percentual de marcadores com resultados satisfatórios, nessa etapa, varia entre 76% (Goldammer et al., 2007) e 96% (Amaral et al., 2007).

Os sete marcadores excluídos das análises posteriores apresentaram resultados inconsistentes entre as réplicas de genotipagem do painel RH, ou apresentaram amplificação em um número muito reduzido de clones (menos de 10), resultando em frequências de retenção muito baixas (menor que 10%). Os vetores correspondentes a cada marcador genotipado encontram-se no Anexo B.1.

Tabela 3.2.1 – Relação dos marcadores genotipados, tipo, tamanho do produto de PCR em bovinos e em bubalinos, temperatura de anelamento e frequência de retenção.

Marcador	Tipo	Tamanho Produto de PCR em Bovinos.	Temp. de Anel. °C	Tamanho Aproximado do Produto de PCR em Búfalo.	*Freq. de Retenção.
ADA	EST	742 bp	58°C	750 bp	7,8%
ANKRD26	EST	~190 bp	62°C	190 bp	16,7%
B4GALT5	EST	180 bp	62°C	180 bp	14,4%
BPI	mRNA	218 bp	60°C	220 bp	15,6%
BS69	EST	210 bp	62°C	210 bp	26,77%
BZ908049	BES	201 bp	60°C	200 bp	25,6%
BZ948834	BES	204 bp	60°C	200 bp	21,1%
C10orf7	EST	~210 bp	62°C	210 bp	13,3%
C20orf104	EST	105 bp	60°C	110 bp	25,6%
CC470305	BES	175 bp	62°C	180 bp	22,2%
CC578975	BES	177 bp	62°C	180 bp	14,4%
CHGB	mRNA	284 bp	58°C	280 bp	17,8%
COMMD3	EST	~110 bp	62°C	110 bp	21,1%
CRFG	EST	131 bp	62°C	130 bp	21,1%
CST3	mRNA	135 bp	63°C	140 bp	26,7%
DNAJC5	mRNA	340 bp	63°C	340 bp	23,3%
GNAS_(5)	mRNA	133 bp	62°C	130 bp	18,9%
IDH3B	EST	234 bp	60°C	230 bp	16,7%
IL2RA	Gene	224 bp	62°C	220 bp	24,4%

* = $\sum(\text{clones positivos}) + \sum(\text{clones \#2}) / \text{Total}$

Tabela 3.2.1 (continuação) – Relação dos marcadores genotipados, tipo, tamanho do produto de PCR em bovinos e em bubalinos, temperatura de anelamento e frequência de retenção.

Marcador	Tipo	Tamanho Produto de PCR em Bovinos.	Temp. de Anel. °C	Tamanho Aproximado do Produto de PCR em Búfalo.	*Freq. de Retenção.
MAPRE1	EST	109 bp	62°C	110 bp	28,9%
MJ53F20	EST	~200 bp	62°C	200 bp	30,0%
NCOA5	EST	109 bp	58°C	110 bp	16,7%
NET1	EST	114 bp	63°C	110 bp	37,8%
OXT	5' UTR	333 bp	60°C	330 bp	15,6%
PLCB4	EST	352 bp	60°C	350 bp	32,2%
PLCG1	mRNA	155 bp	60°C	180 bp	12,2%
POLR3F	EST	127 bp	64°C	130 bp	21,1%
PRNP	mRNA	411 bp	58°C	410 bp	14,4%
PROCR	mRNA	274 bp	62°C	280 bp	15,6%
PTGIS	mRNA	220 bp	62°C	220 bp	17,8%
S612	EST	~380 bp	60°C	380 bp	17,8%
SNRPB2	EST	127 bp	60°C	130 bp	20,0%
SVIL	mRNA	118 bp	60°C	120 bp	24,4%
TDE1	EST	~170 bp	64°C	170 bp	28,9%
TGM2	mRNA	205 bp	60°C	200 bp	22,2%
THBD	mRNA	143 bp	62°C	150 bp	20,0%
YWHAB	EST	389 bp	60°C	390 bp	11,1%

$$* = \frac{\sum(\text{clones positivos})}{\sum(\text{clones \#2}) + \text{Total}}$$

O percentual de linhagens em que um marcador amplifica fragmentos búfalo-específicos, em relação ao número total de linhagens, é denominado “frequência de retenção” - FR (Chowdhary & Raudsepp, 2005). Este parâmetro é importante para o cálculo dos demais parâmetros utilizados para a montagem do mapa. Marcadores com FR próximas a 0% ou a 100% não podem ser mapeados. Os marcadores genotipados nesse trabalho apresentaram uma frequência de retenção média de 20,5%, variando entre 7,8% (ADA) e 37,8% (NET1).

O número de linhagens influencia no valor médio ideal da FR para inclusão de marcadores no mapa. Em um painel RH típico com 90 linhagens, como o que foi utilizado, frequências de retenção de 20% permitem a inclusão de marcadores com LOD mínimo de 3,0 (Barret, 1992; Jones, 1996). Os mapas RH de bovinos apresentaram uma FR média variando entre 17,5% (Itoh et al., 2005) e 22,4% (Band et al., 2000). Os mapas RH preliminares de cromossomos bubalinos individuais, construídos com o mesmo painel utilizado nesse estudo, resultaram em frequências de retenção média variando entre 15,14% (Ianella et al., 2008) e

39,8% (Amaral et al., 2007). É importante observar que a baixa FR do cromossomo X encontrada por Ianella e colaboradores (2008) era esperada, já que o painel aqui utilizado foi construído a partir de uma linhagem celular de um animal macho (XY) e portanto as sequências oriundas do cromossomo X estão representadas em menor número. No estudo conduzido por Amaral e colaboradores (2007), a alta FR observada também era esperada, pois o marcador seletivo “TK” está inserido no cromossomo estudado.

A figura 3.2.1 exemplifica um resultado típico da genotipagem do painel RH com um dos marcadores otimizados (S612). Observa-se claramente a amplificação do fragmento esperado nos DNAs dos controles positivos bovino e bubalino, e a não amplificação no DNA de hamster (controle negativo). As linhagens que possuem o fragmento (positivas) estão indicadas pelas setas.

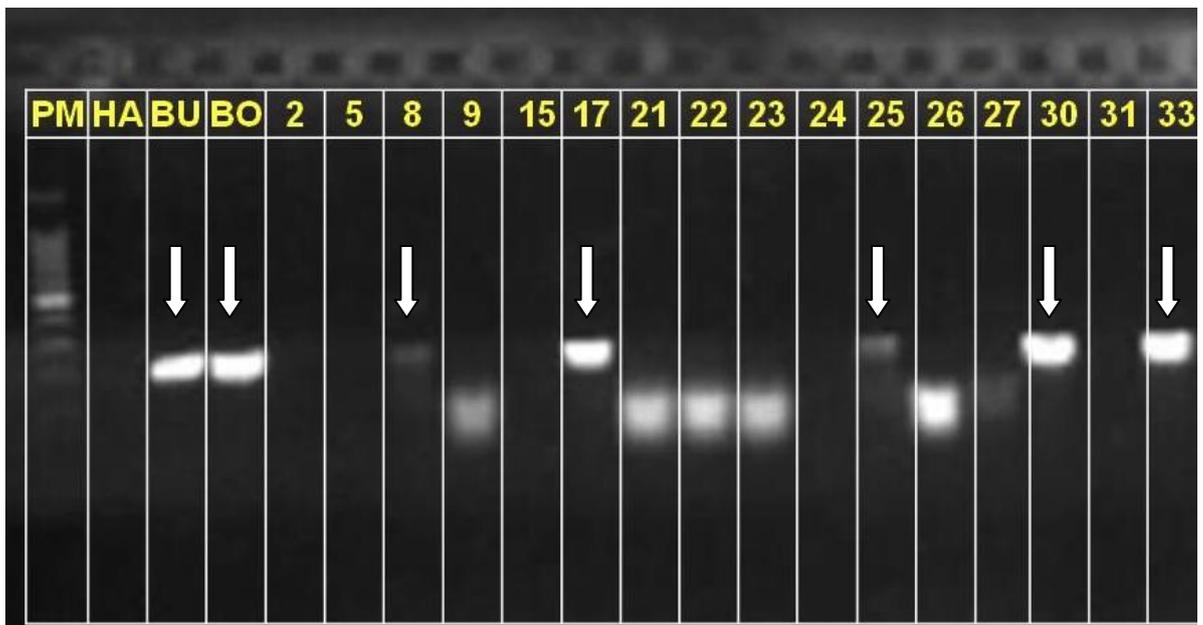


Figura 3.2.1: Gel de agarose a 2,0% mostrando as diversas linhagens do painel (números) genotipadas com o marcador S612. Os fragmentos sinalizados com setas indicam a presença do marcador na respectivas linhagens. BU e BO indicam DNA bovino e bubalino, respectivamente (controles positivos de amplificação), e HA indica DNA de hamster (controle negativo). PM: padrão de peso molecular de 100pb.

3.3. Análise de dados para construção do mapa RH

Dados de 37 marcadores genotipados no painel RH foram utilizados para a construção do mapa preliminar do BBU14. O valor de LOD mínimo para inclusão de um marcador no mapa foi de 3,0. O mapa preliminar gerado contém um total de 28 marcadores

(75,7%, Anexo D). O percentual de marcadores incluídos em outros mapas RH de cromossomos bubalinos e bovinos, em relação ao total genotipado, variou entre 68,8% (Ianella et al., 2008) e 90,3% (Amaral et al., 2007).

Os marcadores incluídos no mapa gerado para o BBU14 apresentaram um valor de LOD-2-pontos médio de 6,2 e uma frequência de retenção média de 20,7%. Os outros nove marcadores foram excluídos por não apresentarem o critério mínimo de inserção no mapa ($LOD \geq 3$). O mapa produzido apresentou um “*log10-likelihood*” de -374,7 com um tamanho estimado de $1241,4cR_{5000}$ e distância média entre marcadores de $44cR_{5000}$. A tabela 3.3.1 apresenta os marcadores mapeados com as respectivas distâncias estimadas. Devido a homologia entre os cromossomos bubalino 14 e o bovino 13, é estimado que o tamanho do cromossomo 14 bubalino seja semelhante ao cromossomo 13 bovino, ou seja, cerca de 84Mpb (NCBI, 2008). Com isso, pode-se estimar uma relação de 68Kb para cada cR_{5000} .

Tabela 3.3.1: Resultado das análises para construção do mapa RH preliminar do BBU14 com o programa Carthagene

Pos	Marcador	Dist. (cR)	Acum. (cR)	2pt LOD	Pos	Marcador	Dist. (cR)	Acum. (cR)	2pt LOD
1	S612	0	0	-	15	CHGB	52,9	886,9	4,5
2	COMMD3	45,4	45,4	5,9	16	IDH3B	64,4	951,3	3,8
3	SNRPB2	70,4	115,9	4,0	17	OXT	20,3	971,6	9,6
4	IL2RA	30,2	146,0	9,7	18	DNAJC5	25,6	997,2	7,8
5	MJ53F20	125,5	271,5	1,6	19	THBD	43,4	1040,6	6,0
6	PLCB4	57,6	329,1	6,2	20	GNAS_(5)	59,6	1100,2	4,7
7	C470305	39,6	368,7	8,6	21	MAPRE1	75,7	1175,9	4,1
8	C578975	142,2	510,8	0,8	22	TGM2	36,4	1212,3	9,3
9	POLR3F	33,6	544,4	7,6	23	BPI	42,9	1255,3	6,6
10	BZ948834	30,9	575,4	9,2	24	PTGIS	30,0	1285,2	7,6
11	BZ908049	114,2	689,6	1,9	25	B4GALT5	35,8	1321,0	6,4
12	CRFG	61,9	751,4	5,1	26	YWHAB	32,9	1353,9	5,7
13	BS69	25,0	776,4	11,3	27	NCOA5	31,8	1385,7	6,3
14	PRNP	57,6	834,0	5,2	28	TDE1	35,6	1421,4	8,4

Legenda:

Pos. - posição do marcador relativa ao centrômero;

Dist. - distância entre os marcadores em centiRays;

Acum. - distância acumulada do centrômero em centiRays (cR);

2pt LOD - LOD calculado para a distância estimada entre cada par de marcadores.

3.4. Desenho do mapa e mapeamento comparativo

O tamanho estimado do mapa RH preliminar do cromossomo 14 de búfalo foi de $1241,4cR_{5000}$. A distância média estimada entre os marcadores foi de $44,3cR_{5000}$. O tamanho estimado do mapa RH do cromossomo bovino correspondente ao BBU14 (BTA13) foi de $856cR_{5000}$ na última versão (3ª geração) publicada (Everts-van der Wind et al., 2005). O mapa do BTA13 mencionado, embora menor que o mapa do BBU14 construído, foi construído com um número significativamente maior de marcadores, totalizando 125, com uma distância média de $6,86cR_{5000}$ entre os marcadores.

A comparação do mapa RH preliminar mostrado na figura 3.4.1 com o mapa citogenético e com a montagem do genoma bovino revela poucas discordâncias. As discrepâncias na ordem dos marcadores observadas entre os cromossomos BTA13 e BBU14 podem indicar a existência de rearranjos cromossômicos ocorridos após sua especiação. Essas questões deverão ser melhor investigadas, com a adição de mais marcadores nas regiões em questão, para aumentar a resolução do mapa RH produzido. Além disso, é possível também que as diferenças observadas sejam decorrentes de erros na montagem do genoma bovino, uma questão que continua sendo trabalhada, com a incorporação de novos dados. Quando comprovados, os rearranjos cromossômicos identificados poderão contribuir para elucidar os mapas para o búfalo, assim como os mapas para outros membros da família Bovidae.

Considerando-se as limitadas fontes de informações genômicas previamente disponíveis para o búfalo de rio, a informação de mapeamento comparativo apresentada nesse estudo representa uma contribuição significativa para a elucidação do genoma desta espécie. O alinhamento do mapa produzido com a sequência genômica bovina torna possível extrapolar a localização de outros genes ainda não mapeados no búfalo, contribuindo com informações importantes para os estudos do genoma bubalino, principalmente em relação à identificação de genes que afetam características de produtividade.

Os resultados da análise global realizada pelo CIMRHGB, contendo todos os dados gerados por todos os laboratórios envolvidos, já foram publicados (Amaral et al., 2008 - Anexo E). Nesse estudo, genotipou-se um total de 3.992 marcadores no painel BBURH₅₀₀₀. Desses, 3.074 foram SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) derivados e distribuídos pelo genoma bovino, e os outros 918 foram classificados como “*Sequence Tagged Site*” (STS), incluindo genes codificantes, ESTs e microssatélites. O mapa gerado no presente estudo

(CENARGEN) deve ser considerado como um mapa preliminar (Figura 3.4.1), pois não inclui ainda os dados dos demais marcadores que foram adicionados pelo consórcio.

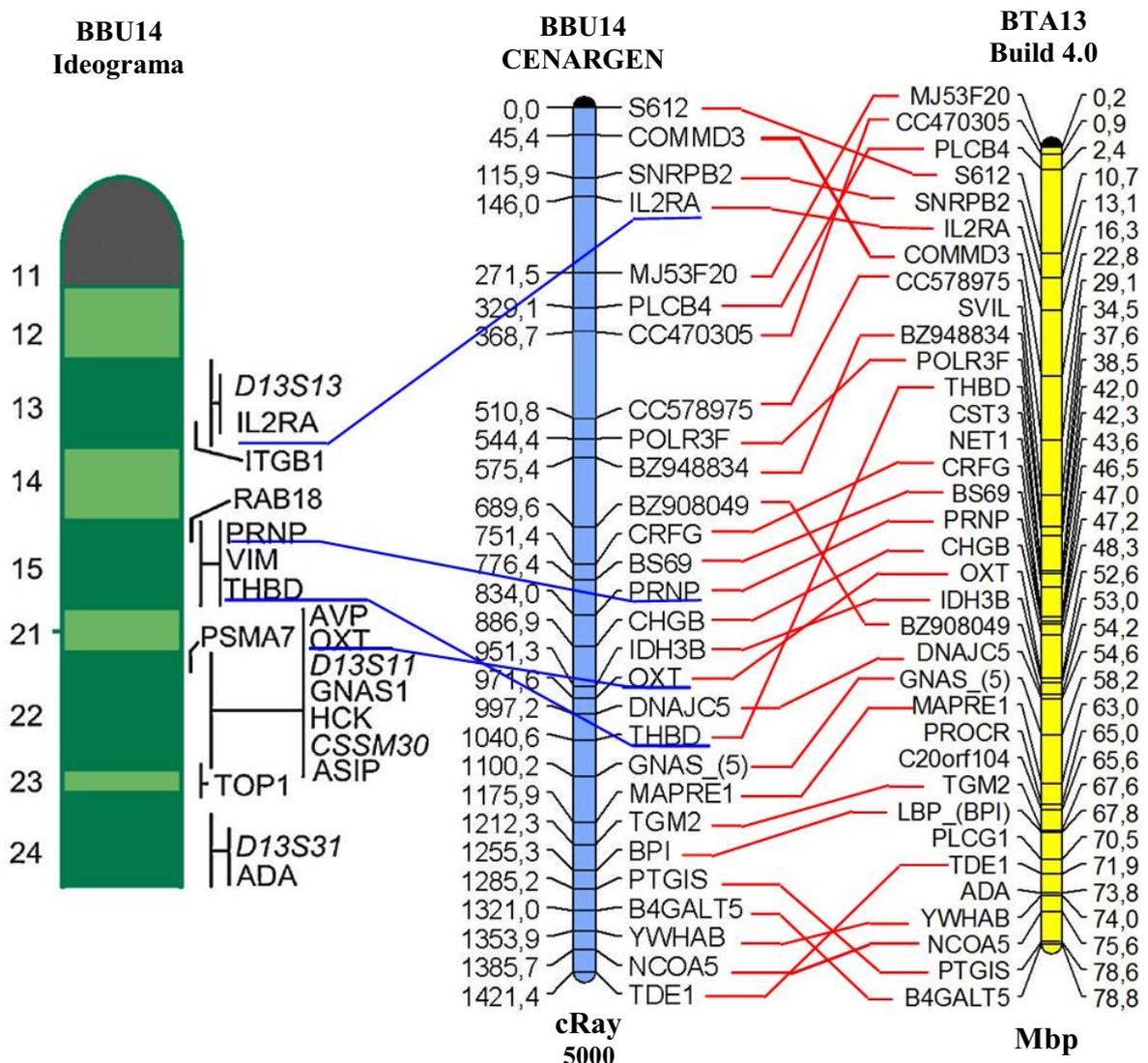


Figura 3.4.1: Mapa RH preliminar do cromossomo BBU14 (azul, no centro) em comparação com o mapa molecular do BTA13 – versão 4.0 (amarelo, na direita) e ancorado ao mapa citogenético do cromossomo BBU14 (verde, na esquerda).

Os dados dos marcadores gerados nesse estudo serviram de referência (âncora) e foram somados aos dados dos marcadores SNP que foram posteriormente adicionados pelo CIMRHGB. A inserção de um número significativamente maior de marcadores no mapa do Consórcio (94) em relação ao mapa construído no presente estudo (28), permitiu a utilização de critérios mais rígidos de LOD ($\text{LOD} \geq 8$) para a inserção de marcadores no mapa do BBU14 (Figura 3.4.2) – no presente estudo foi utilizado $\text{LOD} \geq 3$.

A maior densidade de marcadores, com espaçamento médio menor, permitiu ao Consórcio construir um mapa para o BBU14 com maior acurácia. Outros exemplos

ilustrando essa questão podem ser encontrados na literatura. O estudo conduzido por Itoh e colaboradores (2005) utilizou 5.593 loci, permitindo a exclusão de marcadores com LOD inferiores a 20. Por outro lado, Band e colaboradores (2000), na sua primeira geração do mapa RH bovino, incluíram 1.087 marcadores, utilizando como parâmetro de corte para inclusão de marcadores $LOD \geq 3$.

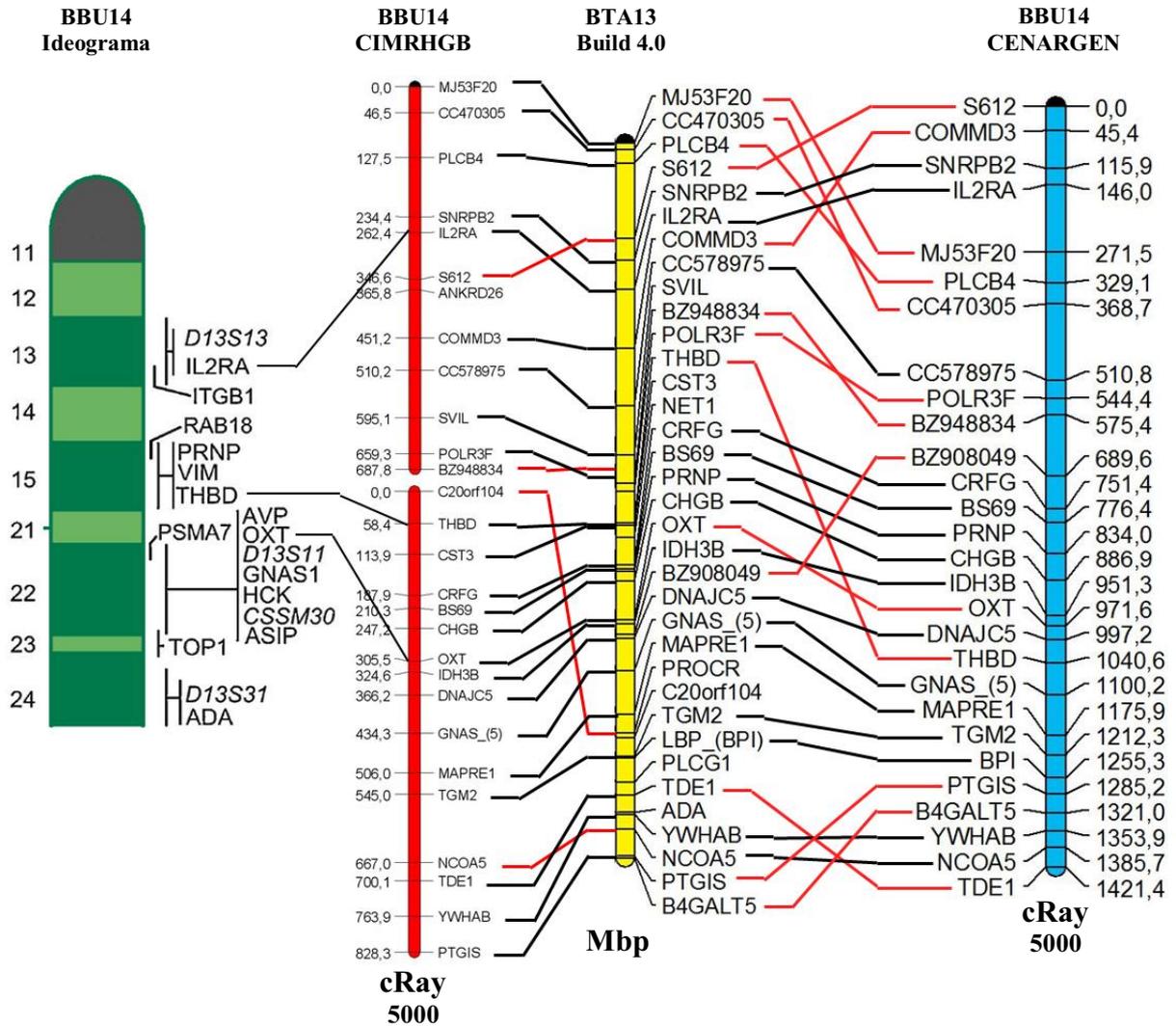


Figura 3.4.2: Comparação entre os mapas do cromossomo 14 bubalino gerados nesse estudo e pelo CIMRHGB com o mapa bovino. O mapa RH preliminar do cromossomo BBU14 gerado nesse estudo (azul, na direita) apresenta alinhamentos mais discrepantes com o mapa do cromossomo 14 bovino v. 4.0 (amarelo, centro-direito) em comparação com o mapa RH do cromossomo BBU14 gerado pelo consórcio - CIMRHGB (vermelho, centro-esquerdo), que está ancorado ao mapa citogenético do cromossomo BBU14 (verde, na esquerda). As linhas em vermelho indiciam prováveis inversões ou rearranjos ocorridos durante a evolução dessas espécies.

A comparação do mapa produzido pelo CIMRHGB com o mapa preliminar produzido neste estudo (Figura 3.4.3) revela que algumas supostas inversões entre o BTA13 e o BBU14 que não foram confirmadas. A inversão dos marcadores THBD e OXT no mapa do CENARGEN com relação ao citogenético não foi confirmada no mapa CIMRHGB. Nota-se também, que alguns marcadores presentes no mapa CENARGEN não foram incluídos no mapa CIMRHGB (BZ908049, PRNP, IDH3B, e B4GALT5), enquanto que os marcadores ANKRD26, SVIL, C20orf104 e CST3 listados no mapa CIMRHGB também não se encontram presentes no mapa CENARGEN. Observou-se uma inversão na ordem dos marcadores BZ948834 e S612 nos dois mapas. Portanto, temos evidências de que uma inversão cromossômica ocorreu em uma das espécies, após a diversificação do ancestral comum.

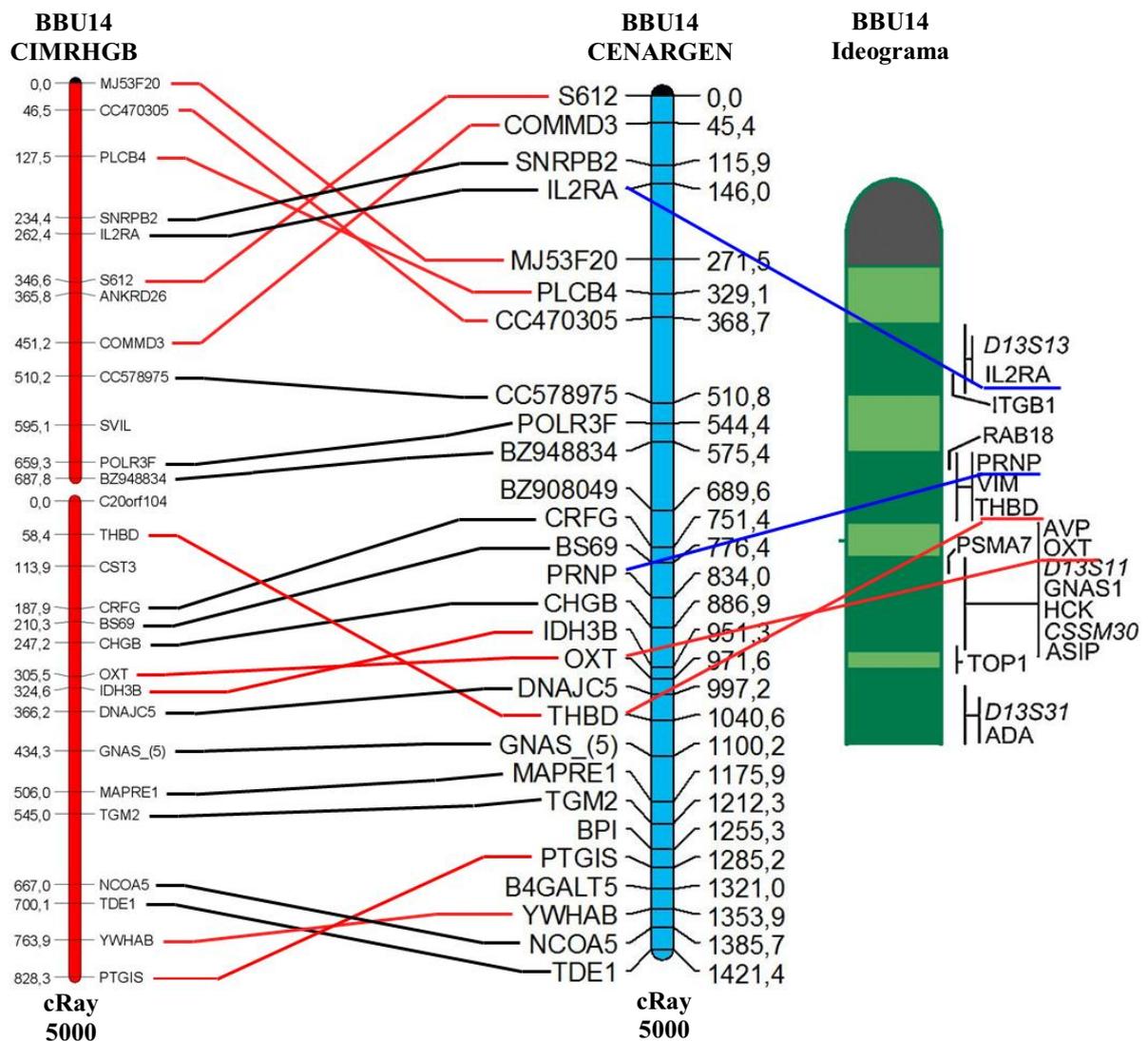


Figura 3.4.3: Comparação entre os mapas do cromossomo 14 bubalino gerados nesse estudo e pelo CIMRHGB. Observa-se as discrepâncias (linhas vermelhas) resolvidas pelo mapa do consórcio (vermelho, na esquerda), com a adição de mais marcadores e um LOD mais alto. Observa-se também a não inclusão de alguns marcadores do mapa preliminar produzido nesse estudo (azul, na direita) no mapa do consórcio.

Diferenças entre os mapas gerados pelo Consórcio e os mapas preliminares gerados para outros cromossomos bubalinos foram observadas. A figura 3.4.4 mostra uma comparação entre o mapa preliminar (Stafuzza et al. 2007) e o mapa gerado pelo Consórcio para o BBU6. Nesse caso, também se observam marcadores que foram incluídos em um dos mapas, mas não no outro. Nota-se também que existem várias discordâncias na ordem entre os marcadores.

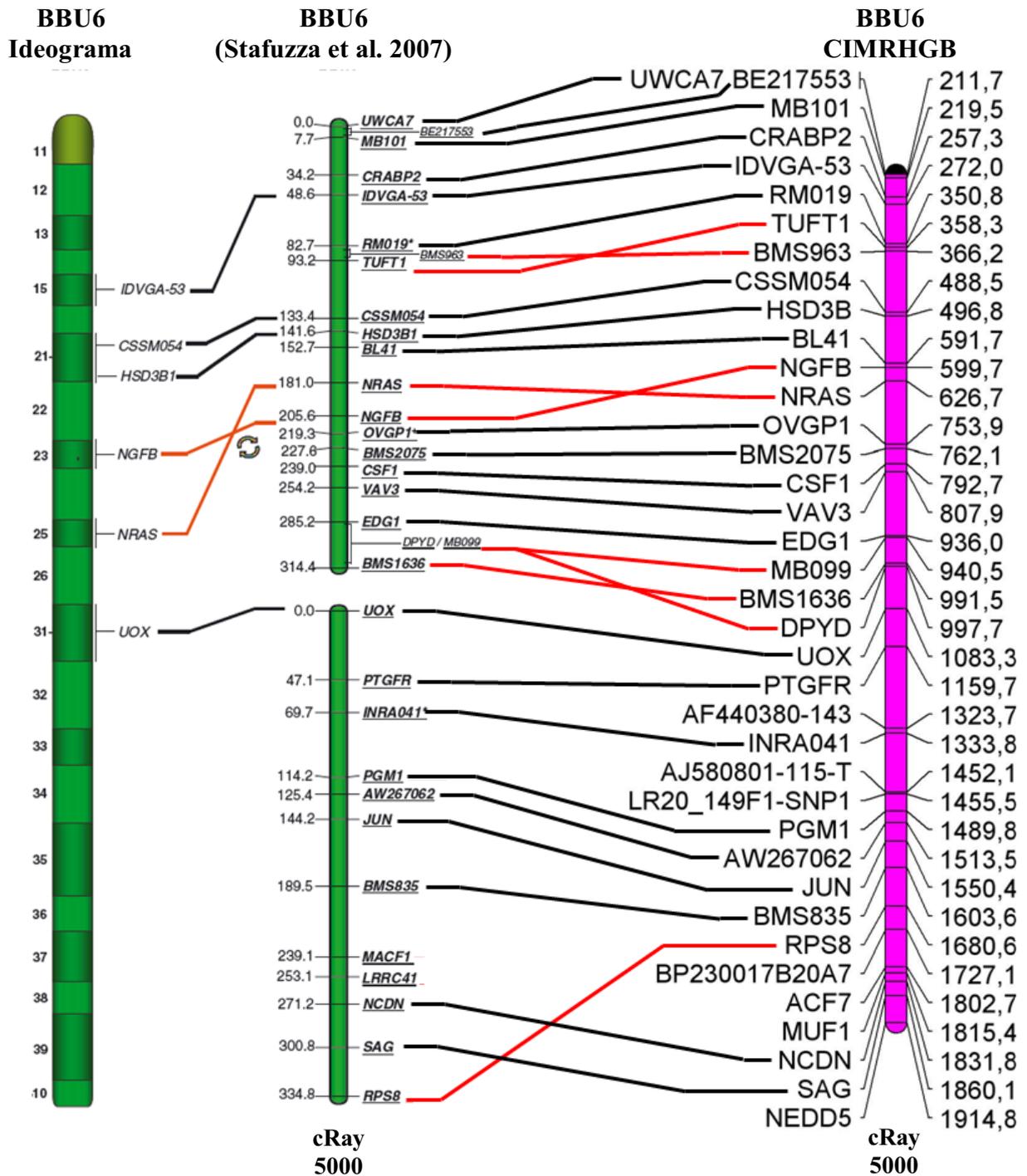


Figura 3.4.4: Comparação entre os mapas do cromossomo 6 bubalino preliminar e o gerado pelo CIMRHGB. O mapa preliminar do cromossomo 6 bubalino (Stafuzza et al., 2007 - verde, à esquerda) possui marcadores diferentemente incluídos e ordens diferentes do mapa gerado pelo consórcio (em rosa, à direita). As linhas vermelhas indicam as discrepâncias.

4. CONCLUSÃO

Este trabalho resultou em uma contribuição significativa para a construção do primeiro mapa RH do genoma do búfalo de rio (*Bubalus bubalis*), utilizando um painel de células somáticas híbridas irradiadas (BBURH₅₀₀₀) e marcadores previamente mapeados em bovinos. A estratégia de escolha e otimização de condições de PCR de marcadores mapeados no genoma bovino produziu resultados condizentes com o objetivo proposto e dentro dos resultados obtidos por outros estudos observados na literatura. O recurso gerado será útil para identificação de regiões genômicas que controlam características de interesse econômico para a bubalinocultura, e posterior identificação dos genes responsáveis.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, M.E.; GRANT, J.R.; RIGGS, P.K. et al. A first generation whole genome RH map of the river buffalo with comparison to domestic cattle. **BMC Genomics**, v. 9, p. 631, 2008.
- AMARAL, M.E.; OWENS, K.E.; ELLIOTT, J.S. et al. Construction of a river buffalo (*Bubalus bubalis*) whole-genome radiation hybrid panel and preliminary RH mapping of chromosomes 3 and 10. **Animal Genetics**, v. 38, p. 311-314, 2007.
- ANDRADE, V.J.; GARCIA, S.K. Padrões raciais e registro de bubalinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n.1, p. 39-45, 2005.
- BAND, M.R.; LARSON, J.H.; REBEIZ, M. et al. An ordered comparative map of the cattle and human genomes. **Genome Research**, v. 10, p. 1359–1368, 2000.
- BARRETT, J.H. Genetic mapping based on radiation hybrid data. **Genomics**, v. 13, p. 95-103, 1992.
- BENTLEY, D.R.; BALASUBRAMANIAN, S.; SWERDLOW, H.P. et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. **Nature**, v. 456, n. 7218, p. 53-59, 2008.
- CHOWDHARY, B.P.; RAUDSEPP, T. Mapping genomes at the chromosome level. In: RUVINSKY, A.; GRAVES, J.A.M. **Mammalian Genomics**. Ed. CABI: Oxfordshire, 2005, 600p.
- DE GIVRY, S.; BOUCHEZ, M.; CHABRIER, P. et al. Carthagene: Multipopulation integrated genetic and radiated hybrid mapping. **Bioinformatics**, v. 21, n. 8, p.1703-1704, 2005.
- DI MEO, G.P.; PERUCATTI, A.; FLORIOT, S. et al. An extended river buffalo (*Bubalus bubalis*, 2n = 50) cytogenetic map: assignment of 68 autosomal loci by FISH-mapping and R-banding and comparison with human chromosomes. **Chromosome Research : an International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology**, v. 16, n. 6, p.827-837, 2008.

- EID, J.; FEHR, A.; GRAY, J. et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. **Science**. v. 323, n. 5910, p. 133-138. 2009.
- EVERTS-VAN DER WIND, A.E.; KATA, S.R.; BAND, M.R. et al. Gene cattle-human comparative map with anchor points defined by human genome sequence coordinates. **Genome Research**, v. 14, p. 1424-1437, 2004.
- EVERTS-VAN DER WIND, A.; LARKIN, D.M.; GREEN, C.A. et al. A high-resolution whole-genome cattle-human comparative map reveals details of mammalian chromosome evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 51, p. 18526-18531, 2005.
- GALLAGHER, D.S.; SCHLÄPFER, J.; BURZLAFF, J.D. et al. Cytogenetic alignment of the bovine chromosome 13 genome map by fluorescence in-situ hybridization of human chromosome 10 and 20 comparative markers. **Chromosome Research**, v. 7, p. 115-119, 1999.
- GALLAGHER, D.S.; WOMACK, J.E. Chromosome conservation in the bovidae. **The Journal of Heredity**, v. 83, p. 287-298. 1992.
- GOLDAMMER, T.; WEIKARD, R.; MIZIARA, M.N. et al. A radiation hybrid map of river buffalo (*Bubalus bubalis*) chromosome 7 and comparative mapping to the cattle and human genomes. **Cytogenetic Genome Research**, v. 119, n. 3-4, 2007.
- IANELLA, P.; VENANCIO, L.P.; STAFUZZA, N.B. et al. First radiation hybrid map of the river buffalo X chromosome (BBUX) and comparison with BTAX. **Animal Genetics**. v. 39, n. 2, p. 196-200, 2008.
- IANNUZZI, L. DI MEO, G.P.; PERUCATTI, A. et al. The river buffalo (*Bubalus bubalis*, 2n = 50) cytogenetic map: assignment of 64 loci by fluorescence *in situ* hybridization and R-banding. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 102, p. 65-75, 2003.
- ITOH, T.; WATANABE, T.; IHARA, N. et al. A comprehensive radiation hybrid map of the bovine genome comprising 5593 loci. **Genomics**. v. 4, p. 413-424, 2005.
- JANN, O.C.; AERTS, J.; JONES, M. et al. A second generation radiation hybrid map to aid the assembly of the bovine genome sequence. **BMC Genomics**. v. 7, p. 283, 2006.
- JONES, H.B. Hybrid selection as a method of increasing mapping power for radiation hybrids. **Genome research**, v. 6, p. 761-769, 1996.
- LANGE, K.; BOEHNKE, M.; COX, D.R. et al. Statistical methods for polyploid radiation hybrid mapping. **Genome Research**, v. 5, p. 136-150, 1995.
- MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W.E. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**. v. 437, n. 7057, p. 376-380, 2005.

- NCBI. **NCBI Map Viewer.** Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9913 Acesso em: 16/09/2007.
- NCBI. **NCBI Map Viewer.** Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9913 Acesso em: 22/08/2008.
- O'BRIEN, S. J.; EIZIRIK, E.; MURPHY, W. J. Genomics. On choosing mammalian genomes for sequencing. **Science**, v. 292, p. 2264-2266, 2001.
- SCHIEX, T.; DE GIVRY, S.; CHABRIER, P. et al. Carthagène - User Documentation. **INRA - Institut National de la Recherche Agronomique.** Disponível em <http://www.inra.fr/internet/Departements/MIA/T//CarthaGene/docs/User.pdf>, 2005. Acesso em 25/08/07.
- STAFUZZA, N.B.; IANELLA, P.; MIZIARA, M.N. et al. Preliminary radiation hybrid map for river buffalo chromosome 6 and comparison to bovine chromosome 3. **Animal Genetics**, v.38, p.406-409, 2007.
- STONE, R.T.; KEELE, J.W.; SHACKELFORD, S.D. et al. A Primary screen of the bovine genome for quantitative trait loci affecting carcass and growth traits. **American Society of Animal Science**, v. 77, p. 1379-1384, 1999.
- VALOUEV, A.; ICHIKAWA, J.; TONTHAT, T. et al. A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. **Genome Research**, v. 18, n. 7, p. 1051-1063, 2008.
- VOORRIPS, R.E. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. **The Journal of Heredity**, v. 93, n. 1, p. 77-78, 2002.
- YANG, Y.P.; WOMACK, J.E. Parallel radiation hybrid mapping: a powerful tool for high-resolution genomic comparison. **Genome Research**, v. 8, p. 731-736, 1998.

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo contribuiu significativamente para a construção do primeiro mapa RH de búfalo de rio, sendo uma importante ferramenta genética de prospecção de genes de interesse zootécnico. Apesar de este mapa ser ainda o de primeira geração, inseriu-se, na média, uma grande quantidade de marcadores (aproximadamente 160 marcadores por cromossomo), com o objetivo de tornar o mapa bastante saturado. Novas gerações do mapa devem ser produzidas, com a finalidade de tornar o mapa mais saturado, informativo e preciso.

As novas tecnologias de sequenciamento, como a Roche 454 (Margulies et al. 2005), Solexa-Illumina (Bentley et al., 2008), ABI Solid (Valouev et al., 2008), e outras que estão prestes a serem lançadas comercialmente (Eid et al., 2009), têm dado novas perspectivas para o mapeamento genômico. A capacidade extremamente elevada de geração de dados de sequenciamento, em menos tempo, menor infra-estrutura, menos mão-de-obra e a custos baixíssimos (de centenas de milhões de dólares a menos de mil dólares), abre novas perspectivas cujos limites ainda estão por ser definidos. Nesse contexto, os mapas RH serão necessários para auxiliar no processo de montagem do genoma, provendo pontos de referência para longas distâncias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCB - Associação Brasileira de Criadores de Búfalos.** Carne. Disponível em: <<http://www.bufalo.com.br/>> Acesso em: 16/10/2007.
- AGARWALA, R.; APPLGATE, D.L.; MAGLOTT, D. et al. A fast and scalable radiation hybrid map construction and integration strategy. **Genome Research**, v. 10, p. 350-364, 2000.
- AMARAL, M.E.; OWENS, K.E.; ELLIOTT, J.S. et al. Construction of a river buffalo (*Bubalus bubalis*) whole-genome radiation hybrid panel and preliminary RH mapping of chromosomes 3 and 10. **Animal Genetics**, v. 38, p. 311-314, 2007.
- ARKDB.** ArkDB - Genomes for the rest of us. Disponível em: <<http://www.thearkdb.org/>> Acesso em: 22 de agosto de 2008.
- BOEHNKE, M.; LANGE, K.; COX, D.R. Statistical methods for multipoint radiation hybrid mapping. **American Journal of Human Genetics**, v. 6, p. 1174-1188, 1991.
- BORGHESE, A. Buffalo meat and meat industry. In: **Buffalo production and research:** FAO Regional Office for Europe, 2005. p.1-39 (REU Technical Series v. 67).
- BORGHESE A.; MAZZI, M. Buffalo population and strategies in the world. In: **Buffalo production and research:** FAO Regional Office for Europe, 2005. p.1-39 (REU Technical Series v.67).
- CHOWDHARY, B.P.; RAUDSEPP, T. Mapping genomes at the chromosome level. In: RUVINSKY, A.; GRAVES, J.A.M. **Mammalian Genomics**. Ed. CABI: Oxfordshire, 2005, 600p.
- Computational Genetics.** Radiation Hybrid Mapping Information Page. Disponível em: <<http://compgen.rutgers.edu/rhmap/>> Acesso em: 24/11/2008.
- COX, D.R. BURMEISTER, M.; PRICE, E.R. et al. Radiation Hybrid Mapping: A Somatic Cell Genetic Method for Constructing High-resolution Maps of Mammalian Chromosomes. **Science**, v. 250, p. 245-250, 1990.
- CPATU – EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL: **Rebanho Bubalino**. Disponível em: <<http://www.cpatu.embrapa.br/Bufalo/paginas/Rebanho%20bubalino.htm>> Acesso em: 16/10/2006.
- DE HONDT, H.A.; BOSMA, A.A.; DEN BIEMAN, M. et al. Gene mapping in river buffalo (*Bubalus bubalis* L.). **Genetics, Selection, Evolution. : GSE**, v. 1, p. 104s–108s, 1991.

- DI MEO, G.P.; PERUCATTI, A.; FLORIOT, S. et al. An extended river buffalo (*Bubalus bubalis*, $2n = 50$) cytogenetic map: assignment of 68 autosomal loci by FISH-mapping and R-banding and comparison with human chromosomes. **Chromosome Research : an International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology**, v. 16, n. 6, p.827-837, 2008.
- DROST, M. Advanced reproductive technology in the water buffalo. **Theriogenology**. v. 3, p. 450-453, 2007.
- EL NAHAS, S.M.; DE HONDT, A.; OTHMAN, O.S. et al. Assignment of genes to chromosome 4 of the river buffalo with a panel of buffalo-hamster hybrid cells. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 110, p. 182–185, 1993.
- EL NAHAS, S.M.; ORABY, H.A., DE HONDT, H.A. et al. Synteny mapping in river buffalo. **Mammalian Genome**, v. 7, p. 831-834, 1996.
- EL NAHAS, S.M.; DE HONDT, H.A.; WOMACK, J.E. Current status of the river buffalo (*Bubalus bubalis* L.) gene map. **The Journal of Heredity**, v. 92, n. 3, p. 221-225, 2001.
- EVERTS-VAN DER WIND, A.; LARKIN, D.M.; GREEN, C.A. et al. A high-resolution whole-genome cattle-human comparative map reveals details of mammalian chromosome evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 51, p. 18526-18531, 2005.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION), FAOSTAT - **Agriculture data**. Disponível em: <<http://apps.fao.org/cgi-gin/nph-db.pl?subset=agriculture/>>. Acesso em: 05/10/2006.
- FAO – DAD-IS. **Domestic animals diversity information system**. Disponível em: <<http://dad.fao.org/>> Acesso em: 05/06/ 2007.
- GOLDAMMER, T.; WEIKARD, R.; MIZIARA, M.N. et al. A radiation hybrid map of river buffalo (*Bubalus bubalis*) chromosome 7 and comparative mapping to the cattle and human genomes. **Cytogenetic Genome Research**, v. 119, n. 3-4, 2007.
- GOSS, S.J.; HARRIS, H. New method for mapping genes in human chromosomes. **Nature**, v. 255, p. 680-684, 1975.
- GRISART, B.; FRÉDÉRIC, F.; KARIM, L. et al. Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 8; p. 2398–2403, 2004.
- HUDSON, T.J.; MCKUSICK, K.B.; AGGARWAL, A. et al. An STS-based map of the human genome. **Science**, v. 270, p. 1945-1954, 1995.

- IANELLA, P.; VENANCIO, L.P.; STAFUZZA, N.B. et al. First radiation hybrid map of the river buffalo X chromosome (BBUX) and comparison with BTAX. **Animal Genetics**, v. 39, n. 2, p. 196-200, 2008.
- IANNUZZI, L. Standard karyotype of the river buffalo (*Bubalus Bubalis* L., 2n=50). **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 67, p. 102-113. 1994.
- IANNUZZI, L.; DI MEO, G.P.; PERUCATTI, A. et al. Eight molecular markers from Bovine syntenic groups U2, U5, U24, U14, U12, U28, X and Y were fluorescence in situ mapped to eight river buffalo chromosomes. **Chromosome Research**, v. 6, p. 656-659, 1998.
- IANNUZZI, L. DI MEO, G.P.; PERUCATTI, A. et al. The river buffalo (*Bubalus bubalis*, 2n = 50) cytogenetic map: assignment of 64 loci by fluorescence *in situ* hybridization and R-banding. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 102, p. 65-75, 2003.
- IBGE - Censo Agropecuário 1995/96 Disponível em <ftp://ftp.ibge.gov.br/Censos/Censo_Agropecuario_2006/> Acesso em: 22/08/2008.
- INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE. **Gene Selection**. Disponível em: <<http://dga.jouy.inra.fr/cgi-bin/lgbc/gene.operl?BASE=cattle>> Acesso em: 25/03/2007.
- INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE. **Bovmap database**. Disponível em: <<http://locus.jouy.inra.fr/cgi-bin/bovmap/intro2.pl>>. Acesso em: 22/08/2008.
- JORGE, A.M.; FONTES, C.A.A.; SOARES, J.E. et al. Características quantitativas da carcaça de bovinos e bubalinos, abatidos em diferentes estágios de maturidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, n. 5, p. 1039-1047, 1997(a).
- JORGE, A.M.; FONTES, C.A.A.; SOARES, J.E. et al. Ganho de peso e de carcaça, consumo e conversão alimentar de bovinos e bubalinos abatidos em dois estágios de maturidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, n. 4, p. 806-812, 1997(b).
- JORGE, A.M.; GOMES, M.I.F.V.; HALT, R.C. Effect of recombinant bovine somatotropin (bST) utilization on milk production from buffaloes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, 2002.
- KAMBADUR, R.; SHARMA, M.; SMITH, T.P.L. et al. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling belgian blue and piedmontese cattle. **Genome Research**, v. 7, p. 910-915, 1997.
- LANGE, K.; BOEHNKE, M.; COX, D.R. et al. Statistical methods for polyploid radiation hybrid mapping. **Genome Research**, v. 5, p. 136-150, 1995.

- LARKIN, D.M.; EVERTS-VAN DER WIND, A.; REBEIZ, M. et al. A cattle-human comparative map built with cattle BAC-ends and human genome sequence. **Genome Research**, v. 13, n. 8, p. 1966-1972, 2003.
- LI, G.H.; LIU, W.S.; TAKASUGA, A. et al. Characterization and RH mapping of bovine microsatellites generated from a microdissected BTA20-specific DNA library. **International Society for Animal Genetics, Animal Genetics**, v. 36, p. 146–151, 2005.
- LIU, Z.; WOMACK, J.E.; ANTONIOU, E. A high-resolution comparative RH map of the telomeric end of bovine chromosome 2 with human chromosomes 1 and 2. **Cytogenetic Genome Research**, v. 103 p. 89-93, 2003.
- MACEDO, M.P., WECHSLER, F.S.; RAMOS, A.A. et al. Chemical composition and production of milk from Mediterranean buffalo cows raised in western of São Paulo State, Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 3, 2001.
- MARQUES, J.R.F. **Búfalos: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa, 2000. 176p.
- MCPHERRON, A.C.; LAWLER, A.M.; LEE, S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. **Nature**, v. 387, p. 83–90. 1997.
- MIZIARA, M.N.; GOLDAMMER, T.; STAFUZZA, N.B. et al. A radiation hybrid map of river buffalo (*Bubalus bubalis*) chromosome 1 (BBU1). **Cytogenetic Genome Research**. v. 119, n. 1-2, 2007.
- MOREIRA, P.; COSTA, A.L.; VALENTIN, J.F. **Comportamento produtivo e reprodutivo de bubalinos mestiços Murrah-Mediterrâneo em pastagem cultivada em terra firme, no Estado do Acre**: EMBRAPA-CPAF, 1994. p. 19 (Boletim de Pesquisa, 13).
- MURPHY, W.J. ; SUN, S. ; CHEN, Z. et al. A radiation hybrid map of the cat genome: implications for comparative mapping. **Genome Research**, v. 10, p. 691-702, 2000.
- MURPHY, W.J.; STANYON, R.; O'BRIEN, S. Evolution of mammalian genome organization inferred from comparative gene mapping. **Genome Biology**, v. 2, n. 6, 2001.
- NATIONAL ANIMAL GENOME RESEARCH PROGRAM. **U.S. Cattle Genome Coordination Program**. Disponível em: <<http://www.animalgenome.org/cattle/>> Acesso em: 22/08/2008.
- NAVANI, N.; JAIN, P.K.; GUPTA. et al. A set of cattle microsatellite DNA markers for genome analysis of riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). **International Society for Animal Genetics**, v. 33, p. 149-154, 2002.
- NCBI. **NCBI Map Viewer**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9913> Acesso em: 22/08/2008.

- O'BRIEN, S. J.; EIZIRIK, E.; MURPHY, W. J. Genomics. On choosing mammalian genomes for sequencing. **Science**, v. 292, p. 2264-2266. 2001.
- OSWIN, P.B.M. Reproduction in water buffalo: comparative aspects and implications for management. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 54, p. 157-168, 1999.
- OTHMAN, O.E. Chromosome and gene mapping homology between river buffalo, cattle and sheep using molecular markers. **Biotechnology**, v. 3, p. 119-125, 2004.
- ROSS, S.R. Commentary: phenotypic screening of radiation hybrid panels. **Mammalian Genome**, v. 12, p. 879-881. 2001.
- RUTGERS UNIVERSITY. **Radiation Hybrid Mapping Information Page**. Disponível em: < <http://compgen.rutgers.edu/rhmap/>> Acesso em: 26/09/2008.
- SLONIM, D.; KRUGLYAK, L.; STEIN, L. et al. Building human genome maps with radiation hybrids. **Journal of Computational Biology : a Journal of Computational Molecular Cell Biology**, v. 4, p. 487-504, 1997.
- SONSTEGARD, T.S.; VAN TASSEL, C.P. Bovine genomics update: making a cow jump over the moon. **Genetic Research**, v. 84, p. 3-9, 2004.
- STAFUZZA, N.B.; IANELLA, P.; MIZIARA, M.N. et al. Preliminary radiation hybrid map for river buffalo chromosome 6 and comparison to bovine chromosome 3. **Animal Genetics**, v.38, p.406-409, 2007.
- STEWART E., K. MCKUSICK, A. AGGARWAL, E. et al. An STS-based radiation hybrid map of the human genome. **Genome Research**, v. 7 p. 422-433, 1997
- TEXAS A&M UNIVERSITY. **Community Annotation of the Bovine Genome**. Disponível em: < http://genomes.tamu.edu/bovine/annotation_information.html> Acesso em: 16/06/2008.
- THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH. **TIGR Cattle Gene Index**. Disponível em: <http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=cattle> Acesso em: 28/10/2006.
- VERRUMA, M.R.; SALGADO, J.M.. Chemical analysis of buffalo milk in relation to cow milk. **Scientia Agricola**, v. 51, n. 1, 1994.
- WOMACK, J.E. Mapping animal genomes. **Advances in Veterinary Medicine**, v. 40, p. 157-189, 2002.

Anexos

ANEXO A – Comparações das propriedades organolépticas do leite de búfala e de vaca.

Tabela A.1 - Composição química do leite

Parâmetros Determinados	Leites	
	Búfala	Vaca
Umidade (%)	83,00	88,00
Gordura (%)	8,16	3,68
Proteína (%)	4,50	3,70
Cinzas (%)	0,70	0,70
Extrato seco total (%)	17,00	12,00
Vitamina A (U.I.)	204,27	185,49
Calorias por 100ml	104,29	62,83

Fonte: Verruma e Salgado (1994)

Tabela A.2 - Composição mineral do leite

Minerais	Leites	
	Búfala	Vaca
Cálcio (%)	1,88	1,30
Fósforo (%)	0,90	0,90
Potássio (%)	0,90	0,90
Magnésio (%)	0,09	0,10
Ferro (ppm)	61	37
Manganês (ppm)	12	12
Zinco (ppm)	100	100

Fonte: Verruma e Salgado (1994)

Tabela A.3 - Conteúdo de aminoácidos essenciais nos leite

Aminoácidos	(g/g prot)	Leites	
		Búfala	Vaca
Lisina		10,30	8,22
Triptofano		1,11	1,48
Treonina		5,66	3,97
Cistina		0,42	0,91
Valina		8,40	5,29
Metionina		3,52	3,02
Isoleucina		7,36	4,50
Leucina		12,61	8,84
Tirosina		4,71	4,44
Fenilalanina		6,22	4,25

Fonte: Verruma e Salgado (1994)

ANEXO B – Sequência de comandos e parâmetros utilizados no programa Carthagene v1.0 para a construção do mapa preliminar do cromossomo bubalino 14.

O anexo B1 mostra o conjunto de dados gerados no formato necessário para análise com o programa Carthagene v1.0 (Schiex et al., 2005). Após carregar este grupo de dados no programa, utilizou-se o comando “nicemapl” e “nicemapd” para construir um mapa inicial, utilizando respectivamente os critérios de LOD-2-pontos e distâncias 2-pontos como guia para adicionar marcadores próximos com LOD elevado. No próximo passo, o mapa inicial foi refinado com a rotina “build”, a qual adiciona marcadores ao mapa de forma crescente, selecionando a posição de novos marcadores que produzam uma alternativa com o melhor valor de LOD.

Em seguida, o mapa foi aprimorado com o comando “annealing”, que utiliza o algoritmo de “anelamento simulado”, e o comando “greedy”, que utiliza parâmetros determinados pelo usuário (Anexo B.2) para especificar como se dará a busca (e quanto tempo da CPU será consumido). O mapa gerado foi então refinado com o comando “flips”, o qual testa a ordem dos marcadores no mapa comparando os valores de LOD com ou sem inversões de pares de marcadores. Para finalizar o mapa gerado, utilizou-se o comando “polish”, o qual testa sucessivamente a inserção de cada marcador em todos os intervalos possíveis e calcula o LOD total para cada combinação. A variação no log de verossimilhança é levada em consideração para cada marcador e para cada intervalo de destino. Com isso, foi construído o mapa estruturante (*framework*), com marcadores firmemente ordenados (ex: com alto LOD). Posteriormente, o comando “buildfw” com LOD mínimo padrão de 3,0, o qual utiliza um método de inserção crescente, foi utilizado para adicionar marcadores adicionais ao mapa *framework*.

ANEXO C – Conjunto de dados utilizados no programa MapChart[®] v.2.2 para desenhar o mapa preliminar do cromossomo bubalino BBU14 (E.1 - esquerda) e o homólogo bovino BTA13 (E.2 – direita). Estão listados ordenadamente os marcadores e suas respectivas distâncias em centiRays (BBU14) e Mpb (BTA13).

C.1 – BBU14

group 1

S612 0.0
 COMMD3 45.4
 SNRPB2 115.9
 IL2RA 146.0
 MJ53F20 271.5
 PLCB4 329.1
 CC470305 368.7
 CC578975 510.8
 POLR3F 544.4
 BZ948834 575.4
 BZ908049 689.6
 CRFG 751.4
 BS69 776.4
 PRNP 834.0
 CHGB 886.9
 IDH3B 951.3
 OXT 971.6
 DNAJC5 997.2
 THBD 1040.6
 GNAS_(5) 1100.2
 MAPRE1 1175.9
 TGM2 1212.3
 BPI 1255.3
 PTGIS 1285.2
 B4GALT5 1321.0
 YWHAB 1353.9
 NCOA5 1385.7
 TDE1 1421.4

C.2 – BTA13

group 1

CC470305 0.9
 SNRPB2 13.1
 IL2RA 16.8
 CC578975 29.6
 BZ948834 38.1
 POLR3F 39.3
 NET1 43.6
 PRNP 46.6
 BS69 46.9
 CRFG 47.4
 CHGB 48.5
 OXT 52.4
 IDH3B 52.8
 BZ908049 54.0
 DNAJC5 54.2
 GNAS_(5) 57.0
 MAPRE1 61.0
 LBP 64.8
 TGM2 65.0
 PROCR 65.9
 C20orf104 66.6
 ADA 73.7
 NCOA5 75.8
 YWHAB 76.7
 PTGIS 77.8
 B4GALT5 77.9

ANEXO D – Relação dos marcadores utilizados no mapa preliminar final, símbolo do Locus em bovinos, tipos, número de acesso no Genebank, primers Forward e Reverse e ID no UniSTS.

Símbolo do Locus	Símbolo do Locus em Bovinos	Tipo de Locus	Número Referência de acesso em bov.	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	ID UniSTS
B4GALT5	B4GALT5 (3)	EST	AW289182	AAGTGGCTTGATCTGGGTGT	GATGATGGTGATTTGGGCAGT	278092
BPI	LBP	mRNA	X52563	GTCAATCAGGAGGTGCAGGGTT	GCAGCCTTAGCCCTTGAAGAA	278643
BS69	BS70	EST	AW289201	GGAAATGTGCAACCGTGTCAAC	TGGTCCAGACGACGTAACCTGAGAA	278130
BZ908049	BZ908050	BES	BZ908049	GGTGGATGCTGTGGAGGCTCTG	AGGAATGCTTGGTGGAGGATATGG	476152
BZ948834	PCSK2	BES	BZ948834	TGAAGGCAGACAGGTAGACTTATG	CGTGGTGACTCGGCGGTTT	476133
CC470305	CC470306	BES	CC470305	CACTAGGCAGTTGTTAATCGTTGTC	CAGGAGTTAGTTTCCCATCTGCTATG	476097
CC578975	CC578976	BES	CC578975	CTGGCAACATCTTCTGGGCTGAC	ACAGATAAAGTCCCAAGGTCGTGAC	476124
CHGB	U88551	mRNA	U88551	TCCACCACCTTCACTGAAAGACC	CTATTAGACCAAGGGAAGCTGC	278199
COMMD3	COMMD4	EST	CO880508	GGGTTAAGAGGGAATTTCTGC	ACTGCTGCTCTCTTTTGGGA	N.A.
CRFG	CRFG	EST	AW356149	GGTGAAGAAGGCCAAGACAA	CCAGCTTTCCTCTTTCCCTGA	278241
DNAJC5	DNAJC6	mRNA	X92667	CTGACCTGTGGGGAGTGTGTTG	CTGGATGACGATCGGGCGTGT	278308
GNAS (5)	X03404	mRNA	X03404	TGCTTAAGAAGGGAACCTCCA	CTTGAGGGAAAGGAAGGTTCG	278486
IDH3B	IDH3B	EST	AW289392	AAGTCTTGGCAGGTGGCATAAC	CCAACTCACAAAGGACCATAACA	278553
IL2RA	IL2RA-2	Gene	U24226	GCTGATGTGGAGGTTCTTCGTATT	TCGGTGTGATGACTGAGGCCAAG	253716
MAPRE1	MAPRE2	EST	AW267043	AGTGCTACCAGCATCCACAAAAG	GTTTGAGTTAGGAGCGTTTACC	278719
MJ53F20	MJ53F21	EST	CO873348	TTCAGGCAATGACAAATCAGGA	ACACTCAGGGTGTCCAGCTT	N.A.
NCOA5	NCOA6	EST	AW267029	CCATGGGCAGAAGAGAGCAGAT	CTCCTACCCTGTTGCGTTCTAAG	278819
OXT	OXT-1	5' UTR	X58474	TCCACAGCACTTACCACCCCTAAC	CAGTTCAATTGGCATGGCTGGTC	253719
PLCB4	PLCB4	EST	NM_174424	GTGAAATTGGAAAGCCGAGAT	CACCAAAGCTCATTTACTTGTGA	266014
POLR3F	POLR3F	EST	AW267053	CCGTTTGGGTTTGAGGTAAGTA	GGACGCAGACTTGGAGCATGAG	278925
PRNP	PRNP-2	mRNA	NM_181015	CACTGGGGGAGCCGATAC	CACCTTGGTTGGGTAAACGGTACA	254000
PTGIS	PTGIS	mRNA	D30718	CAACTTCTGTGCCTGTGTTCA	ATTTICATAACGGTGGAGGAGC	278982
S612	S613	EST	CO887008	ACGTGGATAGAGGTGTCTGGTTCC	GTCGTAAACACCAATCCCTGGCTAC	N.A.
SNRPB2	AW462538	EST	AW462538	ACCAATGCGAATCCAGTATGCC	CAGTTGTTGCAGTCTGTTCCAC	279122
TDE1	TDE1	EST	CO886576	GGGTGCTTCTTCATCTCATTTC	AGCACGATGCAGTATGGCTCTCAT	N.A.
TGM2	TGM3	mRNA	X60686	GGGCCCCTTTGGAAATCGAATGTA	CAATCAGTTTGGTGGGTGGTCA	279187
THBD	THBD	mRNA	M14657	GCACCTTAGCTGGCGTCAGAAT	ATCCCTGCTCGCTTGTCTGATG	279189
YWHAB	YWHAB	EST	BE217556	GCAGCTGCTTAGGGACAATC	TCACAAAAGCACCGGTAGACAT	279413

**ANEXO E – Artigo científico publicado pelo Consórcio Internacional de Mapeamento
RH do Genoma Bubalino – CIMRHGB**

A first generation whole genome RH map of the river buffalo with comparison to domestic cattle

M Elisabete J Amaral*^{1,11}, Jason R Grant², Penny K Riggs³, Nedenia B Stafuzza¹, Edson A Rodrigues Filho¹, Tom Goldammer⁴, Rosemarie Weikard⁴, Ronald M Brunner⁴, Kelli J Kochan³, Anthony J Greco³, Jooha Jeong³, Zhipeng Cai⁵, Guohui Lin⁵, Aparna Prasad², Satish Kumar⁶, G Pardha Saradhi⁶, Bobby Mathew⁶, M Aravind Kumar⁶, Melissa N Miziara⁶, Paola Mariani⁷, Alexandre R Caetano^{8,9}, Stephan R Galvão^{8,9}, Madhu S Tantia¹⁰, Ramesh K Vijh¹⁰, Bina Mishra¹⁰, ST Bharani Kumar¹⁰, Vanderlei A Pelai¹, Andre M Santana¹, Larissa C Fornitano¹, Brittany C Jones¹¹, Humberto Tonhati¹², Stephen Moore², Paul Stothard² and James E Womack¹¹

Address: ¹Department of Biologia, UNESP – São Paulo State University, IBILCE, São Jose Rio Preto, SP, Brazil, ²Department of Agricultural, Food and Nutritional Science, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada, ³Department of Animal Science, Texas A&M University, College Station, TX, USA, ⁴Forschungsbereich Molekularbiologie, Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (IBN), Dummerstorf, Germany, ⁵Department of Computing Science, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada, ⁶Centre for Cellular and Molecular Biology, Hyderabad, India, ⁷Parco Tecnologico Padano, Via Einstein, Polo Universitario, Lodi, Italy, ⁸Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estacao Biologica, Brasilia, DF, Brazil, ⁹Programa de Pos Graduacao em Ciencias Animais, Universidade de Brasilia, Brasilia, DF, Brazil, ¹⁰National Bureau of Animal Genetic Resources, Karnal, India, ¹¹Department of Veterinary Pathobiology, Texas A&M University, College Station, TX, USA and ¹²Department of Animal Sciences, UNESP – São Paulo State University, FCAV, Jaboticabal, SP, Brazil

Email: M Elisabete J Amaral* - eamaral@cvm.tamu.edu; Jason R Grant - jason.grant@ualberta.ca; Penny K Riggs - riggs@tamu.edu; Nedenia B Stafuzza - nenediab@gmail.com; Edson A Rodrigues Filho - edinho_bio@yahoo.com.br; Tom Goldammer - tomgoldammer@fhn-dummerstorf.de; Rosemarie Weikard - weikard@fhn-dummerstorf.de; Ronald M Brunner - brunner@fhn-dummerstorf.de; Kelli J Kochan - kkochan@neo.tamu.edu; Anthony J Greco - ajgreco5@neo.tamu.edu; Jooha Jeong - joohajeong@gmail.com; Zhipeng Cai - zhipeng@cs.ualberta.ca; Guohui Lin - ghlin@cs.ualberta.ca; Aparna Prasad - aparnap@ualberta.ca; Satish Kumar - satishk@ccmb.res.in; G Pardha Saradhi - pardhu@ccmb.res.in; Bobby Mathew - bobyboby@gmail.com; M Aravind Kumar - vidyardhi@ccmb.res.in; Melissa N Miziara - melissanm@ccmb.res.in; Paola Mariani - paola.mariani@tecnoparco.org; Alexandre R Caetano - acaetano@cenargen.embrapa.br; Stephan R Galvão - stephanrgalvao@gmail.com; Madhu S Tantia - mstantia@yahoo.com; Ramesh K Vijh - rameshvijh@yahoo.com; Bina Mishra - binachauhanmishra@hotmail.com; ST Bharani Kumar - bharanikumarst@yahoo.com; Vanderlei A Pelai - vpelai@hotmail.com; Andre M Santana - andrevetms@gmail.com; Larissa C Fornitano - Larissa.fornitano@yahoo.com.br; Brittany C Jones - bjones@cvm.tamu.edu; Humberto Tonhati - tonhati@fcav.unesp.br; Stephen Moore - stephen.moore@afhe.ualberta.ca; Paul Stothard - stothard@ualberta.ca; James E Womack - jwomack@cvm.tamu.edu

* Corresponding author

Published: 24 December 2008

BMC Genomics 2008, 9:631 doi:10.1186/1471-2164-9-631

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/631>

© 2008 Amaral et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: The recently constructed river buffalo whole-genome radiation hybrid panel (BBURH₅₀₀₀) has already been used to generate preliminary radiation hybrid (RH) maps for several chromosomes, and buffalo-bovine comparative chromosome maps have been constructed. Here,

we present the first-generation whole genome RH map (WG-RH) of the river buffalo generated from cattle-derived markers. The RH maps aligned to bovine genome sequence assembly Btau_4.0, providing valuable comparative mapping information for both species.

Results: A total of 3990 markers were typed on the BBURH₅₀₀₀ panel, of which 3072 were cattle derived SNPs. The remaining 918 were classified as cattle sequence tagged site (STS), including coding genes, ESTs, and microsatellites. Average retention frequency per chromosome was 27.3% calculated with 3093 scorable markers distributed in 43 linkage groups covering all autosomes (24) and the X chromosomes at a LOD ≥ 8 . The estimated total length of the WG-RH map is 36,933 cR₅₀₀₀. Fewer than 15% of the markers (472) could not be placed within any linkage group at a LOD score ≥ 8 . Linkage group order for each chromosome was determined by incorporation of markers previously assigned by FISH and by alignment with the bovine genome sequence assembly (Btau_4.0).

Conclusion: We obtained radiation hybrid chromosome maps for the entire river buffalo genome based on cattle-derived markers. The alignments of our RH maps to the current bovine genome sequence assembly (Btau_4.0) indicate regions of possible rearrangements between the chromosomes of both species. The river buffalo represents an important agricultural species whose genetic improvement has lagged behind other species due to limited prior genomic characterization. We present the first-generation RH map which provides a more extensive resource for positional candidate cloning of genes associated with complex traits and also for large-scale physical mapping of the river buffalo genome.

Background

Among domestic animals, the water buffalo (*Bubalus bubalis*), particularly the river buffalo, holds great promise and potential for animal production. According to estimates by the "Food and Agriculture Organization of the United Nations" the global water buffalo population has increased 98% in the last decades, from 88 million in 1961 to 174 million in 2005. Buffalo is the most important farm animal species in Asia, especially India, where it is extensively used for milk, meat, fuel and fertilizer production (from manure), as well as for draught power [1]. Currently, river buffalo can be found in many countries worldwide. The growth of its population outside of the Asian continent is mainly related to the increasing interest in milk production used to produce cream, butter, yogurt and many cheeses. Brazil, for instance, is the largest buffalo breeding center outside the Asian continent holding the largest buffalo herd in the Americas.

River buffalo, along with domestic cattle, belongs to the subfamily Bovinae whereas sheep and goat belong to the subfamily Caprinae, all members of the family Bovidae. These species have been shown to be closely related, sharing homology in chromosome banding [2-5] and gene mapping [6-9], and have been cytogenetically characterized in detail.

Cattle (*Bos taurus*, BTA) and river buffalo (*Bubalus bubalis*, BBU) chromosomes can be matched arm for arm at the cytogenetic level [9-12]. While the cattle genome consists

of 29 acrocentric autosomes and a pair, X/Y, of sexual chromosomes, the river buffalo genome has 5 biarmed and 19 acrocentric autosomes plus the X and Y chromosomes [13]. All buffalo chromosomes arms have homology to single bovine acrocentric chromosomes. BBU1 appears to be a fusion of BTA1 and 27, BBU2 equals BTA2 and 23, BBU3 equals BTA8 and 19, BBU4 equals BTA5 and 28, and BBU5 equals BTA16 and 29 at the cytogenetic level with state of the art banding. All the other chromosomes have a one to one correspondence between the two species [9,14].

Although the latest cytogenetic map of the river buffalo genome reports 388 FISH-mapped loci [11], much remains to be done in order to generate high resolution maps of the buffalo genome.

The radiation hybrid (RH) mapping approach has been established as the method of choice to generate medium to high resolution maps. RH panels are available for several domestic mammalian species such as cow [15], pig [16], horse [17,18], dog [19] and cat [20]. The production of a RH panel in river buffalo is quite recent [21]. It has been used to construct preliminary RH maps for individual buffalo chromosomes, BBU1 [22]; BBU3 and 10 [21]; BBU7 [23]; BBU6 [24] and BBUX [25]. These preliminary maps, based on cattle-derived markers, demonstrated that the bovine genome is a useful source of markers for the buffalo genome mapping allowing rapid and efficient transfer of information from cattle to buffalo.

Taking advantage of the extensive resources and tools now available as a result of the bovine genome sequencing project, and given the close evolutionary relationship between cattle and river buffalo, the opportunity was available for study of the buffalo genome on a large scale to detect micro rearrangements in the marker order that might have taken place during the evolutionary divergence of these species. Of particular importance is the comparison of gene order between the two ruminant species, buffalo and cattle, and an assessment of rearrangements which is independent of previous, more limited comparisons done with specific markers of the two species by somatic hybrid cell analysis and FISH.

A high resolution genome map of buffalo will be an important tool for evaluating chromosomal evolution among species of Bovidae which, according to several phylogenetic studies, are separated by only a few million years [26-28]. It will therefore facilitate extrapolation of data from cattle genomics and at some point aid in the development of additional genomic tools for buffalo. Here, we report the use of the BBURH₅₀₀₀ panel to construct the first-generation whole genome radiation hybrid map (WG-RH) of the river buffalo containing more than 2500 cattle-derived loci covering all autosomes and the X chromosome.

Results and discussion

In this report, we present the first-generation whole genome radiation hybrid map of the river buffalo (BBU WG-RH). From the total of 3093 markers used to assemble the maps, 472 could not be placed on the maps, so 2621 are included on the RH maps of 24 autosomes and the X chromosome.

This is the first genome-wide RH map of the river buffalo and establishes a base genomic map from which higher resolution maps can be generated in the future. This first generation map also provides a characterization of the BBURH₅₀₀₀ panel allowing estimation of its potential limit of resolution. The BBU WG-RH map spans a total of 36,933 cR. However, accurate physical distances are not available for the genome lengths spanned by this WG-RH map. Because karyotype analysis indicates extensive similarity at the level of chromosome arms between buffalo and cattle, and presuming a genome size of 3000 Mbp in both species, we extrapolate the physical distance of the buffalo genome to be approximately 2623 Mbp, providing an estimate of 73.6 kb/cR₅₀₀₀. The BBURH₅₀₀₀ panel clones retained buffalo DNA with an average retention rate of 27.3% and 73.6 kb/cR₅₀₀₀. A summary of the river buffalo WG-RH map statistics is shown in Additional file 1.

Markers were distributed into linkage groups based on two-point LOD score threshold of ≥ 8 to assign linkage to a particular group of markers and not to others located on different chromosomes. A total of 43 linkage groups were generated for the whole genome. The number of markers mapped to each chromosome varied from 49 (BBU22) to 233 (BBU2). The RH maps from the bi-armed chromosomes presented at least two linkage groups (one for each arm) with the exception of BBU 5, in which markers were distributed into a single linkage group. Among the acrocentric chromosomes, the number of linkage groups ranged from 1-5 with BBU8 containing the greatest number of linkage groups (5), but also had the fewest mapped cattle-derived STS markers (2). Considering that the markers mapped on BBU8 are almost entirely derived from cattle SNPs, the increased number of linkage groups observed might be related to the irregular distribution of the SNPs on the bovine chromosome 4, which is known to be homologous to BBU8. The number of linkage groups and the total number of markers per chromosome is also presented in Additional file 1.

The average retention frequency (RF) for the data set is 27.3%, with the frequency for individual autosomes varying from 18.9% on BBU9 to 37.2% on BBU3, which contains the selectable marker thymidine kinase (Additional file 1). The average retention frequency per chromosome observed on the BBURH panel is similar to the estimates reported for other 5000 rad panels such as those constructed for cattle [15], horse [29] and dog [30]. The relatively low RF for BBUX (15.6%) was expected, since the buffalo parental cell line was created from a male animal. The variation in retention frequency for each chromosome is shown graphically in figure 1.

Preliminary RH maps for individual BBU chromosomes (BBU1, 3, 6, 7, 10 and X) have been previously published [21-25]. The new maps presented herein demonstrate a considerable increase in the number of mapped markers resulting in maps with greatly improved coverage over the previously published data. In addition to 19 chromosome maps published for the first time, the remaining six chromosomes are presented with the following number of additional markers: BBU1 (+133), BBU3 (+141), BBU6 (+114), BBU7 (+84), BBU10 (+74) and BBUX (+31). An example is shown in figure 2 with BBU6 illustrating the improvement regarding the marker density obtained with the new RH map. In general, the order of the markers between the new and the previous RH maps shows a high level of agreement except for minor flips involving closely linked loci.

To date, this is the first whole genome RH and comparative map produced for the river buffalo. Also, this is the first report illustrating the extensive use of cross-species

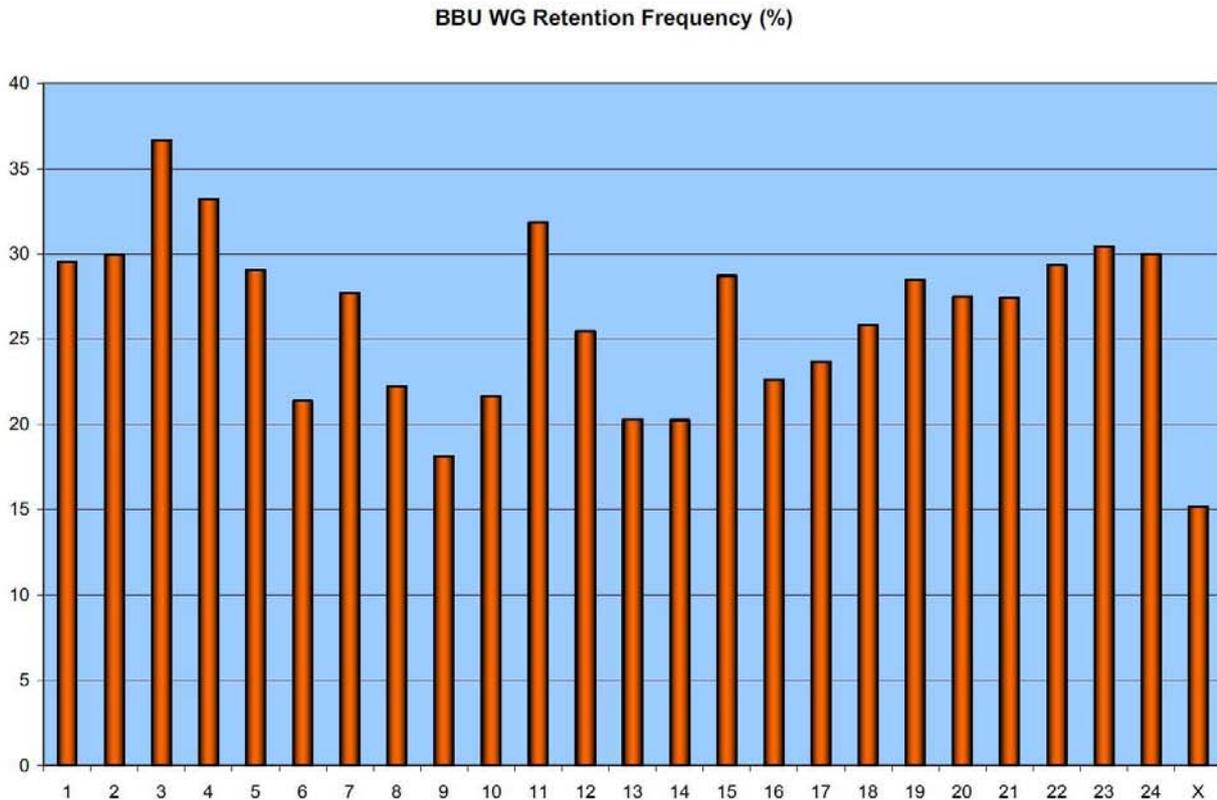


Figure 1
BBU WG retention frequency per chromosome. Marker retention frequency across the entire river buffalo genome.

oligo assays to produce RH maps, a technique which contributed significantly to the total number of markers placed on the maps. In addition, this BBU WG-RH map, containing 2621 markers, is the most dense among the first-generation RH maps produced for other domestic species, such as pig (757 markers) [31], cattle (1087 markers) [32], horse (730 markers) [29], cat (600 markers) [33] and dog (400 markers) [30]. In addition, this map was assembled with fewer RH linkage groups (43) than previously-reported for first-generation RH maps in cattle (61) [32], pig (128) [31] and horse (101) [29].

Because traditional genetic maps are not currently available for river buffalo, we compared the order of the markers from the BBU-WG RH maps to the current bovine genome sequence assembly (NCBI Btau_4.0). Figure 3 shows a schematic overview of the WG-RH map in comparison with their respective homologous chromosome in BTA. To be able to extrapolate the information between the genomes it is necessary to align conserved segments accurately between species. Mapping a large number of

markers on the buffalo genome and cross-referencing these with the map locations for the markers in the bovine achieved this alignment.

Sixty-eight markers previously assigned by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) [11] were incorporated into the RH maps serving as anchor markers for the RH maps to correctly orient the linkage groups. All chromosomes, except BBU15, had at least one marker previously mapped by FISH represented on the respective RH map. Figure 4 shows in detail the comparative mapping between the BBU1 RH map, the latest G-banded ideogram of the river buffalo chromosome [11] and the alignment with the bovine genome sequence assembly (Btau_4.0). Considering the large number of mapped markers, only one marker per 50 cR is presented in the RH map figure for better illustration. The individual BBU RH comparative maps from the entire buffalo genome are displayed in additional file 2. Also, a complete version of the RH maps containing all the mapped markers can be viewed at the National Center for Biological (NCBI) river buffalo

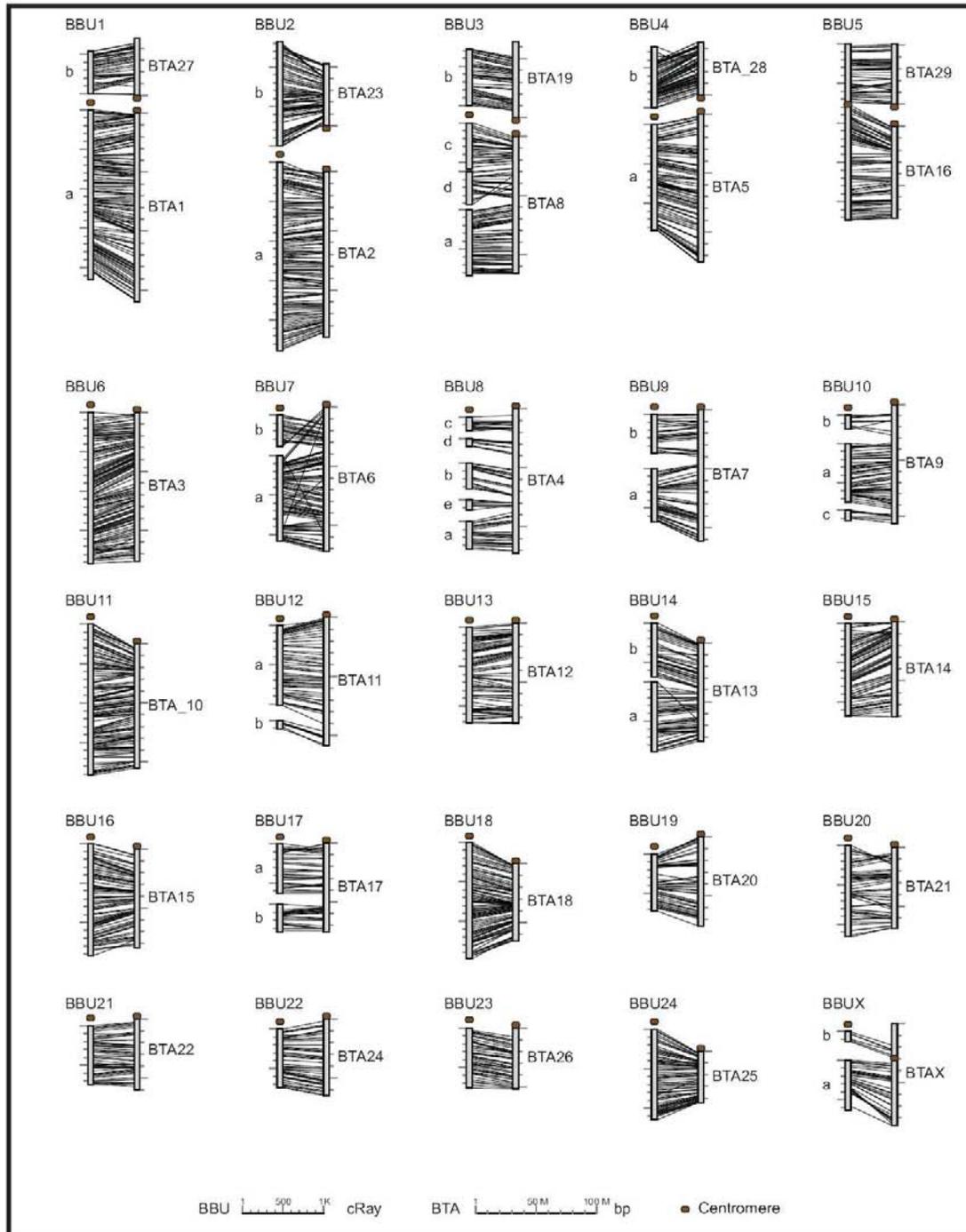


Figure 3
Overview of the WG-RH map in comparison with their respective homologous chromosome in BTA. For each comparison the buffalo chromosome is on the left and the homologous bovine chromosome is on the right. If a buffalo chromosome is represented by more than one linkage group, they are labeled alphabetically, with 'a' being the largest linkage group. Lines between the maps connect markers common in both maps. Distances on the buffalo chromosomes are scaled in cR and always start at the top of the map except for linkage group 'b' in maps BBU1-4, which start at the bottom. Distances on the bovine chromosome are scaled in bp and always start at the centromere.

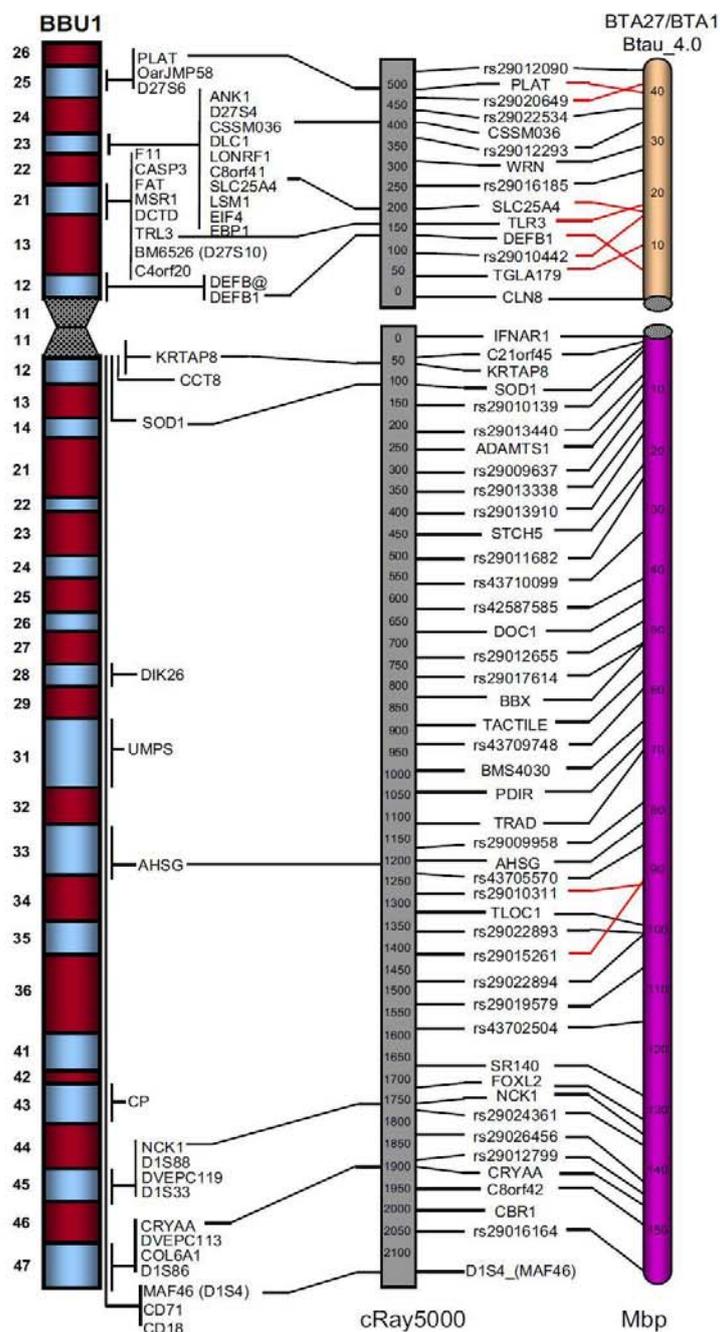


Figure 4
Comparison of the BBUI RH map, the latest cytogenetic map and the alignment with the BTA1 and BTA27 sequence assembly (Btau_4.0). The BBUI RH map is shown in the centre, the G-banded ideogram on the left and the corresponding cattle chromosomes on the right. The distances in cR5000 and Mbp are shown below each corresponding map. Considering the large number of mapped markers, only one marker per 50 cR is shown in the RH map. The BTA1 and BTA27 sequence maps shows one marker every 10 Mbp. Markers common to both BBU RH and the cattle sequence are joined by a solid black line or a solid red line. Solid red lines indicate markers which are oriented sequentially regarding the cattle but inverted. A solid black line also joins those markers on the BBU RH map that have been physically mapped by FISH to their location on the ideogram (Di Meo et al. 2008).

genome page <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/buffalo>.

The comparison revealed few disagreements between the BBU RH maps, the cytogenetic map and the bovine sequence assembly. Marker order within the linkage groups for the buffalo chromosomes was consistent with the bovine genome assembly and, where information was available, in agreement with the cytogenetic assignment. As indicated on Figure 4, few discrepancies on the markers order were observed. Interestingly, most of the disagreements observed with the bovine sequence assembly, for example, those observed on BBU4, BBU5 and BBU12, involved markers derived from cattle SNPs. An exception was observed on the BBU7 RH map, which showed disagreements on the position of five genes, *KLHL8*, *TRAM1L1* and *UGDH* from LG7a and, *GPR103* and *TKL2* from LG7b. These discrepancies in marker order within conserved segments might indicate small chromosome rearrangements, but could also be due to the insufficient resolution of the RH map in specific regions of the chromosomes or mistakes in the bovine sequence assembly. The number of observed disagreements in marker order positions among our RH maps and the bovine sequence and the river buffalo cytogenetic assignment may contribute to improved maps for buffalo as well as maps for other members of the Bovidae family.

Considering the limited genomic resources available for the river buffalo, the comparative mapping information presented here can be used to identify chromosomal regions potentially associate with traits that have been genetically mapped in other livestock. With the availability of the bovine genome sequence assembly it was possible to align the buffalo RH maps with the bovine genome and to obtain a large amount of information on the markers likely to also be found at a particular chromosomal location in buffalo.

Conclusion

We have built the first-generation radiation hybrid map of the river buffalo (*Bubalus bubalis*) genome using the BBU₅₀₀₀ panel and cattle-derived markers. Considering that genetic maps are absent for river buffalo, our goal was to provide a resource for positional candidate cloning of genes associate with complex traits and also for large-scale physical mapping of the river buffalo genome. The comparison with the bovine sequence assembly provides information sufficient for genome-wide scans to detect chromosomal regions contributing to economically important traits in river buffalo.

Methods

Selection of the markers

In order to link the BBU WG-RH map to the bovine genome sequence, only cattle-derived markers were used. Markers were selected from published cattle linkage and RH maps based on their location on cattle chromosomes homologous to buffalo chromosomes. A total of 3990 markers were typed on the BBU₅₀₀₀ panel, of which 3072 were cattle-derived SNP (Single Nucleotide Polymorphism), originated from Oligo pooled assays (OPA) synthesized and assembled by Illumina Inc. (San Diego, CA). These SNPs were a subset of previously characterized bovine SNPs [34] and were selected to be evenly distributed along the bovine genome (Btau_2.0).

The remaining 918 markers, classified as cattle "sequence tagged site" (STS), included bovine coding genes, ESTs (expressed sequence tags) and microsatellites. All markers used and their information details are available at the National Center for Biological (NCBI) Information database (ProbeDB) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/reports/probereport.cgi> Additional file 3 contains the identification numbers of the markers displayed on the database.

RH Vectors

RH vectors were produced by one of three different detection methods: conventional gel-based scoring, PCR dissociation curve analysis, or Illumina SNP analysis (detailed below).

The Illumina SNP-based RH vectors were generated by computer calling and by manual calling. RH vectors of markers derived from cattle STS were mostly generated using agarose gel analysis, except markers from BBU2 and BBU20, which were genotyped using dissociation curve analysis.

RH panel genotyping based on agarose gels

DNA obtained from each RH cell line was diluted to a concentration of 25 ng/ul. The markers were typed on DNA from the 90 radiation hybrid lines together with control bovine and hamster DNA by PCR in 96-well microtiter plates. Each PCR reaction was performed in 10- μ l reaction mixtures containing 50 ng of DNA; 1.5 mM MgCl₂; 10 mM Tris-HCl; 50 mM KCl; 0.2 mM dGTP, dTTP, dATP and dCTP; 10 pmol each forward and reverse primer and 0.5 U of Taq DNA polymerase (AmpliTaQ Gold; PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The reactions were performed in 96-well PCR plates on thermal cyclers with thermal gradient software, where available. PCR conditions included 95°C for 10 min; 35 cycles of 95°C for 30 sec, 65°C for 30 sec and 72°C for 30 sec; with a final extension cycle of 72°C for 7 min. PCR products were visualized on 2% agarose gels in 1.0 \times TBE buffer

and stained with ethidium bromide. Each primer was typed twice on the RH panel to insure reproducibility. Strong amplification products were scored as (1), weak products as (2), and absence of amplification products was assigned as (0). Markers with discrepancies between the results from the first two runs were retyped a third time. Scores from each RH clone for each primer was entered into a Microsoft Excel spread sheet.

RH panel genotyping based on Dissociation Curve Analysis

Real-time PCR was performed in a 20 µl reaction containing 20 ng template DNA, 1X PowerSYBR® Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) and 300 nM primers [35]. Amplification was carried out in 96-well plates in either a 7900HT or a 7500 sequence detection system (Applied Biosystems) with the manufacturer's default thermal profile (50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes, and 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute) followed by a dissociation stage (95°C for 15 seconds, 60°C for 15 seconds, followed by a slow ramp to 95°C) The incubation at 50°C was not necessary, but the default profile was not changed. To test a semi-automated method, 10 µl reactions containing 10 ng template DNA were set up in 384-well format by a Precision 2000 Plus automated microplate pipetting system (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT) and amplified in a 7900HT sequence detection system with the same thermal profile as described above. Amplification and dissociation data were analyzed with SDS software v.2.2.2 (Applied Biosystems). Radiation hybrid clones were scored independently by two people for presence or absence of the peak representing the river buffalo product. The scores were compared and discrepancies that were not clerical errors were scored as questionable.

RH panel genotyping based on cattle SNP

DNA from the 90 cell lines of the BBURH₅₀₀₀ panel as well as hamster and bovine control DNA were typed using the Illumina BeadStation 500G genotyping system [36]. The presence or absence of SNP markers in the hybrids was determined using two methods: manual and computer scoring. Manual scoring was performed according to methods previously described [34]. Briefly, Illumina BeadStudio (Version 3) software was used to visualize all the hybrids and the controls for a single marker with a cartesian plot where the X- and Y-axis represent the intensities of the A and B allele, respectively. Hybrids form distinct clusters depending on the presence or absence of the marker and when compared to the positive and negative controls, this allows easy scoring. Although much faster than conventional scoring by PCR, this method can still take considerable time to perform for thousands of markers. We sought to automate this process through computer scoring. We created a Java program to analyze the intensities of the A and B alleles from the Illumina

data and compare them to the positive and negative controls. There were 864 and 2075 markers typed by manual and computer methods, respectively. Using markers that were in common to both methods (755 markers), the accuracy of computer scoring was determined. Compared to manual calls, computational scoring was 98.0% accurate at determining present calls and 98.8% accurate for absent calls.

Mapping of markers against the bovine sequence assembly

Genomic sequence coordinates for the SNP markers were determined by performing BLAST [37] comparisons of the SNP flanking sequences against the latest bovine genome assembly (Btau_4.0 - <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/bovine/>) [38], using an expect threshold of 1e-50. Positions of the STS markers on Btau_4.0 were obtained by performing *in-silico* PCR <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr> with primers designed for the STS markers.

RH data analysis

Of the 3093 markers that generated RH vectors, 2621 were assigned to 43 linkage groups of 5 markers or more based on two-point analysis using CarthaGene [39]. A minimum LOD score of 8 was used as evidence of linkage. RH linkage groups were assigned to chromosomes based on a comparison of the markers in each group with the position of the markers on Btau_4.0. The buffalo chromosome was then determined by knowing the respective homologous chromosome in BTA [11]. Where more than one linkage group was associated with a chromosome, the groups were named by size (a, b, c, etc.), with 'a' having the most markers. The marker order of each linkage group was determined as described previously [40]. Briefly, RH maps were constructed using the comparative mapping approach of the CarthaGene software package [39,41]. This approach takes advantage of the known marker order in a closely related completely sequenced organism. The reference order used in this analysis was the order of the SNP and STS markers in the latest bovine genome assembly (Btau_4.0). Markers with compatible retention patterns (double markers) were merged together. RH maps were first generated by converting the RH data into a "Traveling Salesman Problem" and solving using the Lin-Kernighan heuristic based commands: lkh, lkhn, lkh, and lkhd [42]. The greedy command was used on each RH linkage group which tries to improve the marker order using a taboo search algorithm. Each map was refined further by iteratively testing all marker permutations in a sliding window of size 7 (flips) and then testing the reliability of the map by displacing each marker in all possible intervals (polish). While maps were initially generated using the haploid equal retention model, all final map distances, except BBUX, were generated using the diploid

equal retention model. Final maps were drawn using CMap <http://gmod.org/cmap>.

Authors' contributions

MEJA and JEW coordinated the project, made the BBURH₅₀₀₀ panel, carried out genotyping, screened the RH panel, and drafted the manuscript. JRG, PS, ZC, AP and GL built the RH maps, performed map and sequence comparisons and helped draft the manuscript. PKR produced and analyzed RH scoring and helped draft the manuscript. NBS and EARF carried out genotyping and designed the comparative mapping figures. SM, TG, RW, RMB, KJK, AJG, JJ, SK, GPS, BM, MAK, MST, VAP, MNM, LCF, AMS, BCJ, HT, ARC, SRG, and PM carried out genotyping of RH panel. All authors read and approved the final manuscript.

Additional material

Additional file 1

BBURH₅₀₀₀ map statistics by chromosome. A table containing the summary of the river buffalo WG-RH map statistics.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-9-631-S1.doc>]

Additional file 2

Comparative maps from the buffalo genome (24 autosomes and the X chromosome), including the RH maps, the latest G-banded ideogram of the river buffalo chromosomes and the alignment with the bovine genome sequence assembly (Btau_4.0). The RH maps are shown in the centre, the G-banded ideogram on the left and the corresponding cattle chromosomes on the right. The distances in cR5000 and Mbp are shown below each corresponding map. For better illustration, the BBU RH maps of the autosomes shows one marker per 50 cR and the BTA sequence maps shows one marker every 10 Mbp. Markers common to both BBU RH and the cattle sequence are joined by a solid black line or a solid red line. Solid red lines indicate markers which are oriented sequentially regarding the cattle but inverted. A solid black line also joins those markers on the BBU RH map that have been physically mapped by FISH to their location on the ideogram (Di Meo et al. 2008).

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-9-631-S2.pdf>]

Additional file 3

Identification numbers of the markers displayed on NCBI/Probe database. In the file, first column is ProbeDB identification number, second column is submission's accession number, third column is submission's version and fourth column is markers tracking names.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-9-631-S3.pdf>]

Acknowledgements

Original construction of the BBURH panel was supported by grants from FAPESP-Brazil (02/10150-5) to M.E.J.A. and NSF-USA (OISE-0405743) to

J.E.W. CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, of the Ministry for Science and Technology of Brazil, has granted a scholarship (PDE-210280/2006-9) to MEJA; funds to ARC (Grant # 472359/07-0) and a fellowship to SRG. This work was funded in part by grants from: Department of Biotechnology, Government of India, New Delhi to SK and Alberta Livestock Industry Development Fund to PS. We thank Elaine Owens and Janice Elliott for reviewing the manuscript and Erin N. Gillenwaters for helping with the figures.

References

- Borghese AMM: **Buffalo population and strategies in the world.** In *Buffalo Production and Research* Edited by FAO ROFE. Rome: FAO, Regional Office for Europe; 2005:1-39.
- Ansari HA, Bosma AA, Broad TE, Bunch TD, Long SE, Maher DW, Pearce PD, Popescu CP: **Standard G-, Q-, and R-banded ideograms of the domestic sheep (*Ovis aries*): homology with cattle (*Bos taurus*).** Report of the committee for the standardization of the sheep karyotype. *Cytogenet Cell Genet* 1999, **85(3-4)**:317-324.
- Di Bernardino D, Iannuzzi L: **Chromosome banding homologies in Swamp and Murrah buffalo.** *The Journal of heredity* 1981, **72(3)**:183-188.
- Gallagher DS Jr, Womack JE: **Chromosome conservation in the Bovidae.** *The Journal of heredity* 1992, **83(4)**:287-298.
- Iannuzzi L, Di Meo GP, Perucatti A, Ferrara L: **The high resolution G- and R-banding pattern in chromosomes of river buffalo (*Bubalus bubalis* L.).** *Hereditas* 1990, **112(3)**:209-215.
- Di Meo GP, Perucatti A, Schibler L, Incarnato D, Ferrara L, Criubi EP, Iannuzzi L: **Thirteen type I loci from HSA4q, HSA6p, HSA7q and HSA12q were comparatively FISH-mapped in four river buffalo and sheep chromosomes.** *Cytogenet Cell Genet* 2000, **90(1-2)**:102-105.
- Di Meo GP, Perucatti A, Uboldi C, Roperto S, Incarnato D, Roperto F, Williams J, Eggen A, Ferretti L, Iannuzzi L: **Comparative mapping of the fragile histidine triad (FHIT) gene in cattle, river buffalo, sheep and goat by FISH and assignment to BTA22 by RH-mapping: a comparison with HSA3.** *Animal genetics* 2005, **36(4)**:363-364.
- Iannuzzi L, Di Meo GP, Perucatti A, Schibler L, Incarnato D, Ferrara L, Bardaro T, Criubi EP: **Sixteen type I loci from six human chromosomes were comparatively fluorescence in-situ mapped to river buffalo (*Bubalus bubalis*) and sheep (*Ovis aries*) chromosomes.** *Chromosome Res* 2000, **8(5)**:447-450.
- Iannuzzi L, Di Meo GP, Perucatti A, Schibler L, Incarnato D, Gallagher D, Eggen A, Ferretti L, Criubi EP, Womack J: **The river buffalo (*Bubalus bubalis*, 2n = 50) cytogenetic map: assignment of 64 loci by fluorescence in situ hybridization and R-banding.** *Cytogenetic and genome research* 2003, **102(1-4)**:65-75.
- Chowdhary BP, Fronicke L, Gustavsson I, Scherthan H: **Comparative analysis of the cattle and human genomes: detection of ZOO-FISH and gene mapping-based chromosomal homologies.** *Mamm Genome* 1996, **7(4)**:297-302.
- Di Meo GP, Perucatti A, Floriot S, Hayes H, Schibler L, Incarnato D, Di Bernardino D, Williams J, Criubi E, Eggen A, et al.: **An extended river buffalo (*Bubalus bubalis*, 2n = 50) cytogenetic map: assignment of 68 autosomal loci by FISH-mapping and R-banding and comparison with human chromosomes.** *Chromosome Res* 2008, **16(6)**:827-837.
- Iannuzzi L, Di Meo GP, Perucatti A, Bardaro T: **ZOO-FISH and R-banding reveal extensive conservation of human chromosome regions in euchromatic regions of river buffalo chromosomes.** *Cytogenetics and cell genetics* 1998, **82(3-4)**:210-214.
- Iannuzzi L: **Standard karyotype of the river buffalo (*Bubalus bubalis* L., 2n = 50). Report of the committee for the standardization of banded karyotypes of the river buffalo.** *Cytogenetics and cell genetics* 1994, **67(2)**:102-113.
- El Nahas SM, de Hondt HA, Womack JE: **Current status of the river buffalo (*Bubalus bubalis* L.) gene map.** *The Journal of heredity* 2001, **92(3)**:221-225.
- Womack JE, Johnson JS, Owens EK, Rexroad CE 3rd, Schlafper J, Yang YP: **A whole-genome radiation hybrid panel for bovine gene mapping.** *Mamm Genome* 1997, **8(11)**:854-856.
- Yerle M, Pinton P, Robic A, Alfonso A, Palvadeau Y, Delcros C, Hawken R, Alexander L, Beattie C, Schook L, et al.: **Construction of**

- a whole-genome radiation hybrid panel for high-resolution gene mapping in pigs. *Cytogenet Cell Genet* 1998, **82**(3-4):182-188.
17. Chowdhary BP, Raudsepp T, Honeycutt D, Owens EK, Piumi F, Guerin G, Matise TC, Kata SR, Womack JE, Skow LC: **Construction of a 5000(rad) whole-genome radiation hybrid panel in the horse and generation of a comprehensive and comparative map for ECA11.** *Mamm Genome* 2002, **13**(2):89-94.
 18. Kiguwa SL, Hextall P, Smith AL, Critcher R, Swinburne J, Millon L, Binns MM, Goodfellow PN, McCarthy LC, Farr CJ, et al.: **A horse whole-genome-radiation hybrid panel: chromosome 1 and 10 preliminary maps.** *Mamm Genome* 2000, **11**(9):803-805.
 19. Vignaux F, Hitte C, Priat C, Chuat JC, Andre C, Galibert F: **Construction and optimization of a dog whole-genome radiation hybrid panel.** *Mamm Genome* 1999, **10**(9):888-894.
 20. Murphy WJ, Menotti-Raymond M, Lyons LA, Thompson MA, O'Brien SJ: **Development of a feline whole genome radiation hybrid panel and comparative mapping of human chromosome 12 and 22 loci.** *Genomics* 1999, **57**(1):1-8.
 21. Amaral ME, Owens KE, Elliott JS, Fickey C, Schaffer AA, Agarwala R, Womack JE: **Construction of a river buffalo (*Bubalus bubalis*) whole-genome radiation hybrid panel and preliminary RH mapping of chromosomes 3 and 10.** *Animal genetics* 2007, **38**(3):311-314.
 22. Miziara MN, Goldammer T, Stafuzza NB, Ianella P, Agarwala R, Schaffer AA, Elliott JS, Riggs PK, Womack JE, Amaral ME: **A radiation hybrid map of river buffalo (*Bubalus bubalis*) chromosome 1 (BBU1).** *Cytogenetic and genome research* 2007, **119**(1-2):100-104.
 23. Goldammer T, Weikard R, Miziara MN, Brunner RM, Agarwala R, Schaffer AA, Womack JE, Amaral ME: **A radiation hybrid map of river buffalo (*Bubalus bubalis*) chromosome 7 and comparative mapping to the cattle and human genomes.** *Cytogenetic and genome research* 2007, **119**(3-4):235-241.
 24. Stafuzza NB, Ianella P, Miziara MN, Agarwala R, Schaffer AA, Riggs PK, Womack JE, Amaral ME: **Preliminary radiation hybrid map for river buffalo chromosome 6 and comparison to bovine chromosome 3.** *Animal genetics* 2007, **38**(4):406-409.
 25. Ianella P, Venancio LP, Stafuzza NB, Miziara MN, Agarwala R, Schaffer AA, Riggs PK, Womack JE, Amaral ME: **First radiation hybrid map of the river buffalo X chromosome (BBUX) and comparison with BTAX.** *Animal genetics* 2008, **39**(2):196-200.
 26. Ritz LR, Glowatzki-Mullis ML, MacHugh DE, Gaillard C: **Phylogenetic analysis of the tribe Bovini using microsatellites.** *Animal genetics* 2000, **31**(3):178-185.
 27. Parma P, Erra-Pujada M, Feligini M, Greppi G, Enne G: **Water buffalo (*Bubalus bubalis*): complete nucleotide mitochondrial genome sequence.** *DNA Seq* 2004, **15**(5-6):369-373.
 28. Mao Y, Chang H, Yang Z, Zhang L, Xu M, Chang G, Sun W, Song G, Ji D: **The analysis of genetic diversity and differentiation of six Chinese cattle populations using microsatellite markers.** *J Genet Genomics* 2008, **35**(1):25-32.
 29. Chowdhary BP, Raudsepp T, Kata SR, Goh G, Millon LV, Allan V, Piumi F, Guerin G, Swinburne J, Binns M, et al.: **The first-generation whole-genome radiation hybrid map in the horse identifies conserved segments in human and mouse genomes.** *Genome research* 2003, **13**(4):742-751.
 30. Priat C, Hitte C, Vignaux F, Renier C, Jiang Z, Jouquand S, Cheron A, Andre C, Galibert F: **A whole-genome radiation hybrid map of the dog genome.** *Genomics* 1998, **54**(3):361-378.
 31. Hawken RJ, Murtaugh J, Flickinger GH, Yerle M, Robic A, Milan D, Gellin J, Beattie CW, Schook LB, Alexander LJ: **A first-generation porcine whole-genome radiation hybrid map.** *Mamm Genome* 1999, **10**(8):824-830.
 32. Band MR, Larson JH, Rebeiz M, Green CA, Heyen DW, Donovan J, Windish R, Steining C, Mahyuddin P, Womack JE, et al.: **An ordered comparative map of the cattle and human genomes.** *Genome research* 2000, **10**(9):1359-1368.
 33. Murphy WJ, Sun S, Chen Z, Yuhki N, Hirschmann D, Menotti-Raymond M, O'Brien SJ: **A radiation hybrid map of the cat genome: implications for comparative mapping.** *Genome research* 2000, **10**(5):691-702.
 34. McKay SD, Schnabel RD, Murdoch BM, Aerts J, Gill CA, Gao C, Li C, Matukumalli LK, Stothard P, Wang Z, et al.: **Construction of bovine whole-genome radiation hybrid and linkage maps using high-throughput genotyping.** *Animal genetics* 2007, **38**(2):120-125.
 35. Kochan KJ, Amaral ME, Agarwala R, Schaffer AA, Riggs PK: **Application of Dissociation Curve Analysis to Radiation Hybrid Panel Marker Scoring: Generation of a Map of River Buffalo (*B. bubalis*) Chromosome 20.** *BMC genomics* 2008, **9**(1):544.
 36. Oliphant A, Barker DL, Stuelpnagel JR, Chee MS: **BeadArray technology: enabling an accurate, cost-effective approach to high-throughput genotyping.** *BioTechniques* 2002:56-58.
 37. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: **Basic local alignment search tool.** *Journal of molecular biology* 1990, **215**(3):403-410.
 38. **Bovine Genome Project** [<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/bovine/>]
 39. de Givry S, Bouchez M, Chabrier P, Milan D, Schiex T: **CARHTA GENE: multipopulation integrated genetic and radiation hybrid mapping.** *Bioinformatics (Oxford, England)* 2005, **21**(8):1703-1704.
 40. Prasad A, Schiex T, McKay S, Murdoch B, Wang Z, Womack JE, Stothard P, Moore SS: **High resolution radiation hybrid maps of bovine chromosomes 19 and 29: comparison with the bovine genome sequence assembly.** *BMC genomics* 2007, **8**:310.
 41. Faraut T, de Givry S, Chabrier P, Derrien T, Galibert F, Hitte C, Schiex T: **A comparative genome approach to marker ordering.** *Bioinformatics (Oxford, England)* 2007, **23**(2):e50-56.
 42. Helsingaun K: **An effective implementation of the Lin-Kernighan Traveling Salesman Heuristic.** *European Journal of Operational Research* 2000, **126**:106-130.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:

http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp

