



PATRÍCIA IANELLA

***“MAPEAMENTO RH COMPARATIVO DO
CROMOSSOMO X DE BÚFALO DE RIO
(*Bubalus bubalis*)”***

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Genética para
obtenção do Título de Doutor.

PATRÍCIA IANELLA

***“MAPEAMENTO RH COMPARATIVO DO
CROMOSSOMO X DE BÚFALO DE RIO
(*Bubalus bubalis*)”***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (Ibilce/Unesp) como requisito para obtenção do Título de Doutor.

Orientador: Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos

Co-Orientador: Profa. Dra. Mônica Regina Vendrame Amarante

Ianella, Patricia.

Mapeamento RH comparativo do cromossomo X de búfalo de rio (*Bubalus bubalis*) / Patricia Ianella. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2007.

63 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Claudia Regina Bonini-Domingos

Co-orientador: Mônica Regina Vendrame Amarante

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética Animal. 2. Mapeamento cromossômico. 3. Cromossomo X. 4. Búfalo de rio – Genética Molecular. I. Bonini-Domingos, Claudia Regina. II. Amarante, Mônica Regina Vendrame. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU - 575.116.4

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS – IBILCE/UNESP.

PATRÍCIA IANELLA

Tese apresentada em ____/____/____ como requisito para obtenção do título de
Doutor em Genética.

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

Prof. Dra. Rosângela Hatori Rocha

Prof. Dr. Reinaldo Otávio Alves Alvarenga Brito

Prof. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

Prof. Dra. Mary Massumi Itoyama

***Ao meu marido Alexandre e à nossa
esperada filhinha Sophia, com todo amor,
Dedico.***

**"Felicidade é ter o que fazer, ter o que amar, e o que esperar"
Aristóteles**

Agradeço

À todos que contribuíram direta ou indiretamente à realização deste trabalho com suporte científico, técnico, administrativo, ou mesmo um ombro amigo.

Aos colegas da Pós-Graduação por compartilhar ideais.

À Profa. Dra. M. Elisabete Amaral por criar as condições para realização deste trabalho.

À banca examinadora desta tese pela disponibilidade e atenção.

Ao corpo docente deste Instituto, no qual passei por quase toda a minha formação profissional, principalmente aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Genética; aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pela presteza na solução dos problemas.

À Profa. Dra. Claudia Bonini, por todo o suporte na etapa final do presente trabalho: suporte científico, moral e emocional.

À amiga Larissa Venâncio, pela ajuda prática na realização do trabalho, suporte com as burocracias quando eu não podia estar presente, e por sua amizade tão valiosa e verdadeira. Sem você tudo seria muito mais difícil amiga.

Aos amigos, pela amizade sincera.

À minha família. Principalmente aos meus pais Francisco e Thereza, exemplos de simplicidade, honestidade, caráter e amor. Obrigada por me ensinar que na vida, nem tudo é fácil e que devemos lutar pelos nossos sonhos ... mas que nada vale tanto a pena quanto uma consciência tranqüila.

Ao meu marido Alexandre, por todo apoio, conselhos, paciência e, sobretudo, amor.

À Deus por me capacitar a realizar este trabalho e me dar forças para lidar com as dificuldades.

"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas...

Que já têm a forma do nosso corpo...

E esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares...

É o tempo da travessia...

E se não ousarmos fazê-la...

Teremos ficado... para sempre...

À margem de nós mesmos..."

Fernando Pessoa

Tudo tem a sua ocasião própria, e há tempo para todo propósito
debaixo do céu.

Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo
de arrancar o que se plantou; Tempo de sentir saudade, e tempo de
esquecer; tempo de derrubar, e tempo de edificar; Tempo de chorar,
e tempo de rir; tempo de lamentar, e tempo de dançar; Tempo de
espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e
tempo de afastar-se; Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de
guardar, e tempo de jogar fora; Tempo de estar calado, e tempo de
falar; Tempo de amar, e tempo de sofrer; tempo de guerra, e tempo
de paz.

(Eclesiastes 3.1-8)

RESUMO



IANELLA, P. Mapeamento RH Comparativo do Cromossomo X de Búfalo de Rio (*Bubalus bubalis*). São José do Rio Preto, 2008. 63p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

O cromossomo X apresenta conteúdo conservado entre as diferentes espécies de mamíferos. No de búfalo de rio (*Bubalus bubalis*), espécie que vem ganhando interesse econômico no Brasil e no mundo, sua morfologia é acrocêntrica. No presente trabalho, apresentamos o primeiro mapa RH do cromossomo X bubalino gerado a partir do recentemente construído painel de células híbridas irradiadas búfalo-roedor (BBU_{RH5000}). Este mapa contém um total de 33 marcadores derivados de bovino, incluindo dez genes, quatro ESTs e 19 microssatélites. Estes marcadores estão distribuídos em dois grupos de ligação: LG1 com oito marcadores e abrangendo 125.6 cR, e o LG2 com 25 marcadores abrangendo 366.3 cR. As frequências de retenção (FR) dos marcadores variaram de 7,8% para o gene UREB1 a 28,9% para os microssatélites MAF45 e INRA30. O BBUX_{RH5000} foi comparado ao mapa de seqüência e mapa RH₃₀₀₀ do cromossomo X bovino evidenciando alguns poucos rearranjos entre as duas espécies, e alguns prováveis erros de mapeamento em uma das duas espécies quando comparado com BTAX build 3.1 bovino. A utilização de *primers* derivados de boi para mapeamento em búfalo foi realizada com êxito, e a distribuição dos marcadores ao longo do X considerada satisfatória, culminando em uma cobertura adequada para os primeiros esforços de mapeamento deste cromossomo. Análises comparativas do BBUX com o cromossomo X de outras espécies de mamíferos (humano, camundongo, ovelha, cavalo e cachorro) foram realizadas, revelando grande conservação de sintenia deste cromossomo na classe mamífera e, extensa conservação da ordem gênica entre búfalo e ovelha e búfalo e boi. O BBUX_{RH5000} aqui apresentado é um ponto de partida para a construção de mapas de alta resolução, necessários para caracterização de rearranjos que ocorreram durante a evolução e futuros estudos com o objetivo de dissecar características genéticas de interesse econômico.

Palavras-chave: búfalo de rio, BBUX, mapeamento RH

ABSTRACT



IANELLA, P. Comparative RH Mapping of River Buffalo X Chromosome (*Bubalus bubalis*). São José do Rio Preto, 2008. 63p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

The X chromosome shows conserved content among different mammalian species. In river buffalo (*Bubalus bubalis*), a brazilian and worldwide economic important specie, the X chromosome morphology is acrocentric. Here we report the first radiation hybrid map of the river buffalo X chromosome generated from a recently constructed river buffalo (*Bubalus bubalis*) whole-genome radiation hybrid panel (BBU_{RH5000}). This map contains a total of 33 cattle-derived markers, including ten genes, four ESTs and 19 microsatellites. The markers are distributed in two linkage groups: LG1 contains eight markers spanning 125.6 cR, and LG2 contains 25 markers spanning 366.3 cR. The retention frequency (RF) of individual markers across the panel ranged from 7.8% to the gene UREB1 and 28,9 to the microsatellites MAF45 and INRA30. The BBUXRH₅₀₀₀ was compared with the bovine sequence assembly (build 3.1) and RH₃₀₀₀ bovine X chromosome maps and showed few rearrangements between these species, and possible mapping errors in one of the two species when compared with BTAX build 3.1. The use of cattle-derived primers using carried out successfully and the markers distribution along the chromosome was satisfactory, resulting in adequate coverage for a first mapping effort of this chromosome. Comparative analysis between BBUX and X chromosome from other mammalian species (human, hamster, sheep, horse and dog) were carried out showed extensive synteny conservation of the X chromosome in the Mammalian Class, and gene order conservation between river buffalo and sheep and river buffalo and cattle. The BBUXRH₅₀₀₀ here presented is the start-pointing for the construction of high-resolution map, which is necessary for characterization of rearrangements occurring during evolution and futures studies in order to dissect economically important traits.

Key-words – river buffalo, BBUX, RH mapping

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
OBJETIVOS	23
MATERIAL E MÉTODOS	24
RESULTADOS	27
CAPÍTULO I: <i>Artigo publicado na Revista Animal Genetics</i>	28
CAPÍTULO II: <i>Análise Comparativa entre os Mapas do Cromossomos X de Búfalo de Rio e outras Espécies de Mamíferos</i>	33
DISCUSSÃO	36
CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXOS:	
ANEXO A: <i>Artigo publicado na Revista Animal Genetics</i>	55
ANEXO B: <i>Artigo publicado na Revista Cytogenetics and Genome Research</i>	59

INTRODUÇÃO



A espécie *Bubalus bubalis*, conhecida como búfalo de água é de origem asiática e teve sua domesticação iniciada neste mesmo continente, na Índia e na China, por volta de 5000 anos atrás (BERNARDES, 2007). Esta espécie é constituída de duas subespécies: a *B. bubalis* variedade *bubalis*, conhecida como búfalo de rio, e a variedade *kerabao*, conhecida como búfalo de pântano (MARQUES et al., 2003).

Segundo dados da FAO (*Food and Agricultural Organization* – 2008), em 2005 a população bubalina mundial já havia superado 172 milhões de cabeças. Aproximadamente 97% da população mundial encontra-se na Ásia, e metade deste rebanho asiático pertence à Índia (KUMAR et al., 2007). Nos países asiáticos, o búfalo ocupa uma posição de destaque na vida social, econômica e cultural (CNPC, 2008). O rebanho bubalino mundial desempenha um papel importante na produção de proteína de origem animal, especialmente em países de terceiro mundo, e possui uma taxa de crescimento anual estimada de 10%, o que reflete o crescente interesse mundial por esta espécie (SAMPAIO-NETO et al., 2001). A exploração econômica da bubalinocultura, anteriormente restrita basicamente ao continente asiático, vem sendo disseminada em todos os continentes.

A introdução dos bubalinos no Brasil ocorreu em 1985 na Ilha de Marajó, estado do Pará, com a vinda de 50 animais da raça Mediterrâneo, seguida de outras importações nas décadas seguintes (ALBUQUERQUE et al., 2006). No Brasil, estes animais encontraram condições ideais de pastagens, água e temperatura, tais que, aliadas à sua rusticidade e alta adaptabilidade, propiciaram à população brasileira de búfalo alcançar índices de crescimento de 1.806% entre os anos de 1961 e 2005 (CNPC, 2008). A espécie bubalina, desta maneira, surge como uma alternativa à

pecuária brasileira e mundial por apresentar grande versatilidade, podendo viver nas condições mais rudes de clima e vegetação.

Estima-se que a população bubalina brasileira ultrapasse três milhões de cabeças, constituindo o maior rebanho fora do continente asiático, chegando a ser maior do que o rebanho de toda a Europa (VALE; RIBEIRO, 2005), o que coloca o Brasil em posição privilegiada na bubalinocultura (BERNARDES, 2007). Cerca de 50% da população bubalina brasileira situa-se no Estado do Pará, onde foi originalmente introduzido (BARBOSA, 2005). No Brasil são reconhecidas quatro raças da espécie: Murrah, Jafarabadi e Mediterrâneo, que são pertencentes ao grupo búfalo de rio e, Carabao pertencente ao grupo búfalo de pântano (ALBUQUERQUE et al., 2006).

As características inerentes desta espécie como rusticidade, prolificidade, adaptabilidade, precocidade, docilidade, vida útil até os 15 anos - cinco anos a mais que os bovinos domésticos - (MOREIRA et al., 1994), aliadas à alta taxa de produtividade em leite, carne e trabalho, e taxas de natalidade superiores a 80% e de mortalidade inferiores a 3% ao ano são as responsáveis pelo grande crescimento populacional observado.

Segundo Borghese (2005) o búfalo de rio é conhecido por converter alimentos de baixo valor nutricional em leite e carne de alta qualidade. A carne bubalina quando comparada à bovina apresenta-se com 40% menos colesterol, doze vezes menos gordura, 55% menos calorias, 11% mais proteínas e 10% mais sais minerais, sendo, portanto, mais indicada para a saúde humana (CPATU – EMBRAPA, 2008). O leite de búfala apresenta uma composição química superior em relação ao leite de vaca, em 43% nos sólidos totais, 43% em gordura, 41% de proteína (caseína), 42% de cálcio e 42% de fósforo (CPATU - EMBRAPA, 2008) características que levaram

a um aumento na demanda de leite de búfala nas últimas décadas (SENO et al., 2007).

O crescente interesse na bubalinocultura no Brasil e no mundo, resultantes destas inúmeras características favoráveis à criação e qualidade de produtos derivados desta espécie, têm levado a um grande crescimento da população bubalina, fazendo com que esta espécie passe a representar um importante papel na economia agropecuária brasileira e mundial. Este novo perfil da bubalinocultura, a espelho de outras espécies de interesse zootécnico, só poderá alcançar seu potencial máximo com a implantação de programas de avaliação e melhoramento genético sistemáticos. Para tanto, a identificação e manipulação de genes de interesse econômico são desejáveis, e serão possibilitadas somente após a produção de conhecimentos básicos sobre o genoma desta espécie. A obtenção de mapas cromossômicos é um dos primeiros passos necessários para alcançar estes objetivos.

O búfalo de rio, assim como o boi, pertence à família Bovidae, que é a mais diversa das nove famílias de Artiodactyla (VAUGHAN, 1986). O número diplóide de cromossomos dentro desta família varia de 30 a 60 cromossomos, sendo o número de braços cromossômicos nos autossomos relativamente constante: de 56 a 58 na maioria dos cariótipos das espécies que compõem a família Bovidae. Segundo Wurster e Benirschke (1968) o cariótipo primitivo da família é de aproximadamente 58 autossomos acrocêntricos (condição observada em boi, cabras e outros bóvidos) e cromossomos sexuais também acrocêntricos.

O cariótipo de búfalo de rio (variedade *bubalis*) consiste em 24 pares de autossomos e um par de cromossomos sexuais, $2n=50$ (IANNUZZI, 1994) e a de búfalo de pântano (variedade *kerabau*) 23 pares de autossomos e um par sexual,

$2n=48$. As duas subespécies cruzam entre si formando híbridos com baixa fertilidade $2n=49$ (ROCHA, 1997; ALBUQUERQUE et al., 2006).

Em búfalo de rio ($2n = 50$), dos 24 pares de autossomos, os cinco primeiro pares são compostos por dois braços cromossômicos, de morfologia submetacêntrica ou metacêntrica, e os outros 19 pares possuem somente um braço, sendo acrocêntricos (IANNUZZI et al., 1994; ALZATE et al. 2006). Acredita-se que os cinco pares com dois braços cromossômicos de búfalo sejam resultantes de fusões cêntricas, (translocações Robertsonianas) entre os cromossomos acrocêntricos do genoma bovino ancestral. Tal indício explica o fato de que cada braço dos destes cromossomos de búfalo de rio apresenta alta similaridade com cromossomos acrocêntricos de bovino (EL NAHAS, 2001).

A íntima relação entre as duas espécies é extremamente útil na construção do mapa genômico comparativo de búfalo, uma vez que o genoma bovino tem sido intensamente estudado (WILLIAMS et al., 2002; IHARA et al., 2004; ITOH et al., 2005; LEE et al., 2006; SNELLING et al., 2007). Os cromossomos sexuais de búfalo também são acrocêntricos, uma condição primitiva dentro da família Bovidae, enquanto que os cromossomos sexuais bovinos apresentam-se na forma submetacêntrica que é a condição derivada (GALLAGHER et al., 1999).

O mapeamento genômico de espécies de interesse econômico vem progredindo rapidamente nas últimas décadas e, em espécies como porco (YERLE et al. 1998; 2002; CHEN et al., 2007), ovelha (BURKIN et al, 2003; ENG et al., 2004), cavalo (CAETANO et al., 1999a; 1999b; KIGUWA et al., 2000; CHOWDHARY et al., 2003; CHOWDHARY e RAUDSEPP, 2008) e boi (WOMACK et al., 1997; WILLIAMS et al., 2002; ITOH et al., 2005; SNELLING et al. 2007) encontra-se altamente avançado.

A criação de mapas genéticos é um trabalho importante para gerar ferramentas básicas e essenciais para a identificação de genes que afetam características de interesse econômico. Inúmeros exemplos podem ser encontrados na literatura de trabalhos onde foram identificados genes de interesse zootécnico, que causam doenças genéticas (SHAY et al., 2001; KREBS et al., 2006), e que afetam características quantitativas (CASAS et al., 2000; 2004; WALLING et al., 2004; GAUTIER et al., 2006; GUTIÉRREZ-GIL et al., 2008) e qualitativas (HAYES; PETIT, 1993; IANNUZZI et al., 1997; 2003; CALVO et al., 2006; NAKATA et al., 2006a; 2006b; PERUCATTI et al., 2006). A criação de mapas genômicos para diferentes espécies também permite, por meio de estudos de evolução cromossômica e mapeamento comparativo, a identificação de genes responsáveis por condições e doenças na espécie humana.

Até o ano de 2006, o genoma de búfalo de rio encontrava-se com 302 marcadores mapeados por diferentes metodologias como, hibridização *in situ* (IANNUZZI et al., 2003; DI MEO et al., 2005; 2006) e painel de células somáticas (EL NAHAS et al., 2001). O mapa bovino encontra-se com 17.254 marcadores distribuídos pelos seus 30 pares cromossômicos (SNELLING et al., 2007) com um tamanho estimado do genoma de 2424 megabases, (alcançando uma densidade média de um marcador a cada 140 kilobases). Além disso, o genoma bovino está sendo seqüenciado e uma montagem contendo aproximadamente 7,1X de cobertura encontra-se publicamente disponível desde 2006 no NCBI (NCBI-Map Viewer, 2008). Comparando as informações entre os dois genomas, observa-se que estudos do genoma bubalino encontram-se atrasados, o que coloca o búfalo de rio em grande desvantagem quando comparado aos outros animais de interesse econômico.

Para alcançar níveis satisfatórios de conhecimento sobre este genoma, a obtenção de mapas mais saturados e comparação dos mesmos entre diferentes espécies tornam-se necessários.

O mapeamento genômico consiste na localização de seqüências de DNA à uma região cromossômica e determinação da ordem desta seqüência linear em relação a outras no mesmo cromossomo. É uma importante ferramenta de estudos de genomas uma vez que representa uma fonte para localizar seqüências únicas, determinando sua transmissão, através das gerações e, compreender a estrutura, organização, função dos genomas, bem como o modo pelo qual ocorreu sua evolução durante a adaptação (REXROAD, 1998) por meio de estudos de Genômica Comparativa

A genômica comparativa é um campo da genética evolutiva que visa a análise e comparação dos genomas de diferentes espécies tendo por objetivos obter um melhor conhecimento de como as espécies evoluíram, e desvendar a função de genes e regiões não-codificantes no genoma. Os desafios recentes desta temática consistem em usar características de organização genômica para entender os padrões e taxas de evolução cromossômica, e aplicação destes para revelar os processos envolvidos na reestruturação dos genomas (MURPHY et al., 2001; 2003). É particularmente elucidativa na identificação de elementos genômicos altamente conservados além dos genes codificantes (MARGULIES et al., 2003; THOMAS et al., 2003).

A comparação entre genomas de diferentes espécies de mamíferos vem possibilitando o conhecimento mais detalhado sobre a evolução cariotípica deste grupo, assim como dos mecanismos envolvidos na sua evolução e seu significado para a especiação (FERGUSON-SMITH e TRIFONOV, 2007). Trata-se de um

campo que tem se beneficiado da citogenética, genética e tecnologias de mapeamento gênico através do mapeamento comparativo, considerado uma importante ferramenta da genômica comparativa que busca obter informações em uma espécie a partir dos conhecimentos existentes do genoma de outra espécie, por meio da extrapolação de informações de um genoma para o outro (REXROAD et al., 1999; GOLDAMMER et al., 2002; WOMACK, 2005).

O mapeamento comparativo tem sido importante para predição e análise de características genéticas simples e complexas em animais de interesse econômico, e no entendimento da evolução do genoma de vertebrados. Uma das primeiras aplicações do mapeamento gênico comparativo consistiu em prever a localização de genes específicos em espécies com mapas pobres em genes a partir da extrapolação de informações de outras espécies com mapas ricos em genes. Segundo Nadeau e Sankoff (1998) a proximidade física de genes ou outro tipo de marcador molecular no genoma de uma espécie, pode implicar em proximidade dos mesmos no genoma de outra espécie relacionada. Baseados neste princípio, as informações de genomas tão bem estudados como o humano, o murino e o bovino, servem como base para estudos de genômica comparativa com outros mamíferos, auxiliando na compreensão da diversidade fisiológica, fenotípica e metabólica entre eles (BAND et al., 2000; LARKIN et al. 2003; MURPHY et al., 2003).

Os mapas comparativos também têm sido ferramenta de grande utilidade no estudo de genomas de espécies domésticas de interesse econômico como boi, ovelha, cabra e recentemente búfalos (FAHRENKRUG et al., 2000; LE PROVOST et al., 2000; IANNUZZI et al., 2001; GOLDAMMER et al., 2004; DI MEO et al., 2005; PERUCATTI et al., 2006). Tais espécies compartilham um ancestral comum a menos de 50 milhões de anos atrás e, informações tanto sobre marcadores tipo I

(genes expressos) e tipo II (seqüências de microssatélites) podem ser intercambiáveis entre elas.

Os mapas comparativos também podem ser usados para predição do conteúdo gênico de um segmento cromossômico específico com o objetivo de desenvolver novos marcadores físicos ou genéticos. Esta ferramenta da genômica comparativa também pode identificar regiões ortólogas de locos relacionados a doenças entre animais de interesse econômico e espécies modelo e ser humano. Neste caso, um exemplo de sucesso foi o mapeamento do locus callipyge relacionado com o fenótipo de distrofia muscular (CLPG) em ovelhas (SEGERS, et al., 2000; CHARLIER, et al., 2001). A sua aplicabilidade no estudo de evolução cromossômica é indiscutível, nesta área o mapeamento comparativo entre vertebrados, incluindo animais de interesse econômico, tem provido elucidativas informações sobre a natureza da evolução cromossômica em aves e mamíferos. O principal achado destes trabalhos é a alta conservação observada entre estes genomas (BURT et al., 1999; GRAVES e SHETTY, 2000).

A organização dos genomas tem sido inferida tradicionalmente usando duas ferramentas: mapeamento citogenético e mapeamento físico. Comparações de padrões cromossômicos G-bandeados foram primeiramente utilizados para inferir homologias de cromossomos inteiros ou sub-regiões entre espécies das diferentes ordens de mamíferos (NASH e O'BRIEN, 1982; DUTRILLAUX e COUTURIER, 1983) e dentro das mesmas ordens (YUNES et al., 1980; GALLAGHER e WOMACK, 1992; IANNUZZI et al., 1994; GALLAGHER et al., 1998). Mapeamento gênico usando células híbridas somáticas subsequente confirmaram que grandes regiões do genoma de mamíferos são conservadas (LALLEY et al., 1978; NASH e O'BRIEN, 1982; O'BRIEN et al., 1997a; 1997b), sugerindo que a transferência de informação

de espécies, como humano e camundongo que possuem mapas ricos em genes, para desenvolver mapas de espécies de animais domésticos com mapas pobres em genes trata-se de algo factível (O'BRIEN, 1991; O'BRIEN et al., 1993; 1997b; BURT, 2002; WOMACK et al., 2005).

Projetos de mapeamento e seqüenciamento em muitas espécies de vertebrados revelam uma natureza conservativa e altamente dinâmica da organização dos genomas (O'BRIEN et al., 1999a, 1999b; WOMACK et al., 2005). O seqüenciamento do genoma de um número crescente de organismos revela que as seqüências transcritas dos genomas são altamente conservadas entre as espécies, sendo esta conservação observada em vários níveis incluindo homologias de grupos de ligação e até mesmo regiões cromossômicas inteiras. Grupos de genes ligados e em ordem similar podem ser encontrados em espécies como humanos, galinha, moscas, vermes e anêmonas do mar (PUTMAN et al., 2007).

Quando dois genes estão no mesmo cromossomo, diz-se que eles são sintênicos. Se estes genes também são sintênicos em outra espécie, chamamos de sintenia conservada (BURT, 2002), uma característica proeminente no genoma de vertebrados (OHNO, 1973). Os blocos sintênicos conservados são grandes blocos de DNA, freqüentemente abrangendo cromossomos inteiros ou braços cromossômicos compartilhados por espécies diferentes próxima ou distantemente relacionadas (FERGUSON-SMITH e TRIFONOV, 2007). As diferentes combinações destes blocos sintênicos implicam nas diferenças entre número e morfologia cromossômica (MURPHY et al., 2005). Blocos que estão fusionados em uma espécie podem estar em cromossomos separados em outra, sendo assim, o número cromossômico pode aumentar ou diminuir, respectivamente, por fissão ou fusão cromossômica (YANG et al., 1997), e segmentos dentro destes blocos podem ser

invertidos reposicionando os centrômeros. Entre os mamíferos, por exemplo, o número cromossômico varia de $2n = 6$ no *Muntjac* indiano a $2n = 120$ no roedor *viscacha* (FERGUSON-SMITH e TRIFONOV, 2007), apresentando conteúdos gênicos similares, porém rearranjados.

Os genomas de búfalo de rio e boi são extremamente conservados (IANNUZZI et al., 1994). Levando-se em consideração esta conservação e o fato de que o genoma bovino ser o mais bem estudado dentre as espécies de interesse econômico, o mapa físico do genoma bovino tem potencial para ser utilizado como fonte de marcadores para geração de mapas do genoma bubalino (EL NAHAS et al., 2001).

Alguns trabalhos têm sido conduzidos no intuito de se integrar genes e microssatélites bovinos a cromossomos específicos de búfalo (EL NAHAS et al., 2001; IANNUZZI et al., 2003; DI MEO et al., 2005; 2006). No entanto, as ferramentas utilizadas por esses autores, técnicas de hibridização *in situ* e painel de células somáticas, apesar de terem sido de grande utilidade para estudos iniciais deste genoma, apresentam uma limitação quanto à resolução dos mapas que são capazes de gerar.

A criação de um mapa de alta resolução do genoma bubalino faz-se necessária para que os estudos deste genoma possam progredir em paralelo com o crescimento econômico da bubalinocultura. Recentemente, o Laboratório de Genômica Comparativa – Ibilce/UNESP construiu uma ferramenta que permite a elaboração de mapas genômicos de alta resolução para o estudo do genoma bubalino: o painel de células híbridas irradiadas BBURH₅₀₀₀ (AMARAL et al., 2007). Por meio desta ferramenta de mapeamento, já foram construídos os mapas RH (*Radiation Hybrid*) dos cromossomos de búfalo 3 e 10 (AMARAL et al., 2007), 6

(STAFUZZA et al., 2007), 1 (MIZIARA et al., 2007) e 7 (GOLDAMMER et al., 2007), totalizando 290 marcadores.

O mapeamento utilizando painéis de células somáticas híbridas irradiadas (RH) foi desenvolvido por Goss e Harris (1975), porém foi deixado de lado por ser impraticável devido à pequena disponibilidade de marcadores na época. Posteriormente foi redescoberto por Cox e colaboradores (1990) como uma técnica efetiva na construção de mapas ordenados de sítios de seqüências alvo, independentemente da variação alélica. Esta técnica, utilizada como ferramenta para ordenar locos ao longo dos cromossomos, permite a obtenção das distâncias físicas entre locos adjacentes. Neste método uma dose letal de radiação é aplicada nas células do genoma de interesse, denominadas doadoras, com a função de quebrar, ao acaso, seus cromossomos em múltiplos fragmentos. Estes fragmentos são posteriormente incorporados ao genoma de uma célula receptora mutante, geralmente de roedor, através de um processo de fusão celular. Cada clone RH gerado a partir desta fusão, contém um único conjunto de fragmentos cromossômicos da célula doadora incorporado ao genoma da célula receptora, que atinge estabilidade após sucessivos processos de divisão celular.

Posteriormente, os clones híbridos são testados quanto à presença ou ausência de marcadores de DNA do genoma de interesse. Utilizando métodos estatísticos para a ordenação linear, a distância relativa entre os diferentes marcadores pode ser determinada resultando num mapa RH. Tais métodos analisam os dados baseando-se na hipótese de que, quanto menor a distância física entre dois locos no cromossomo, maior a probabilidade de serem mantidos juntos durante o processo de fragmentação do genoma (COX et al., 1990; REXROAD, 1998; AGARWALA et al., 2000). Com esta metodologia de mapeamento é possível

verificar regiões de homologia do genoma entre as espécies de mamíferos, detectando regiões conservadas do genoma, uma vez que torna possível o mapeamento de genes, os quais geralmente apresentam-se extremamente conservados durante o processo evolutivo.

Mapas RH têm sido utilizados na construção de mapas saturados de diversas espécies como camundongo (McCARTHY et al., 1997), porco (YERLE et al., 1998; 2002; HAWKEN et al., 1999), cachorro (PRIAT et al., 1998), gato (MURPHY et al., 1999a), ovelha (BURKIN et al., 2003; ENG et al., 2004), cavalo (CAETANO et al., 1999a; 1999b; KIGUWA et al., 2000; CHOWDHARY et al., 2002; 2003), boi (WOMACK et al., 1997; WILIAMS et al., 2002; ITOH et al., 2005; SNELLING et al., 2007) e recentemente búfalo de rio (AMARAL et al., 2007).

O cromossomo X é o mais extensamente conservado em tamanho, conteúdo e ordem gênica entre os mamíferos. O seqüenciamento completo do X humano e murino confirma que o cromossomo X de mamíferos placentários porta um conteúdo praticamente idêntico de genes. Entre os três diferentes grupos de mamíferos existentes, os prototheria, metatheria (marsupiais) e eutheria (placentários), uma região extensamente conservada representa o cromossomo X mamífero original que foi retido há pelo menos 210 milhões de anos na linhagem ancestral dos três grupos. Segundo Ohno (1967), a evolução da compensação de dose do cromossomo X criou uma barreira que previne a troca de genes de outros cromossomos com o cromossomo X (uma vez que isto causaria um desequilíbrio nos níveis de expressão destes genes) levando à fixação do seu conteúdo gênico devido à forte seleção para a manutenção da compensação de dose. Esta alta conservação do conteúdo gênico e da ordem gênica do cromossomo X têm sido observada em muitos estudos de mapeamento deste cromossomo em mamíferos (WATSON et al. 1990; PONCE DE

LEON et al., 1996; MURPHY et al., 1999b; RAUDSEPP et al., 2002; 2004; QUILTER et al., 2003; RUBES et al., 2005) principalmente dentro da família bovidae (IANNUZZI et al., 2000; AMARAL et al., 2002; CHAVES et al., 2005; IANELLA et al., 2008).

Rearranjos internos que culminam em algumas diferenças entre as espécies, como diferenças na posição dos centrômeros e região pseudoautossômica (*Pseudo Autosomal Region* – PAR), têm sido reportados por meio de estudos genéticos, análise de ligação, hibridização *in situ* e mapeamento RH (IANNUZZI e DI MEO, 1995; YEH et al., 1996; PONCE DE LEON et al., 1996; IANNUZZI et al., 2000; AMARAL et al., 2002).

O mais recente mapa do cromossomo X de búfalo de rio possui 28 marcadores (incluindo sete genes e 21 microssatélites) mapeados por hibridização *in situ*, contrastantes com os 176 marcadores ordenados no cromossomo X bovino por tecnologia de mapeamento RH (JANN et al., 2006). O cromossomo X contém genes relacionados às mais diversas funções, sendo que aqueles relacionados a traços reprodutivos (SAIFI e CHANDRA, 1999), inteligência e desenvolvimento cerebral (LEHRKE et al., 1972; TURNER, 1996) parecem estar mais representados neste cromossomo. Genes responsáveis por processos metabólicos relacionados à reprodução, tais como: o gene AR (receptor de andrógenos), o gene ZFX, um dos responsáveis pela determinação sexual e o gene XIST, um dos responsáveis pela inativação do X estão situados neste cromossomo. Um número considerável de doenças genéticas correspondentes a genes humanos conhecidos, também têm sido mapeado no cromossomo X bovino, incluindo: amelogenina X (amelogênese imperfeita – AmelX, receptor di-hidrotestosterona AR – feminização testicular; e deficiência de receptores de andrógeno – AMARAL, et al., 2002). Alguns estudos

têm descrito QTLs relacionadas a crescimento no cromossomo X humano (DENG, et al. 2002; LIU et al., 2003), murino (LIU et al., 2001) e suíno (MALEK et al., 2001) e relacionadas à deposição de gordura em porco (HARLIZIUS et al., 2000; MILAN et al., 2002; GABOREANU et al., 2004).

Embora seja portador de genes que controlam importantes características, pouca pesquisa aplicada relacionada ao cromossomo X de espécies de interesse econômico tem sido realizada. Este fato é primariamente atribuído às limitadas informações de mapeamento disponível para este cromossomo mesmo nas espécies mais bem estudadas como boi (AMARAL et al., 2002), porco (McCOARD et al., 2002), ovelha, cabra e búfalo (IANNUZZI et al., 2000), sendo elas insuficientes para permitir estudos substanciais com o objetivo de dissecar traços de interesse.

Iniciativas para realizar melhoramento genético desta espécie economicamente importante são essenciais para atender as necessidades da emergente bubalinocultura, e o desenvolvimento de mapas é o primeiro passo para situar o búfalo de rio no mesmo *status* de outros animais domésticos de interesse econômico. Adicionalmente, o mapa comparativo entre búfalo e boi resulta em informações que permitem avanços no entendimento da evolução cariotípica desta espécie, e dos rearranjos que culminaram nas pequenas diferenças deste conservado cromossomo durante a evolução das espécies da família Bovidae.

OBJETIVOS



O presente trabalho teve por objetivo

- construir o primeiro mapa do tipo RH do cromossomo X de búfalo de rio (*Bubalus bubalis*) utilizando-se como ferramenta o painel de células híbridas somáticas (BBURH₅₀₀₀) incorporando-se marcadores do tipo gene, microssatélites e Etiquetas de Sequências Expressas (ESTs), fazendo deste o ponto de partida para construção de mapas de maior resolução e comparação com bovino.

- comparação do mapa RH do cromossomo X de búfalo de rio gerado com mapas do cromossomo X de outras espécies de mamíferos: humano, murino, bovino, eqüino, ovino e canino.

MATERIAL E MÉTODOS



Para construção do primeiro mapa do cromossomo X de búfalo de rio, pares de *primers* de marcadores tipo microssatélites, genes e ESTs oriundos do genoma bovino foram tipados no painel de células híbridas irradiadas (BBURH₅₀₀₀) construído por Amaral e colaboradores (2007).

Primeiramente a seleção de um conjunto de 80 marcadores localizados no cromossomo X de boi foi realizada, visando uma cobertura mais completa possível do cromossomo em estudo. Dos marcadores selecionados foram registradas as seqüências dos *primers* para PCR, disponíveis em bases de dados sobre o genoma bovino como o mapa de sequência do genoma bovino build 3.1 e do mapa de ligação *MARC Bovine Linkage Map*, disponíveis no banco de dados do *NCBI MAP VIEWER* (2008) e complementada com dados de artigos recentes que continham marcadores ainda não depositados nos bancos de dados. .

Estes 80 pares de *primers* foram testados em experimentos de PCR do tipo gradiente que tiveram por objetivo avaliar a viabilidade de utilização dos mesmos para o mapeamento RH por meio da verificação da qualidade do produto de PCR gerado com o DNA das linhagens parentais que originaram o painel RH de búfalo (DNA de búfalo e de hamster), e identificar a temperatura ideal de anelamento dos *primers* no genoma bubalino quando estes foram viáveis. O DNA bovino foi incluído na reação de PCR como controle positivo uma vez que os *primers* foram desenhados a partir dos estudos deste genoma. Os produtos de PCR obtidos foram avaliados quanto ao padrão de amplificação com esses DNAs, devendo ser búfalo específico ou diferenciado do produto gerado com DNA de roedor para que o marcador seja selecionado para tipagem no painel BBUXRH₅₀₀₀.

Os marcadores considerados adequados para mapeamento RH foram então tipados nas linhagens do painel por meio de reação de PCR. Em cada experimento

de tipagem foram incluídos DNA de búfalo e roedor como padrões de amplificação. Tais experimentos foram realizados duas vezes para evitar a ocorrência de falsos positivos e falsos negativos. Nos casos de resultados ambíguos, um terceiro experimento somente com as linhagens de resultados discordantes foi realizado. A análise da tipagem dos marcadores foi feita com base no padrão de presença ou ausência dos mesmos nas diferentes linhagens híbridas do painel. Os resultados de presença e ausência foram então convertidos em dados numéricos: (0) para a ausência de amplificação de um dado marcador em uma dada linhagem, (1) para a presença e (2) nos casos duvidosos, em uma planilha do tipo Excel.

Estes dados foram analisados pelos programas de análise estatística *rh_tsp_map* versão 3.0 (SCHÄFFER et al., 2007) e CONCORDE (APPLEGATE et al., 1998) ligados ao QSOPT (<http://www2.isye.gatech.edu/~wcook/qsopt/>), que se baseiam no critério da máxima verossimilhança.

Para a construção do mapa comparativo entre o cromossomo X de búfalo e de outras espécies de mamíferos foram utilizados o mapa RH do cromossomo X bubalino (BBUXRH₅₀₀₀), (IANELLA et al., 2008) e os mapas de sequência do cromossomo X humano (HSAX - NCBI *Homo sapiens* build 36.3) representando a Ordem Primata, murino (MMUX - NCBI *Mus musculus* build 37.1) representando a Ordem Rodentia, bovino (BTAX - NCBI *Bos taurus* build 3.1) – Ordem Artiodactyla, assim como búfalo de rio, canino (CFAX - NCBI *Canis lupus familiares* build 2.1), Ordem Carnivora, e eqüino (ECAX – NCBI *Equus caballus* build 1.1) Ordem Perissodactyla e mapa de ligação de ovino (OARX – *Ovis aries* linkage map v 4.7) também representante da Ordem Artiodactyla. Uma primeira comparação valendo-se somente dos genes comuns a estas espécies foi realizada utilizando-se os genes e ESTs mapeados no cromossomo X de búfalo.

Considerando-se a conservação de seqüências repetitivas, (não codificantes) como marcadores do tipo microssatélite entre espécies proximamente relacionadas, foi realizada a comparação dos mapas dos cromossomos X de búfalo (BBUXRH₅₀₀₀) e de ovelha (OARX linkage map) observando-se a conservação de sintenia e de marcadores tipo I e marcadores tipo II.

Os mapas BBUX e OARX (linkage map) foram desenhados utilizando-se o programa computacional MapChart (VOORRIPS, 2002) a partir das posições de mapa obtidas para BBUX_{RH5000} (IANELLA et al., 2008) e OARX (linkage map v 4.7). Este programa utiliza as distâncias de mapas obtidas em experimentos de mapeamento para construir uma representação gráfica de mapas de ligação, RH e QTLs. O *software* encontra-se disponível na página de internet <http://www.joinmap.nl>. As outras comparações foram realizadas valendo-se das posições em megabases e em centimorgans (no caso ovelha) dos genes e ESTs mapeados nos cromossomos X destas espécies.

RESULTADOS



Os resultados obtidos neste trabalho foram divididos em dois capítulos. O capítulo I traz o artigo publicado na Revista Animal Genetics (IANELLA et al., 2008) onde o primeiro mapa RH do cromossomo X bubalino (BBUX₅₀₀₀) é apresentado e comparado com mapas RH e mapa de sequência de bovino.

O capítulo II trata da comparação mapa do cromossomo X apresentado no capítulo I com mapas do cromossomo X de diferentes espécies de mamíferos.

CAPÍTULO I

Artigo publicado na Revista

Animal Genetics

ISSN 1365-2052

2008

First radiation hybrid map of the river buffalo X chromosome (BBUX) and comparison with BTAX

P. Ianella*, L. P. R. Venancio*, N. B. Stafuzza*, M. N. Miziara*, R. Agarwala[†], A. A. Schäffer[†], P. K. Riggs[‡], J. E. Womack[§] and M. E. J. Amaral^{*,§}

*Dept. Biologia, IBILCE, UNESP – São Paulo State University, São José do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil. [†]National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Bethesda, MD 20894, USA. [‡]Department of Animal Science, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA. [§]Department of Veterinary Pathobiology, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA

Summary

We report the first radiation hybrid map of the river buffalo X chromosome generated from a recently constructed river buffalo (*Bubalus bubalis*) whole-genome radiation hybrid panel (BBURH₅₀₀₀). This map contains a total of 33 cattle-derived markers, including 10 genes, four ESTs and 19 microsatellites. The markers are distributed in two linkage groups: LG1 contains eight markers spanning 125.6 cR, and LG2 contains 25 markers spanning 366.3 cR. LG1 contains six markers in common with bovine sequence assembly BUID 3.1. With the exception of BMS2152, the order of these markers on our BBUX map is shuffled when compared to the cow X chromosome (*Bos taurus*; BTAX). From LG2, two markers (AMELX and BL22) map to a more distal portion of BTAX compared to BBUX. In addition, two pairs of LG2 markers exhibit inversions compared to BTAX (ILSTS017 and ATRX; XBM38 and PPEF1). Alternatively, when compared to the most recent bovine RH map (Bov-Gen 3000rads), BL1098 and BMS2227 from LG1 as well as PLS3 and BMS1820 from LG2 showed inverted positions on the BBUX map. These discrepancies in buffalo and cattle maps may reflect evolutionary divergence of the chromosomes or mapping errors in one of the two species. Although the set of mapped markers does not cover the entire X chromosome, this map is a starting point for the construction of a high-resolution map, which is necessary for characterization of small rearrangements that might have occurred between the *Bubalus bubalis* and *Bos taurus* X chromosomes.

Keywords radiation hybrid mapping, river buffalo, X chromosome.

Chromosomal banding patterns reveal nearly identical karyotypes of river buffalo (*Bubalus bubalis*, $2n = 50$) and cattle (*Bos taurus*, $2n = 60$), with five bi-armed buffalo chromosomes appearing to be the result of fusions between single-armed cattle chromosomes (Iannuzzi 1994; Iannuzzi *et al.* 2003). This close relationship between buffalo and cattle genomes has been useful for the construction of buffalo radiation hybrid (RH) maps based on cattle-derived markers (Amaral *et al.* 2007; Miziara *et al.* 2007; Stafuzza *et al.* 2007). In contrast to the extensive autosomal banding conservation among bovine and buffalo, the X chromosome shows considerable structural differences both in shape and/or centromeric position, attributed to rearrangements

during evolution of these species. The bovine X chromosome is characterized as submetacentric while the river buffalo is acrocentric. Cytogenetic studies, linkage analysis, FISH and RH mapping approaches (Iannuzzi & Di Meo 1995; Ponce de León *et al.* 1996; Yeh *et al.* 1996; Hassanane *et al.* 1998; Iannuzzi *et al.* 2000; Amaral *et al.* 2002) have demonstrated probable rearrangements that occurred during evolution to result in the present morphology of the X chromosome in these species.

The most recent gene map of the river buffalo X chromosome (Iannuzzi *et al.* 2000, 2003) includes a total of 28 markers (seven genes and 21 microsatellites) assigned by FISH. In contrast, the cattle X chromosome map contains 176 markers ordered by RH technology (Jann *et al.* 2006). In this paper, we describe the first RH map for the river buffalo X chromosome composed of 33 cattle-derived markers, including 10 genes, four ESTs and 19 microsatellites.

Forty-eight markers were successfully typed on the 90 RH lines and control buffalo and hamster DNA by PCR in 96-well

Address for correspondence

M. E. J. Amaral, Department of Veterinary Pathobiology, Vet. Med. Res. Bldg #1197, Raymond Stotzer Parkway, Texas A&M University, College Station, TX 77843-4467, USA.
E-mail: eamaral@cvm.tamu.edu

Accepted for publication 8 November 2007

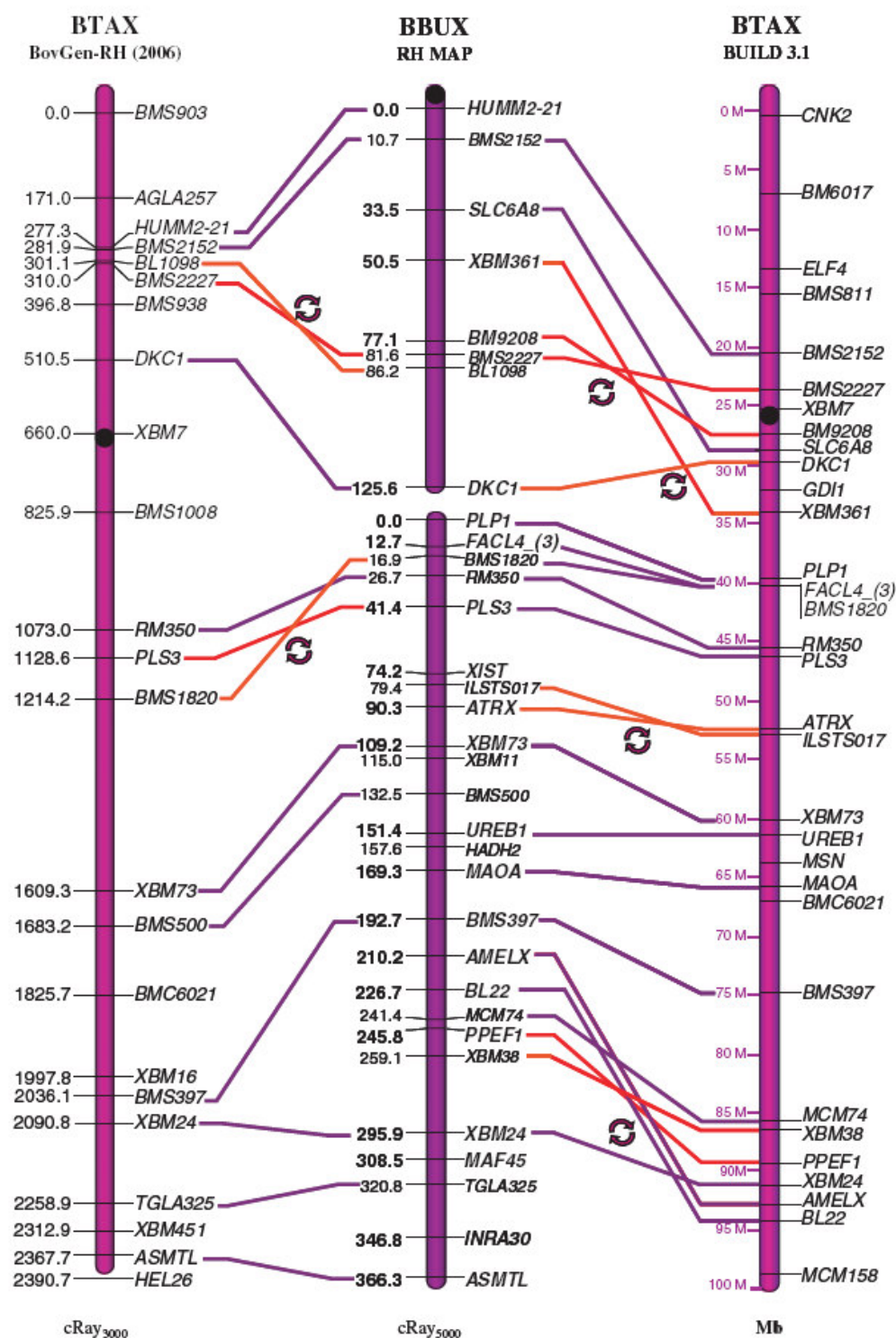


Figure 1 Comparison of the BBUX RH map (centre) with the BTAX RH map (BovGen RH map) (left), and the bovine genome BUILD 3.1 for BTAX (right). All framework markers are shown in bold letters because for each framework marker, its position is better than the next best alternative by at least 0.50 LOD score units. Markers common to the BBUX framework map, the BTAX genome sequence and the BovGen RH are joined by a solid line. Positions in the BBUX map are in cR₅₀₀₀, while positions in the BTAX RH map are in cR₃₀₀₀ and the BTAX genome assembly is in Megabases (Mb). Solid red lines are showing inverted pairs of markers. The centromere positions shown as black circles on the BTAX and BBUX maps are approximate.

Table 1 Cattle-derived markers from BTAX mapped with the BBURH₅₀₀₀ panel.

Marker	Type	RF (%)	Location (cR)	T _M (°C)	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	UniSTS	GenBank accession no. (cattle)
LG1								
HUMM2-21 ¹	MS	12.2	0.0	65	ACCAAGTTGAGATGGTGC	TCCATAGACAGAGAAGCCCTGG	250835	M97201
BMS2152 ²	MS	12.2	10.7	61	AGTGGCTCTAACCAATATGAA	TGTATTACACCTCTGTGTCTGA	16531	G18928
SLC6A8 ³	Gene	12.4	33.5	65	AGCAAGGTGGTGGTGGAAA	GCGTGTGCACAGCTTGGTTAT	279111	AF027197
XBMS361 ²	MS	12.2	50.5	56	ACACACTGAAATTAACACTACAAAACC	ACACAACTGAAGCCACTTTAAGC	251341	AAFC03123691
BM9208 ³	MS	15.6	77.1	50	TGCACATCACGTTTACC	TTCTGGCAGCATCTTCTTG	71474	G18398
BL1098 ⁴	MS	15.7	81.6	65	CCACAACTTCCAGAGCCTC	CAGAAACCCCAAACTAACC	251324	AC173646
BMS2227 ²	MS	14.6	86.2	60	AAATTGCTATTTCTAGACATGATT	ATGGTTATTTTCATATACAGAGGTATG	2305	G18963
DKC1 ³	EST	13.3	125.6	58	AGAGACACACTTACCCTCGGAA	TGCAGTACTCTTGATCCA	278284	AW481424
LG2								
PLP1 ³	Gene	17.8	0.0	65	ACAGTCTGGTCTGCCATGTT	TGCTCCCTTCTCTACCTGA	278921	X03098
FCL4.(3) ³	EST	16.7	12.7	60	ACGAATTTTGGCCACAC	GTAGGCTCAATAAGGCGAGTGC	278365	AW461447
BMS1820 ³	MS	15.6	16.9	56	CACAAGAATACACATCATGG	ACTGTGACTGAGTGGAAAGG	23799	G18604
RM350 ⁴	MS	12.5	26.7	65	TGTCCAGATGTGCTCTAG	AGTTCACTGATTGTGCACACC	75313	G29109
PLS3 ³	Gene	15.6	41.4	62	CCTGAAATGTGCCCATAGTC	TCTAAGCAAGTCCCAAGAGG	278922	AW462747
XIS7 ⁴	Gene	10	74.2	60	AATTGTATCATGAGGTGGG	GTACGCCATATTGTCTGCACG	- ⁵	NC_007331
ILST5017 ³	Gene	12.2	79.4	54	GTCCCTAAATCCAAATGCC	GCATCTCTATACCTGTTCC	250806	L23491
ATRX ³	Gene	10	90.3	65	GGAAGACATAGAAGCCAGTGA	GGATACGTTGTGTTGTAGC	278012	AW289378
XBMT73 ²	MS	8.9	109.2	61	CGATGCAGCAACATCCC	TTGGTGTGCTTCTTGTCTG	251004	AAFC03053159
XBMT11 ³	MS	10	115.0	60	TACTGATGGAGGTTTCTGAGA	CCCAGAGTCTTTGTGCAAGG	251008	AC168904
BMS500 ²	MS	11.1	132.5	63	GAAAGTATACAAAGAGGGG	CAGTAACGACATGTTGTACC	54301	G18723
UREB1 ²	Gene	7.8	151.4	65	ATTTGGCTGTCTGGGTCTTAG	AAGCAGCGCAGGATATGGACT	279246	AW428599
HADH2 ³	Gene	8.9	157.6	65	GGAGCGCAGACAGACAAAGGT	ATTAGGCACACAGGTGACTGA	278513	AB002156
MAOA ⁶	Gene	11.1	169.3	63	GGAAAGTTTGTAGGTGGATCTGG	GGGATGGCCTAATGACATACC	New designed ⁶	X15609
BMS397 ³	MS	11.1	192.7	58	GCCACAATACTACCAACCGC	AAATAAAGCAATTTGAAACAGACTG	48316	G18564
AMELX ⁴	Gene	10	210.2	64	GTTCTCTATTCCTCTCATCATCC	GACCCCACTCCTTCCACTATTG	- ⁵	M86932
BL22 ²	MS	13.5	226.7	56	CTGTCCCTGACTGCC	TTTCTTCTTTATCTGTTCAAGTGG	251054	AAFC03110331
MCM74 ²	MS	15.7	241.4	62	CAATATCTTGTCCTCCATCCCTGTTT	AGATTGGGTGTCAGCTCTATCAAG	251439	L34286
PFEF1 ³	EST	15.6	245.8	60	AAGCTAGTGTGGTCTCTGG	GCTGTACTTCTCTGGTGTTC	278935	AW314533
XBMS38 ³	MS	16.9	259.1	65	TTGGACACTCTGAGACATCA	TGAACATCTGCTGGAATCATG	250997	AAFC03011672
XBMT4 ²	MS	27.0	295.9	59	TTACCACTGAGCCACCTGG	ATGATGCTTCTGTCAAGAGTTT	251009	AAFC03012250
MAF45 ²	MS	28.9	308.4	58	ATTACACTTCAAGTAAGTTAACAAATGG	CAGACACAACCTGACAACTAGCCG	250702	M67436
TGLA325 ⁴	MS	28.9	320.8	59	GGGCACTTACTCTCTGAACAAATC	GCTGACAGTCTATTTCCAGAAGGTA	250950	AAFC03128020
INRA30 ⁷	MS	28.9	346.8	59	ATGCAAACTGCTACATCACTAT	CCCACTCTCACATCCAGAT	250757	X67822
ASMTL ³	EST	26.7	366.3	58	CCAAAGATGGTCAGCTGGACAC	TCCCACAGCATCTCTCTGACA	278001	AW656774

¹USDA MARC database: <http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html>; ²Ihara et al. 2004; ³Everts-van der Wind et al. 2002; ⁴Amaral et al. 2004; ⁵New UniSTS assignment; ⁶New designed primers from known cattle ESTs; ⁷Vaiman et al. 1994.

microtitre plates on a thermocycler with thermal gradient (PTC-200; MJ Research), as described by Stafuzza *et al.* (2007). The PCR products were electrophoresed through 2% agarose gels in 1.0× TBE buffer containing ethidium bromide, and photographed under UV light. PCR products were scored as 1 for present, 0 for absent or 2 for ambiguous amplification. All primer sets were typed twice with the RH panel DNA and scored independently. Primer pairs that produced ambiguous PCR results were typed a third time.

The BBUX RH map was constructed using maximum likelihood criterion with the software *rh_tsp_map* (Schäffer *et al.* 2007) and *CONCORDE* (Applegate *et al.* 2006) linked to *qsOPT* (<http://www2.isye.gatech.edu/~wcook/qsOPT/>). We followed instructions in the *rh_tsp_map* tutorial (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/agarwala/rhmapping/rh_tsp_map.tar.gz), which describes a multi-step, semi-automated procedure for computing RH maps. For this study, we carried out the steps from preparing input files and computing two-point LOD scores through to solving a restricted travelling salesman problem that assigns a cR position to each frame and placed marker in a unified instance. To compute linkage groups, we used a pairwise LOD score threshold of 7.0, which is greater than the thresholds used in previous river buffalo chromosome maps (Miziara *et al.* 2007; Stafuzza *et al.* 2007). The increased threshold was used because the increasing number of river buffalo markers now typed across multiple chromosomes increases the probability that a spurious high LOD score between two markers on different chromosomes will be observed.

In all, 48 markers were scored on the BBURH₅₀₀₀ panel. Out of the 48 markers, 33 were ordered and assigned to cR positions on the MLE-consensus map (Fig. 1). Table 1 shows additional information about the markers presented on the BBUX RH map. Fifteen other markers were not included in the map as they were in groups of three or smaller (10 markers), or could not be ordered with sufficient confidence (five markers).

The markers incorporated into the BBUX RH map (Fig. 1) were distributed in two linkage groups: LG1, spanning 125.6 cR with eight markers (one gene, one ESTs and six microsatellites) and LG2, spanning 366.3 cR with 25 markers (nine genes, three ESTs and 13 microsatellites). Six markers from LG1 on the BBUX map can be placed on bovine sequence assembly BUILD 3.1, but their order is shuffled between the two maps, and another pair of markers (*BMS2227* and *BL1098*) is inverted when BBUX is compared to the BTAX RH map (Jann *et al.* 2006). From LG2, two frame markers (*AMELX* and *BL22*) are shifted distally on BTAX relative to BBUX. In addition, there are two inversions, one between markers *ILSTS017* and *ATRX*, and the other between *PPEF1* and *XBM38*, when compared with the BTAX BUILD 3.1. Two markers from LG2 (*MCM74* and *TGLA325*) were previously assigned by FISH (Iannuzzi *et al.* 2003), serving as anchor markers for the orientation of the linkage group. When compared to the bovine RH

map, the BBUX map order is consistent, with the exception of an inversion between *BMS1820* and *PLS3*. These rearrangements may represent inversions and other rearrangement differentiating BBUX and BTAX, or the map and/or the assembly may be incorrect. It is also possible that as more markers are placed on the BBUX RH map, relative positions assigned to the markers may change.

The retention frequency (RF) of the mapped markers ranged from 7.8% for the gene *HUWE1* (previously *UREB1*) to 28.9% for the microsatellites *MAF45*, *INRA30* and *TGLA325*. Compared to the RF observed among markers from BBU1 (Miziara *et al.* 2007), BBU3, BBU10 (Amaral *et al.* 2007) and BBU6 (Stafuzza *et al.* 2007), a lower RF for markers on the X chromosome was expected, because the BBURH₅₀₀₀ panel was constructed from a cell line established from a male (XY) animal. The markers with a RF >20% (*XBM24*, *MAF45*, *TGLA325*, *INRA30* and *ASMTL*) are known to be located on the pseudoautosomal region (PAR) of BTAX, meaning that the selected PCR primers were also complemented with sequences from the buffalo Y chromosome. Our preliminary mapping results confirm the previous assignment of the PAR region to the terminal portion of BBUX (Prakash *et al.* 1997; Iannuzzi *et al.* 2000), thus assigning for the first time cR map positions for four markers (*XBM24*, *MAF45*, *INRA30* and *ASMTL*). Especially because a genetic linkage map does not exist for river buffalo, the RH map generated in this study provides valuable data for comparative mapping of the BBUX chromosome.

Radiation hybrid mapping within cow has exposed some likely large-scale position errors within BTA BUILD 3.1 (e.g. Marques *et al.* 2007). Radiation hybrid mapping in buffalo provides another approach that can shed light on discrepancies between BTA RH maps and the BTA BUILD 3.1, and help identify suspect regions in the cow assembly.

Acknowledgements

This work was funded by grants from FAPESP – Brazil (02/10150-5) to MEJA and NSF – USA (OISE-0405743) to JEW. CNPq – Brazil contributed with a fellowship to PI. This research was also supported in part by the Intramural Research Program of the NIH, NLM.

References

- Amaral M.E.J., Kata S.R. & Womack J.E. (2002) A radiation hybrid map of bovine X chromosome (BTAX). *Mammalian Genome* 13, 268–71.
- Amaral M.E.J., Owens K.E., Elliott J.S. *et al.* (2007) Construction of a river buffalo (*Bubalus bubalis*) whole-genome radiation hybrid panel and preliminary RH mapping of chromosomes 3 and 10. *Animal Genetics* 38, 311–4.
- Applegate D., Bixby R., Chvátal V. & Cook W. (2006) *The Traveling Salesman Problem: A Computational Study*. Princeton University Press, Princeton, NJ, USA.

- Everts-van der Wind A., Kata S.R., Band M.R. *et al.* (2004) A 1463 gene cattle-human comparative map with anchor points defined by human genome sequence coordinates. *Genome Research* 14, 1424–37.
- Hassanane M.S., Chaudhary R. & Chowdhary B.P. (1998) Micro-dissected bovine X chromosome segment delineates homoeologous chromosomal regions in sheep, goat and buffalo. *Chromosome Research* 6, 213–7.
- Iannuzzi L. (1994) 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* 67, 102–13.
- Iannuzzi L. & Di Meo G.P. (1995) Chromosomal evolution in bovids: a comparison of cattle, sheep and goat G and R-banded chromosomes and cytogenetics divergences among cattle, goat and river buffalo sex chromosome. *Chromosome Research* 3, 291–9.
- Iannuzzi L., Di Meo G.P., Perucatti A. *et al.* (2000) Comparative FISH mapping of the bovid X chromosomes reveals homologies and divergences between the subfamilies Bovinae and Caprinae. *Cytogenetics and Cell Genetics* 89, 171–6.
- Iannuzzi L., Di Meo G.P., Perucatti A. *et al.* (2003) 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* 102, 65–75.
- Ihara N., Takasuga A., Mizoshita K. *et al.* (2004) A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Research* 14, 1987–98.
- Jann O.C., Aerts J., Jones M. *et al.* (2006) A second generation radiation hybrid map to aid the assembly of the bovine genome sequence. *BMC Genomics* 7, 283.
- Marques E., de Givry S., Stothard P. *et al.* (2007) A high-resolution radiation hybrid map of bovine chromosome 14 identifies scaffold rearrangement in the latest bovine assembly. *BMC Genomics* 8, 254.
- Miziara M.N., Goldammer T., Stafuzza N.B. *et al.* (2007) Generation of a radiation hybrid map of river buffalo (*Bubalus bubalis*) chromosome one (BBU1). *Cytogenetic and Genome Research* 119, 100–4.
- Ponce de León F.A., Ambady S., Hawkins G.A. *et al.* (1996) Development of a bovine X chromosome linkage group and painting probes to assess cattle, sheep and goat X chromosome segment homologies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 3450–4.
- Prakash B., Olsaker I., Gustavsson I. & Chowdhary B.P. (1997) FISH mapping of three bovine cosmid to cattle, goat, sheep and buffalo X chromosomes. *Hereditas* 126, 115–9.
- Schäffer A.A., Rice E.S., Cook W. & Agarwala R. (2007) rh_tsp_map 3.0: end-to-end radiation hybrid mapping with improved speed and quality control. *Bioinformatics* 23, 1156–8.
- Stafuzza N.B., Ianella P., Miziara M.N. *et al.* (2007) Preliminary radiation hybrid map for river buffalo chromosome 6 and comparison to bovine chromosome 3. *Animal Genetics* 38, 406–9.
- Vaiman D., Mercier D., Moazami-Goudarzi K. *et al.* (1994) A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping and polymorphism. *Mammalian Genome* 5, 288–97.
- Yeh C.C., Taylor J.F., Gallagher D.S. *et al.* (1996) Genetic and physical mapping of the bovine X chromosome. *Genomics* 32, 245–52.

CAPÍTULO II

*Análise Comparativa entre os Mapas
do Cromossomo X de Búfalo de Rio e
outras Espécies de Mamíferos.*

No presente trabalho foram comparados mapas de cromossomos X de diferentes espécies de mamíferos (Figura 1): búfalo de rio, boi e ovelha representando a família Bovidae da Ordem Artiodactyla, humano representando a Ordem Primata, camundongo da Ordem Rodentia, cavalo representando a Ordem Perissodactyla e cachorro representando a Ordem Carnívora.

A figura 1 traz uma comparação entre os mapas de ligação do cromossomo X de ovelha e mapa RH do cromossomo de búfalo de rio (Figura 1A), e comparação entre genes ortólogos do cromossomo X de búfalo de rio, humano, camundongo, boi, cachorro, cavalo e ovelha (Figura 1B).

Na comparação do cromossomo X bubalino com humano (Figura 1B) pode-se observar que dentre os genes mapeados, somente o gene ILSTS017 não se encontra mapeado no genoma humano, e somente a Sequência de Etiqueta Expressa (EST) FACL4_(3) não se encontra anotada no mapa de sequência humano, porém este marcador encontra-se indicado no HSAX por outras ferramentas de mapeamento. Numa visão geral, os genes encontram-se arranjados em um mesmo bloco de sintenia contendo quatro inversões sinalizadas na figura. Os genes localizados nos blocos sinalizados (SCL6A8/ DKC1, PLP1/PLS3, XIST/ATRX e AMELX/PPEF1) ocupam posições diferentes em relação aos seus vizinhos em bubalino e humano, indicando a existência de rearranjos dentro destas regiões.

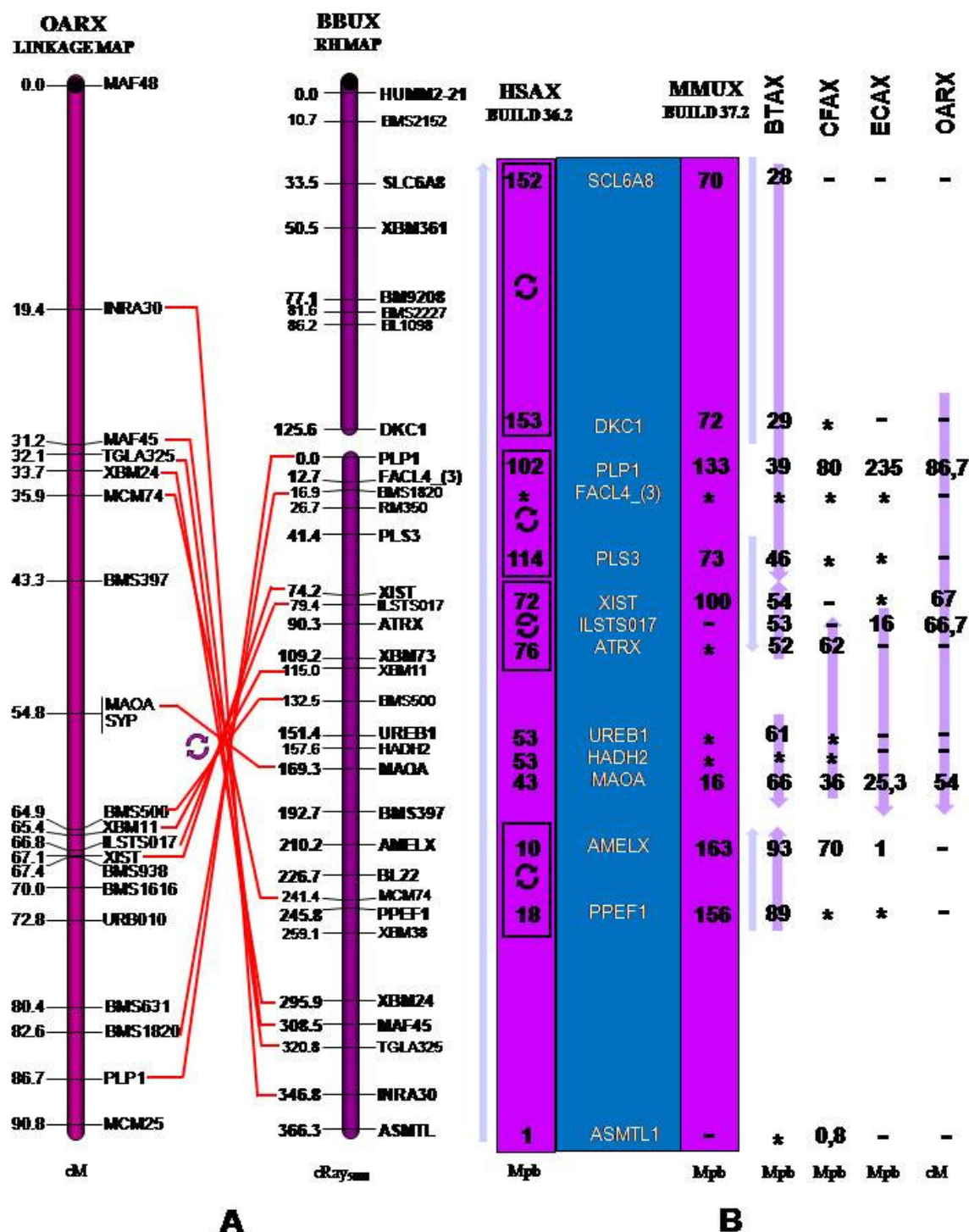


Figura 1: Mapa comparativo do cromossomo X de búfalo de rio. 1A: Comparação entre os marcadores do tipo I e II do mapa de ligação do cromossomo X de ovelha (OARX) e mapa RH do cromossomo X de búfalo (BBUX₅₀₀₀). Os marcadores correspondentes nos cromossomos das duas espécies estão ligados por linhas sólidas vermelhas, podendo se observar a conservação da ordem dos marcadores e inversão de todo este bloco sintênico. **1B:** Localização em mega pares de base (Mbp) das seqüências de todos os ortólogos de humano (HSA), camundongo (MMU), boi (BTA), cachorro (CFA) e cavalo (ECA) dos genes mapeados no cromossomo X de búfalo e localização em centimorgans (cM) para os ortólogos de ovelha mapeados no BBUX. (-): genes não mapeados no genoma da espécie; (*) não anotados: genes que estão indicados ao cromossomo X da espécie mas ainda não foram anotados no mapa de seqüência.

As comparações entre búfalo e camundongo mostram dois genes (ILSTS017 e ASMTL1) não mapeados no seu genoma e sete genes indicados no cromossomo X, mas não anotados no mapa de seqüência desta espécie. Uma grande conservação da ordem gênica pode ser observada na comparação com boi, mostrando apenas poucas discrepâncias como nos blocos gênicos (XIST/ILSTS017/ATRX) e (AMELX/PPEF1) que se encontram com a ordem invertida com relação ao búfalo. Os mapas de seqüência de cachorro e cavalo possuem poucos genes anotados que são comuns à estas espécies e búfalo de rio, não permitindo realizar inferências sobre a conservação da ordem dos marcadores. O mesmo pode ser observado na comparação dos genes com o mapa de ligação de ovelha (Figura 1B).

DISCUSSÃO



O primeiro mapa RH do cromossomo X de búfalo (BBUX-RH₅₀₀₀) foi elaborado a partir do recém construído painel de células híbridas irradiadas do genoma bubalino BBURH₅₀₀₀ (AMARAL et al., 2007). Foram incorporados ao mapa do cromossomo X, 33 marcadores, oriundos do cromossomo X bovino, sendo eles dez genes, quatro ESTs e 19 microssatélites.

Dos 80 pares de *primers* de marcadores inicialmente selecionados para serem testados com DNA bubalino, 32 foram considerados inadequados para os experimentos de tipagem no painel RH por não apresentarem produto único de PCR específico ou diferenciado de roedor. Os outros 48 pares de *primers*, que amplificavam produto de PCR adequados aos experimentos de mapeamento RH foram tipados pelo menos duas vezes nas 90 linhagens híbridas búfalo-roedor do painel BBURH₅₀₀₀. Os dados de presença e ausência compilados em matriz numérica de 0, 1 e 2 foram então analisados por pacotes estatísticos.

A análise estatística da tipagem destes marcadores foi realizada utilizando-se os *softwares* rh_tsp_map versão 3.0 (SCHÄFFER et al., 2007) e CONCORDE (APPLEGATE et al., 1998) ligados ao QSOPT (<http://www2.isye.gatech.edu/~wcook/qsopt/>). Estes *softwares* se baseiam no critério de máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood Estimate* - MLE) para a construção de um mapa consenso. Para computar os grupos de ligação foi utilizado *lod score* de 7, que foi maior do que o dos mapas dos cromossomos bubalinos 1 (MIZIARA et al., 2007) e 6 (STAFUZZA et al., 2007) construídos anteriormente. Isso significa que houve um aumento nos valores estatísticos mínimos para ordenação dos marcadores, tendo o presente mapa um maior suporte estatístico do que os anteriormente produzidos.

Dos 48 marcadores tipados, 33 foram ordenados e tiveram suas posições definidas no mapa com *lod score* superior a 7. Os outros 15 marcadores não foram

representados no mapa consenso do cromossomo X, dez deles por se encontrarem em grupos de três marcadores ou menos e, cinco deles porque não eram ordenados com a confiança mínima estabelecida ($LOD = 7$), ou seja, não alcançavam o suporte estatístico mínimo exigido para ser incorporados ao mapa.

Os 33 marcadores que integraram o mapa foram distribuídos ao longo do cromossomo X em dois grupos de ligação: o grupo de ligação 1 (LG1) e grupo de ligação 2 (LG2). Ao longo do LG1 encontram-se oito marcadores (um gene, uma EST e seis microssatélites) estendendo-se em 125,6 cR₅₀₀₀ e, no LG2 encontram-se 25 marcadores (nove genes, três ESTs e 13 microssatélites) totalizando 336,3 cR₅₀₀₀. Desta maneira, o BBUX – RH₅₀₀₀, tem um comprimento total de 461,9 cR₅₀₀₀ e uma densidade média de 1 marcador mapeado a aproximadamente cada 14 cR₅₀₀₀.

As freqüências de retenção (*Retention Frequency* – FR) de cada marcador tipado foram calculadas a partir da razão entre o número de linhagens positivas (que apresentaram produto de PCR para determinado marcador) e linhagens negativas (ausência de produto de PCR) do painel RH. Os valores de freqüência de retenção dos marcadores ordenados no BBUX-RH₅₀₀₀ variaram de 7,8% para o gene UREB1 e 28,9% para os microssatélites INRA30, MAF45 e TGLA325, apresentando uma FR média de 15,42%. Comparando-se com as FR dos mapas dos cromossomos bubalinos 1 (BBU1) obtido por Miziara e colaboradores (2007) e, cromossomo bubalino 6 (BBU6) construído por Stafuzza e colaboradores (2007), a partir do mesmo painel RH, com as FR obtidas na construção do mapa do cromossomo X bubalino, pode-se observar uma média de FR bem menor. Tal fato é compreensível e facilmente explicável, uma vez que o painel BBURH₅₀₀₀ foi construído a partir de uma linhagem celular de um búfalo macho (XY). Deste modo, é de se esperar que

os genes específicos dos cromossomos X ou Y tenham uma média de FR bem menor que de marcadores situados nos autossomos por estarem representados em cópia única nas células utilizadas. Os marcadores localizados no BBUX com FR maiores que 20%, (XBM24, MAF45, TGLA325, INRA30, ASMTL) estão localizados na região pseudoautossômica (PAR) de boi, ou seja, possuem homólogos no cromossomo Y, apresentando por estes motivo, FR mais parecidas com aquelas observadas em marcadores localizados nos autossomos.

Levando-se em consideração que o genoma bubalino não conta com mapa de ligação, e que o mapa citogenético de búfalo (IANNUZZI et al., 2003) possui apenas um marcador em comum com o BBUX-RH₅₀₀₀ gerado neste trabalho, o mapa RH do BBUX foi comparado aos mapas RH (BovGen – JANN et al., 2006) e mapa de sequência (NCBI – *Bos taurus* build 3.1) do genoma bovino. Esta comparação torna-se viável pela extensa conservação observada entre o cromossomo X de mamíferos (PONCE DE LEON et al., 1996; MURPHY et al., 1999b; RAUDSEPP et al., 2002; 2004; QUILTER et al., 2003; RUBES et al., 2005) principalmente dentro da família Bovidae (IANNUZZI et al., 2000; AMARAL et al., 2002; CHAVES et al., 2005; IANELLA et al., 2008).

A comparação do BBUX-RH₅₀₀₀ com BTAX-RH₃₀₀₀ (JANN et al., 2006), de modo geral, revelou uma conservação da ordem dos marcadores, com exceção da identificação de duas alterações na ordem gênica, uma no LG1 e outra no LG2. Estas alterações sugerem a existência de microrearranjos nestas regiões do cromossomo X de búfalo e boi. A comparação do BBUX-RH₅₀₀₀ com o mapa de sequência do BTAX (build 3.1) revela a existência de cinco pequenas inversões na ordem gênica (três no LG1 e duas no LG2), as quais, porém, não foram observadas na comparação com BTAX-RH₃₀₀₀. Estas alterações podem representar alterações

não genuínas da ordem gênica do cromossomo X bubalino em relação ao bovino, e serem reflexo de erros de alinhamento das seqüências no mapa molecular bovino como já anteriormente mencionado por Marques e colaboradores (2007). O esclarecimento destes pontos de discordância entre os mapas poderá ser realizado com a adição de novos marcadores ao mapa do cromossomo X bubalino.

Com o objetivo de tentar gerar uma avaliação preliminar da extensão do mapa BBUX-RH₅₀₀₀ em pares de base, o primeiro e o último marcador de cada grupo de ligação do BBUX foram comparados com as posições em megabases de seus correspondentes no BTAX. No LG1, o intervalo entre o microssatélite BMS2152 (posição 10,7 cR₅₀₀₀ no BBUX) e o gene DKC1 (posição 125,6 cR₅₀₀₀) corresponde a um intervalo de 114,9 cR₅₀₀₀ e nos mapas molecular do BTAX equivale a 9,15Mb. No LG2 o intervalo entre o gene PLP1 (posição 0,0 cR₅₀₀₀ no BBUX) e o microssatélite XBM24 (posição 295,9 cR₅₀₀₀) é de 295,9 cR₅₀₀₀ correspondem a 51,9Mb no mapa molecular BTAX. Essa correspondência gerou uma correlação aproximada para LG1 e LG2 de 13,72 e 5,70 centirays (cR₅₀₀₀) por megabases (Mb), respectivamente.

Quando se compara, de modo geral, a distribuição dos marcadores do BBUX com seus correspondentes no BTAX-RH₃₀₀₀, considerando-se o primeiro (HUMM_21) e o último (ASMTL) marcadores em comum entre os dois mapas, uma cobertura de 87% pode ser estimada. A mesma comparação com o mapa molecular BTAX build 3.1, considerando-se o primeiro marcador em comum a ambos os mapas sendo o microssatélite BMS2152 e o último, BL22, resultou em uma cobertura estimada de 73%. Uma vez que se assume a extensa conservação entre os cromossomos X destas duas espécies, a partir destas estimativas, pode se observar que o primeiro mapa RH do cromossomo X de búfalo de rio alcançou uma boa cobertura deste cromossomo.

O primeiro mapa do cromossomo X de búfalo gerado por Ianella e colaboradores (2008), juntamente com outros trabalhos de mapeamento (AMARAL et al., 2007; GOLDAMMER, et al., 2007; MIZIRA et al., 2007; STAFUZZA et al., 2007) e ainda outros tipos de estudos envolvendo o genoma bubalino (VENANCIO et al., 2007) fazem parte de estratégias iniciais de inserção do búfalo na lista de espécies de interesse econômico mais bem estudadas, constituindo o ponto de partida para a construção de mapas RH de alta resolução e mapas comparativos do genoma integral, necessários para futuras manipulações do genoma bubalino com o intuito de promover melhoramento genético, seleção assistida de marcadores entre outros.

A comparação de genomas através de mapeamento comparativo tem ajudado a compreender a evolução cariotípica em vertebrados e principalmente em mamíferos. A realização da comparação dos mapas de cromossomos X de diferentes espécies de mamíferos: búfalo de rio, boi e ovelha, homem, camundongo, cavalo e cachorro evidencia a característica conservativa deste cromossomo, de acordo com Ohno (1973). Os resultados das comparações realizadas neste trabalho permitem reiterar a conservação sintênica do cromossomo X em mamíferos distantemente relacionados como búfalo e humano.

De modo geral, pode-se observar que todos os genes mapeados em búfalo pela metodologia de células híbridas irradiadas, encontram-se indicados em pelo menos uma das espécies com as quais o mapa BBUX foi comparado confirmando a alta conservação sintênica típica deste cromossomo. Esta conservação do conteúdo gênico do cromossomo X de mamífero tem sido constatada na literatura por vários estudos comparativos em mamíferos (PONCE DE LEON et al., 1996; IANNUZZI et al., 2000; RAUDSEPP et al., 2004; RUBES et al., 2005).

A premissa de que seqüências não codificantes são conservadas em espécies próximas como boi/búfalo ou boi/ovelha fundamenta a utilização de pares de *primers* heterólogos para a amplificação de microssatélites provenientes de uma espécie para amplificação de produto de PCR em outra espécie. A mesma premissa foi utilizada para justificar a análise comparativa dos genomas de ovelha e búfalo utilizando como referência seqüências não codificantes, como microssatélites, além dos marcadores do tipo genes codificantes. Desta maneira foi feita também a comparação do mapa do cromossomo X bubalino com o mapa de ligação do cromossomo X ovino, rico em microssatélites, permitindo a avaliação de um maior número de marcadores entre estas espécies da família Bovidae as quais são filogeneticamente próximas.

Pode-se observar uma conservação da ordem de todos os marcadores comuns aos mapas dos cromossomos X nestas duas espécies. Tratam-se de quatro genes e oito microssatélites com a ordem linear conservada, formando porém um bloco invertido com relação ao X bubalino. Esta inversão está de acordo com os estudos citogenéticos e de hibridização *in situ* anteriormente realizados (PONCE DE LEON et al., 1996; ROBINSON et al., 1998), que procuram descrever os rearranjos envolvidos na diferenciação morfológica do cromossomo X dentro da família Bovidae durante a sua evolução.

A comparação dos marcadores mapeados no cromossomo X bubalino utilizando o painel BBURH₅₀₀₀ (IANELLA et al., 2008) com mapas do cromossomo X de diferentes espécies de mamíferos gerou informações que confirmam a característica conservativa deste cromossomo de mamíferos. A inserção de novos marcadores no cromossomo X bubalino, bem como o mapeamento deste cromossomo em outras espécies, virão contribuir para a detecção mais precisa de

rearranjos internos que ocorreram durante a peculiar evolução deste cromossomo, e informar sobre possíveis limites de pontos de quebra evolutivos que culminaram nos diferentes rearranjos internos do conteúdo do X de mamíferos.

CONCLUSÕES



As partir do trabalho desenvolvido no presente capítulo, onde foi gerado o primeiro mapa RH do cromossomo X bubalino (BBUX-RH₅₀₀₀), foram integrados 33 marcadores, sendo eles dez gene codificantes, quatro ESTs e 19 microssatélites. As comparações entre o BBUX-RH₅₀₀₀ e os mapas mais recentes do cromossomo X bovino, BTAX-RH₃₀₀₀ e mapa molecular BTAX (Build 3.1) contribuem para reforçar a teoria da conservação do conteúdo deste cromossomo, realçando ainda algumas inconsistências e pontos de discrepâncias entre os dois mapas de boi. Na comparação entre BBUX-RH₅₀₀₀ e BTAX-RH₃₀₀₀ foram evidenciadas somente duas alterações na ordem dos marcadores, mantendo-se conservada a ordem linear dos demais, já a comparação entre BBUX-RH₅₀₀₀ e o mapa de sequência BTAX mostrou cinco alterações na ordem dos marcadores, diferentes das observadas na comparação com BTAX-RH₃₀₀₀.

Pode-se concluir que a utilização de *primers* heterólogos derivados de marcadores do cromossomo X bovino mapeamento do BBUX foi realizada com sucesso tanto para genes quanto para ESTs e microssatélites, evidenciando a grande conservação nas sequências entre as duas espécies.

A distribuição dos marcadores obtida ao longo do BBUX foi satisfatória, resultando em uma cobertura adequada para um primeiro esforço de mapeamento deste cromossomo.

O mapa comparativo do cromossomo X bubalino com outras espécies representando diferentes ordens da Classe Mammalia permite concluir que existe uma extensa conservação do conteúdo do cromossomo X mesmo entre espécies distantemente relacionadas. Grande parte deste conteúdo que apresenta sintenia conservada, mantém conservada também a ordem gênica, com exceção de algumas

posições discordantes, frutos de rearranjos internos que acompanharam a evolução deste cromossomo.

A comparação com o mapa de ligação de ovelha permitiu verificar a extensa conservação da ordem gênica nestas duas espécies pertencentes à Ordem Artiodactyla, família Bovidae, refletindo sua proximidade filogenética embora, exista a inversão de todo o bloco conservado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹



¹ Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR 6023. Rio de Janeiro, Agosto, 2002.

AGARWALA, R. et al. A fast and scalable radiation hybrid map construction and integration strategy. **Genome Research**, v. 10, p. 350-364, 2000.

ALBUQUERQUE, M. S. M. et al. Conservação e caracterização de búfalos no Brasil: uma revisão da literatura. **Documentos Embrapa**, v. 166, 2006.

AMARAL, M. E. J.; KATA, S. R.; WOMACK, J. E. A radiation hybrid map of bovine X chromosome (BTAX). **Mammalian Genome**, v. 13, p.268-271, 2002.

AMARAL, M. E. J. 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.

APPLEGATE, D. et al. On the solution of traveling salesman problems. **Documenta Mathematica**, extra volume International Congress of Mathematics III, p. 645-656. 1998.

BAND, M. R. et al. An ordered comparative map of the cattle and human genomes. **Genome Research**, v. 10, p. 1359-1368. 2000.

BARBOSA, N. Bubalinocultura no estado do Pará. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 29, p. 34-48, 2005.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 31, p. 293-298, 2007.

BORGHESE, A. **Buffalo production and research – FAO Regional Office for Europe**, REU Technical Series 67, Rome, 321p., 2005.

Bos taurus build 3.1. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9913>. Acesso: 20 de março de 2008.

BURKIN, D. J. et al. Mapping the sheep genome: production of characterized sheep X hamster cell hybrids. **Genomics**, v. 16, p. 466-472, 2003.

BURT, D. W. et al. Dynamics of chromosome evolution: clues from comparative gene mapping in birds and mammals. **Nature**, v. 402, p. 411-413, 1999.

BURT, D. W. Comparative mapping in farm animals. **Briefings in functional genomics and proteomics**, v. 2, p. 159-168, 2002.

CAETANO, A. R. et al. Comparative gene map of the horse (*Equus caballus*). **Genome Research**, v. 9, p. 1239-1249, 1999a.

CAETANO, A. R. et al. Comparative mapping of 18 equine Type I genes assigned by somatic cell hybrid analysis. **Mammalian Genome**, v. 10, p. 271-276, 1999b.

CALVO, J. H. et al. Fine mapping of genes of sheep chromosome 1 and their association with Milk traits. **Animal Genetics**, v. 37, p. 205-210, 2006.

***Canis lupus familiares* build 2.1.** Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9615>: Acesso em 21 de março de 2008.

CASAS, E. et al. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. **J Anim Sci**, v. 12, p. 141-149, 2000.

CASAS, E.; LUNSTRA, D. D.; STONE, R. T. Quantitative trait loci for male reproductive trait in beef cattle. **Animal Genetics**, v. 35, p. 451-453, 2004.

CHARLIER, C. et al. Callipage. **Genome Research**, v. 11, p. 850-862, 2001.

CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H.; HASLOP-HARRISON, J. S. Phylogenetic relationships and the primitive X chromosome inferred from chromosomal and satellite DNA analysis in Bovidae. **Proceedings of the Royal Society**, v. 272, p. 2009-2016, 2005.

CHEN, K. et al. Genetic resources, genome mapping and evolutionary genomics in the pig (*Sus scrofa*). **Int J Biol Sci** v. 3, p. 153-165, 2007.

CHOWDHARY B. P.; RAUDSEPP, T. The horse genome Derby: racing from map to whole sequence. **Chromosome Research**, v. 13, p. 742-751, 2008.

CHOWDHARY, B. P. et al. The first-generation whole-genome radiation hybrid map in the horse identifies conserved segments in humans and mouse genomes. **Genome Research**, v. 13, p. 742-751, 2003.

CHOWDHARY, B. P. et al. Construction of a 5000(rad) whole-genome radiation hybrid panel in the horse and generation of a comprehensive and comparative map for ECA11. **Mammalian Genome**, v. 13, p. 89-94, 2002.

CNPC – Conselho Nacional de Pecuária de Corte. Disponível em <<http://www.cnpc.org.br/site/noticias05.asp?ID=251>>. Acesso em: 28 de fevereiro de 2008.

COX, D. 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 Disponível em: <http://www.cpatu.embrapa.br>. Acesso em: 15 de março de 2008.

DENG, H. W. et al. A whole-genome linkage scans suggests several genome regions potentially containing QTLs underlying the variation of stature. **American Journal of Medical Genetics**, v. 113, p. 29-39, 2002.

DI MEO, G. P. et al. 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**, v. 36, p. 352-365. 2005.

DI MEO, G. P. et al. Mapping of 11 genes by FISH to BTA2, BBU2q, OAR2q and CHI2, and comparison with HSA2q. **Animal Genetics**, v. 37, p. 299-300. 2006.

DUTRILLAUX, B.; COUTURIER, J. The ancestral karyotype of carnivore – comparison with that of Platyrrhine monkeys. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 35, p. 200-208, 1983.

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, p. 221-225, 2001.

ENG, S. L.; WOMACK, J.; COCKET, N. E. Development of an ovine whole-genome radiation hybrid panel. **Plant & Animal Genome XII Conference**, p. 650, 2004.

Equus caballus build 1.1. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9796>. Acesso em: 21 de março de 2008.

FAHRENKRUG, S. C. et al. Comparative mapping of the ovine clpg locus. **Mammalian Genome**, v. 11, p. 871-876, 2000.

FAO- (Food and Agricultural Organization). Disponível em: < <http://www.fao.org/corp/statistics.html>>. Acesso em 20 de março de 2008.

FERGUSON-SMITH, M. A.; TRIFONOV, V. Mammalian karyotype evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, p. 950-962, 2007.

GABOREANU, A-M. et al. Characterization of an X-chromosome PCR-RFLP marker associated with fat deposition and growth in the pig. **Animal Genetics**, v. 35, p. 401-403, 2004.

GALLAGHER, D. S. J.; WOMACK, J. E. Chromosome conservation in the Bovidae. **Journal of Heredity**, v. 83, p. 287-297, 1992.

GALLAGHER, D. S. J. et al. A karyotype analysis of nilgai, *Baselaphus tragocamelus* (Artiodactyla: Bovidae). **Chromosome Research**, v. 6, p. 505-513, 1998.

GALLAGHER, D. S. J. et al. A molecular cytogenetics analysis of the tribe Bovini (Artiodactyla: Bovidae: Bovinae) with emphasis on sex chromosome morphology and NOR distribution. **Chromosome Research**, v. 7, p. 481-492, 1999.

GAUTIER, M. et al. Fine mapping and physical characterization of two linked quantitative trait loci affecting milk fat yield in dairy cattle on BTA26. **Genetics**, v. 172, p. 425-436, 2006.

GOLDAMMER, T. et al. A comparative radiation hybrid map of bovine chromosome 18 and homologous chromosomes in human and mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 99, p. 2106-2111. 2002.

GOLDAMMER, T. et al. Clarifications on breakpoints in HSAX and BTAX comparative mapping of F9, HPRT, and XIST in cattle. **Cytogenetics Genome Research**, v. 101, p. 39-42, 2003.

GOLDAMMER, T. et al. High-resolution comparative mapping between human chromosomes 4 and 8 and bovine chromosomes 27 provides genes and segments serving as positional candidates for udder health in cattle. **Genomics**, v. 84, p. 696-706, 2004.

GOLDAMMER, T. et al. A radiation hybrid map of river buffalo (*Bubalus bubalis*) chromosome 7 and comparative mapping to the cattle and human genomes. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 119, p. 235-241, 2007.

GOSS, S. J.; HARRIS, H. New method for mapping genes in human chromosomes. **Nature**, v. 255, p. 680-684, 1975.

GRAVES, J. A. M.; SHETTY, S. Comparative genomics of vertebrates and the evolution of sex chromosomes. In: CLARK, M. S. Comparative Genomics. Kluwer Academic, Boston, MA, pp. 153-205, 2000.

GUTIÉRREZ-GIL, B. et al. Detection of quantitative trait loci for meat quality traits in cattle. **Animal Genetics**, v. 39, p. 51-61, 2008.

HARLIZIUS, B. et al. The X chromosome harbors quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat in pigs. **Mammalian Genome**, v. 11, p. 800-802, 2000.

HAWKEN, R. J. et al. A first-generation porcine whole-genome radiation hybrid map. **Mammalian Genome**, v. 10, p. 824-830, 1999.

HAYES, C. H; PETIT, E. J. Mapping the β -lactoglobulin gene and immunoglobulin M heavy chain-like sequence to homologous cattle, sheep and goat chromosomes. **Mammalian Genome**, v. 4, p. 207-210, 1993.

Homo sapiens build 36.3. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9606>. Acesso em: 21 de março de 2008.

IANELLA, P. et al. First radiation hybrid map of the river buffalo X chromosome (BBUX) and comparison with BTAX. **Animal Genetics**, v. 39, p. 106-200, 2008.

IANNUZZI, L. et al. Standard karyotype of the river buffalo (*Bubalus bubalis* L., 2n = 50). **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 67, p. 102-113. 1994.

IANNUZZI, L.; DI MEO, G. P. Chromosomal evolution in bovids: a comparison of cattle, sheep and goat G and R-banded chromosomes and cytogenetics divergences among cattle, goat, and river buffalo sex chromosomes. **Chromosome Research**, v. 3, p. 291-299, 1995.

IANNUZZI, L. et al. Comparative FISH-mapping of villin (VIL) gene in river buffalo, sheep and goat chromosomes. **Chromosome Research**, v. 5, p. 199-202, 1997.

IANNUZZI, L. et al. Comparative FISH mapping of the bovid X chromosomes reveals homologies and divergences between the subfamilies Bovinae e Caprinae. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.89, p. 171-176, 2000.

IANNUZZI, L. et al. Comparative FISH mapping in river buffalo and sheep chromosomes: assignments of forty autosomal Type I loci from sixteen human chromosomes. **Cytogenetics Cell Genetics**, v. 94, p. 43-48, 2001.

IANNUZZI, L. 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.

IHARA, N et al. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellite. **Genome Research**, v. 14, p. 1987-1998, 2004.

ITOH, T. et al. A comprehensive radiation hybrid map of the bovine genome comprising 5593 loci. **Genomics**, v. 85, p. 413-424, 2005.

JANN, O. C. et al. A second generation hybrid map to aid the assembly of the genome sequence. **BMC Genomics**, v. 7, p. 283, 2006.

KIGUWA, S. L. et al. A horse whole-genome-radiation hybrid panel: chromosome 1 and 10 preliminary maps. **Mammalian Genome**, v. 11, p. 803-805. 2000.

KREBS, S. et al., Fine-mapping candidate gene analysis of bovine spinal muscular atrophy. **Mammalian Genome**, v. 17, p. 67-76, 2006.

KUMAR, S. et al. Phylogeography and domestication of Indian river buffalo. **BMC Evolutionary Biology**, v. 4, p. 187, 2007.

LARKIN, D. M. et. al. A cattle-human comparative map built with cattle BAC-ends and human genome sequence. **Genome Research**, v. 13, p. 1966-1972. 2003.

LALLEY, P. A. et al. Conservation of autossomal gene synteny groups in mouse and man. **Nature**, v. 274, p. 160-163, 1978.

LEE, M. A. Establishment of a pipeline to analyze non-synonymous SNPs in *Bos taurus*. **BMC Genomics**, v. 26, p. 298, 2006.

LEHRKE, R. A theory of X-linked of major intellectual traits. **Amer J Mental Deficiency**, v.76, p. 611-619, 1972.

LE PROVOST, F. et al. Cytogenetic mapping of 25 goat mammary gland Expressed Sequence Tags (ESTs). **Genet Sel Evol**, v. 32, p. 311-320, 2000.

LIU, X.; BUNGER, L.; KEIGHTLEY, P. D. Characterization of a major X-linked quantitative trait locus influencing a body weight of mice. **Journal of Heredity**, v. 92, p. 355-357, 2001.

LIU, Y. Z. et al. Confirmation linkage study in support of the X chromosome harbouring a QTL underlying human wheight variation. **Journal of Medical Genetics**, v. 40, p. 825-831, 2003.

MALEK, M. et al. A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig: I. Growth and body composition. **Mammalian Genome**, v. 12 p. 630-636, 2001.

MARGULIES, et al. NISC Comparative Sequencing Program: Identification and characterization of multi-species conserved sequences. **Genome Research**, v. 13, p. 2507-2518, 2003.

MARQUES, J. R. F. et al. Conservation of genetics resources of small populations of domestic animals of the Amazon Region in Brazil. **Animal Genetics Research Information**, v. 33, p. 31-40, 2003.

MARQUES, E. et al. A high resolution radiation hybrid map of bovine chromosome 14 identifies scaffold rearrangement in the latest bovine assembly. **BMC Genomics**, v. 8, p. 254, 2007.

McCARTHY, L. C. et al. A first-generation whole genome-radiation hybrid map spanning the mouse genome. **Genome Research**, v. 7, p. 1153-1161, 1997.

McCOARD, S.A. et al. An integrated comparative map of the X porcine chromosome. **Animal Genetics**, v. 33, p. 178-185, 2002.

McKAY, S. D. et al. Construction of bovine whole genome radiation hybrid and linkage maps using high-throughput genotyping. **Animal Genetics**, v. 38, p. 120-125, 2007.

MILAN, D. et al. Detection of quantitative trait loci for carcass composition trait in pigs. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, p.: 705-728, 2002.

MIZIARA, M. N. et al. A radiation hybrid map of river buffalo (*Bubalus bubalis*) chromosome 1 (BBU1). **Cytogenetics and Genome Research**, v. 119, p. 100-104, 2007.

MOREIRA, P.; COSTA, A. L.; VALENTIN, J. F. Comportamento produtivo e reprodutivo de bubalinos mestiços Murrah-Mediterrâneo em pastagens cultivadas em terra firme, no Estado do Acre. **Rio Branco EMBRAPA-CPAF**. p. 29 (Boletim de Pesquisa, 13), 1994.

MURPHY, W. J. et al. Development of a feline whole genome radiation hybrid panel and comparative mapping of human chromosome 12 and 22 loci. **Genomics**, v. 57, p. 1-8, 1999a.

MURPHY, W. J. et al. Extensive conservation of sex chromosome organization between cat and human revealed by parallel radiation hybrid mapping. **Genome Research**, v.9, p 1223-1230, 1999b.

MURPHY, W. J.; STANYON, R.; O'BRIEN, S. J. Evolution of mammalian genome organization inferred from comparative gene mapping. **Genome Biology**, v. 6, 2001.

MURPHY, W. J. et al. Reconstructing the genomic architecture of mammalian ancestor using multispecies comparative maps. **Human genomics**, v. 1, p. 30-40, 2003.

MURPHY, W. J. et al. Dynamics of mammalian chromosome evolution inferred from multispecies comparative maps. **Science**, v. 309, p. 613-617, 2005.

Mus musculus build 37.1. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=10090>. Acesso em: 21 de março de 2008.

NADEAU, J. H.; SANKOFF, D. Counting on comparative maps. **Trends in Genetics**, v. 14, p. 495-501, 1998.

NAKATA, L. C. et al. Assignment of the bovine PTGFR and HSD3B1 to bovine chromosome 3 with somatic and radiation hybrid panel mapping. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 114, p.94E, 2006a.

NAKATA, L. C. et al. Assignment of the subunit C of succinate dehydrogenase complex (SDHC) gene to bovine chromosome 2 with somatic and radiation hybrid panel mapping. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 114, p.93D, 2006b.

NASH, W. G.; O'BRIEN, S. J. Conserved regions of homologous G-banded chromosomes between orders in mammalian evolution: carnivores and primates. **PNAS**, v. 79, p. 6631-6635, 1982.

NCBI – Map Viewer. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9913>. Acesso em 22 de março de 2008.

O'BRIEN, S. J. Mammalian genome mapping: lessons and prospects. **Curr Opin Genet Dev**, v. 1, p. 105-111, 1991.

O'BRIEN, S. J. et al. Anchored reference loci for comparative genome mapping in mammals. **Nature Genetics**, v. 3, p. 103-112, 1993.

O'BRIEN, S. J. et al. Comparative gene mapping in the domestic cat (*Felix catus*). **Journal of Heredity**, v. 88, p. 408-414, 1997a.

O'BRIEN, S. J.; WIENBERG, J.; LYONS, L.A. Comparative genomics: lessons from cats. **Trends in Genetics**, v. 13, p. 393-399, 1997b.

O'BRIEN, S. J. et al. The promise of comparative genomics in mammals. **Science**, v.286, p. 485-481, 1999a..

O'BRIEN, S. J. et al. Comparative genomics mammalian radiation. **Science**, v. 286. Wall Chart, 1999b.

OHNO, S. Sex chromosomes and sex linked genes. **New York: Springer-Verlag.** 1967.

OHNO, S. Ancient linkage groups and frozen accidents. **Nature**, v. 244, p. 259-262, 1973.

Ovis aries linkage map v4.7 – Australian Sheep gene mapping Web Site.

Disponível em: <http://rubens.its.unimelb.edu.au/~jillm/jill.htm>>. Acesso em: 13 de março de 2007.

PERUCATTI, A. et al. Comparative FISH mapping of mucin, transmembrane (MUC1) among cattle, river buffalo, sheep and goat chromosomes: comparison between bovine chromosome 3 and human chromosome 1. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 112, p. 103-105, 2006.

PIUMI, F. et al. Comparative cytogenetic mapping reveals chromosomes rearrangements between the X chromosomes of two closely related mammalian species (cattle and goats). **Cytogenetics Cell Genetics**, v. 81, p. 36-41, 1998.

PONCE DE LEON, F. A. Development of a bovine X chromosome linkage group and painting probes to access cattle, sheep and goat X chromosome segment homologies. **PNAS**, v. 93, p. 3450-3454, 1996.

PRIAT, C. et al. A whole-genome radiation hybrid map of the dog genome. **Genomics**, v. 15, p. 61-378, 1998.

PUTNAM, N. H. et al. Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. **Science**, v. 317, p. 613-617, 2007.

Qsopt. Disponível em: <<http://www2.isye.gatech.edu/~wcook/qsopt/>>.

QUILTER, C. R. et al. A mapping and evolutionary study of porcine sex chromosome genes. **Mammalian Genome**, v. 13, p. 588-594, 2003.

RAUDSEPP, T. et al. Comparative mapping in equids: the asine X chromosome is rearranged compared to horse and Hartmann's mountain zebra. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 96, p. 206-209, 2002.

RAUDSEPP, T. et al. Exceptional conservation of horse-human gene order on X chromosome revealed by high resolution radiation hybrid mapping. **PNAS**, v. 101, p. 2386-2391, 2004.

REXROAD, C. E. **Radiation hybrid mapping of bovine chromosome one.** 1998. 125 f. Tese (Doutorado em Genética) – Texas A&M University, College Station. 1998.

REXROAD, C. E. et al. A radiation hybrid map of bovine chromosome one. **Animal Genetics**, v. 30, p. 325-332. 1999.

ROBINSON, T. J. et al. A molecular cytogenetics analysis of X-chromosome repatterning in the Bovidae: transpositions, inversions, and phylogenetic inferences. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 80, p. 179-184, 1998.

ROCHA, H. R. Possíveis associações entre polimorfismos genético-bioquímico de proteínas sanguíneas e produção de leite em búfalos (*Bubalus bubalis*). **Tese de Doutorado**, 1997.

RUBES, J. et al. Assignment of chromosomal rearrangements between X chromosomes of human and cattle by laser microdissection and ZOO-FISH. **Chromosome Research**, v. 13, p. 569-574, 2005.

SAIFI, G. M; CHANDRA, H. S. An apparent excess of sex- and reproduction-related genes on the human X chromosome. **Proc Royal Soc Lond**, v. 266, p. 203-209, 1999.

SAMPAIO NETO, J. C. Avaliação dos desempenhos produtivo e reprodutivo de um rebanho bubalino no Estado do Ceará. **Rev Bras Zootec**, v. 30, p. 368-373, 2001.

SANKOFF, D.; NADEAU, J. H. Chromosome rearrangements in evolution: From gene order to genome sequence and back. **PNAS**, v. 100, p. 11188-11189, 2003.

SCHÄFFER, A. A. et al. rh_tsp_map 3.0: End-to-end radiation hybrid mapping with improved speed and quality control. **Bioinformatics**, v. 23, p. 1156-1158, 2007.

SENO, L. O.; CARDOSO, V. L.; TONHATI, H. Valores econômicos para as características de leite de búfalas no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 2016-2022, 2007.

SEGERS, K. et al. Construction and characterization of an ovine BAC contig spanning the callipyge locus. **Animal genetics**, v. 31, p. 353-359, 2000.

SHAY, T. L. et al. Fine-mapping and construction of a bovine contig spanning the ovine callipyge locus. **Mammalian Genome**, v. 12, p. 141-149, 2001.

SNELLING, W. M. et al. A physical map of the bovine genome. **Genome Biology**, v. 8, p. R165.1-R165.17. 2007

STAFUZZA, N. B. 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.

THOMAS, J. W. et al. Comparative analyses of multi-species sequences from targeted genome regions. **Nature**, v. 424, p. 788-793, 2003.

TURNER, G. Intelligence and the X chromosome. **Lancet**, v.347, p. 1814-1815, 1996.

VALE, W. G.; RIBEIRO, H. F. L. Características reprodutivas dos bubalinos: puberdade, ciclo estral, involução uterina e atividade ovariana após o parto. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 29, p. 63-73, 2005.

VAUGHAN, T. A. **Mammology**, 2nd ed. New York: Saunders College Publishing, 1986.

VENANCIO, L. P. R. et al. Microsatellite loci isolation of river buffalo using enriched partial genomic libraries. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 338- 341, 2007.

VOORRIPS, R. E MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. **The Journal of Heredities**, v. 93, p.77-78, 2002.

WALLING, G. A. et al. Mapping of quantitative trait loci for growth and carcass traits in commercial sheep populations. **J Anim Sci**, v. 82, p. 2234-2245, 2004.

WATSON, J. M. et al. The X chromosome of monotremates share a highly conserved region with the eutherian and marsupial X chromosome despite the absence of X chromosome inactivation. **PNAS**, v. 87, p. 7125-7129, 1990.

WILLIAMS, J. L. et al. A bovine whole-genome radiation hybrid panel and outline map. **Mammalian Genome**, v. 13, p. 469-474, 2002.

WOMACK, J. E. et al. A whole genome radiation hybrid panel for bovine gene mapping. **Mammalian Genome**, v. 8, p. 854-856. 1997.

WOMACK, J. E. Advances in livestock genomics: opening the barn door. **Genome Research**, v. 15, p. 1699-1705. 2005.

WURSTER, D. H.; BENIRSCHKE, K. Chromosome studies in the superfamily Bovoidea. **Chromosoma**, v. 25, p. 152-171, 1968.

YANG, F. et al. A reappraisal of the tandem fusion theory of karyotype evolution in the Indian muntjac using chromosome painting. **Chromosome Research**, v. 5, p. 109-117, 1997.

YEH, C. C.; TAYLOR, J. F.; GALLAGHER, D. S. Genetic and physical mapping of the bovine X chromosome. **Genomics**, v. 32, p. 345-342, 1996.

YERLE, M. et al. Construction of a whole genome radiation hybrid panel for high resolution mapping in pig. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 82, p. 182-188, 1998.

YERLE, M. et al. Generation and characterization of a 12,000-rad radiation panel for fine mapping in pig. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 97, p. 219-228, 2002.

YUNIS, J. J.; SAWYER, J. R.; DUNHAM, K. The striking resemblance of high resolution G-banded chromosomes of man and chimpanzee. **Science**, v. 208, p. 1145-1148, 1980.

ANEXOS



ANEXO A

Artigo publicado na Revista

Animal Genetics

ISSN 1365 – 2052

2007

SHORT COMMUNICATION

doi:10.1111/j.1365-2052.2007.01612.x

Preliminary radiation hybrid map for river buffalo chromosome 6 and comparison to bovine chromosome 3

N. B. Stafuzza*, P. Ianella*, M. N. Miziara*, R. Agarwala[†], A. A. Schäffer[†], P. K. Riggs[‡], J. E. Womack[§] and M. E. J. Amaral*

*Department of Biologia, UNESP – São Paulo State University, IBILCE, São Jose Rio Preto, SP 15054-000, Brazil. [†]Department of Health and Human Services, National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20894, USA. [‡]Department of Animal Science, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA. [§]Department of Veterinary Pathobiology, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA.

Summary

We present the first radiation hybrid (RH) map of river buffalo (*Bubalus bubalis*) chromosome 6 (BBU6) developed with a recently constructed river buffalo whole-genome RH panel (BBURH₅₀₀₀). The preliminary map contains 33 cattle-derived markers, including 12 microsatellites, 19 coding genes and two ESTs, distributed across two linkage groups. Retention frequencies for markers ranged from 14.4% to 40.0%. Most of the marker orders within the linkage groups on BBU6 were consistent with the cattle genome sequence and RH maps. This preliminary RH map is the starting point for comparing gene order between river buffalo and cattle, presenting an opportunity for the examination of micro-rearrangements of these chromosomes. Also, resources for positional candidate cloning in river buffalo are enhanced.

Keywords river buffalo, chromosome 6, radiation hybrid mapping.

River buffalo (*Bubalus bubalis*) contributes immensely to the world agricultural economy of meat and milk production, as well as draught power. In the countries where buffalo are economically important livestock, scientific resources are limited. Consequently, genome research in this species lags behind many other domestic species (Womack 2005). Few resources exist for river buffalo, aside from rudimentary somatic cell maps (El Nahas *et al.* 1996) and cytogenetic maps (Iannuzzi *et al.* 2003).

Cytogenetic studies in river buffalo using *in situ* hybridization and somatic cell techniques (El Nahas *et al.* 2001; Iannuzzi *et al.* 2003) have identified river buffalo chromosome 6 (BBU6) as orthologous to domestic cattle (*Bos taurus*) chromosome 3 (BTA3). The most recent reports regarding river buffalo genome mapping (Iannuzzi *et al.* 2003; Di Meo *et al.* 2006) describe physical assignments for 302 loci, with the BBU6 map containing 12 loci (six genes and six microsatellites) assigned by FISH. In contrast, a recent radiation hybrid (RH) map of BTA3 includes 154

markers (Everts-van der Wind *et al.* 2005). Numerous QTL with pleiotropic effects for multiple milk production traits, such as milk yield, protein percentage, protein yield, fat percentage and fat yield (Khatkar *et al.* 2004) have been mapped to BTA3.

In this report, we present a preliminary RH map for BBU6 composed of cattle-derived markers and its comparison with BTA3 sequence and RH maps (Everts-van der Wind *et al.* 2004; 2005). It was anticipated that PCR primers for most of the BTA3 markers would amplify buffalo genomic DNA. Although some PCR amplification failures were observed, cattle PCR primers from microsatellites, ESTs and coding genes produced reliable scores, consistent with the percentage obtained by Amaral *et al.* (2007).

Markers were scored after amplification of DNA from 90 RH cell lines and control buffalo and hamster DNA by PCR in 96-well micro-titer plates using a MJ Research PTC-200 (Peltier Thermal Cycler) thermocycler with thermal gradient, as described elsewhere (Amaral *et al.* 2007). All primer sets were typed twice across the RH panel DNA and scored independently. Primer pairs that showed ambiguous results were typed a third time.

Eight of 36 markers (BMS835, NRAS, IDVGA53, BMS963, MUF1, BMS2904, BMS723 and F3) also amplified control hamster DNA. Of these, five markers (BMS835,

Address for correspondence

M. E. J. Amaral, Comparative Genomics Laboratory, Department of Biologia, UNESP – São Paulo State University, IBILCE, São Jose Rio Preto, SP 15054-000, Brazil.
E-mail: eamaral@ibilce.unesp.br

Accepted for publication 26 March 2007

2 Stafuzza et al.

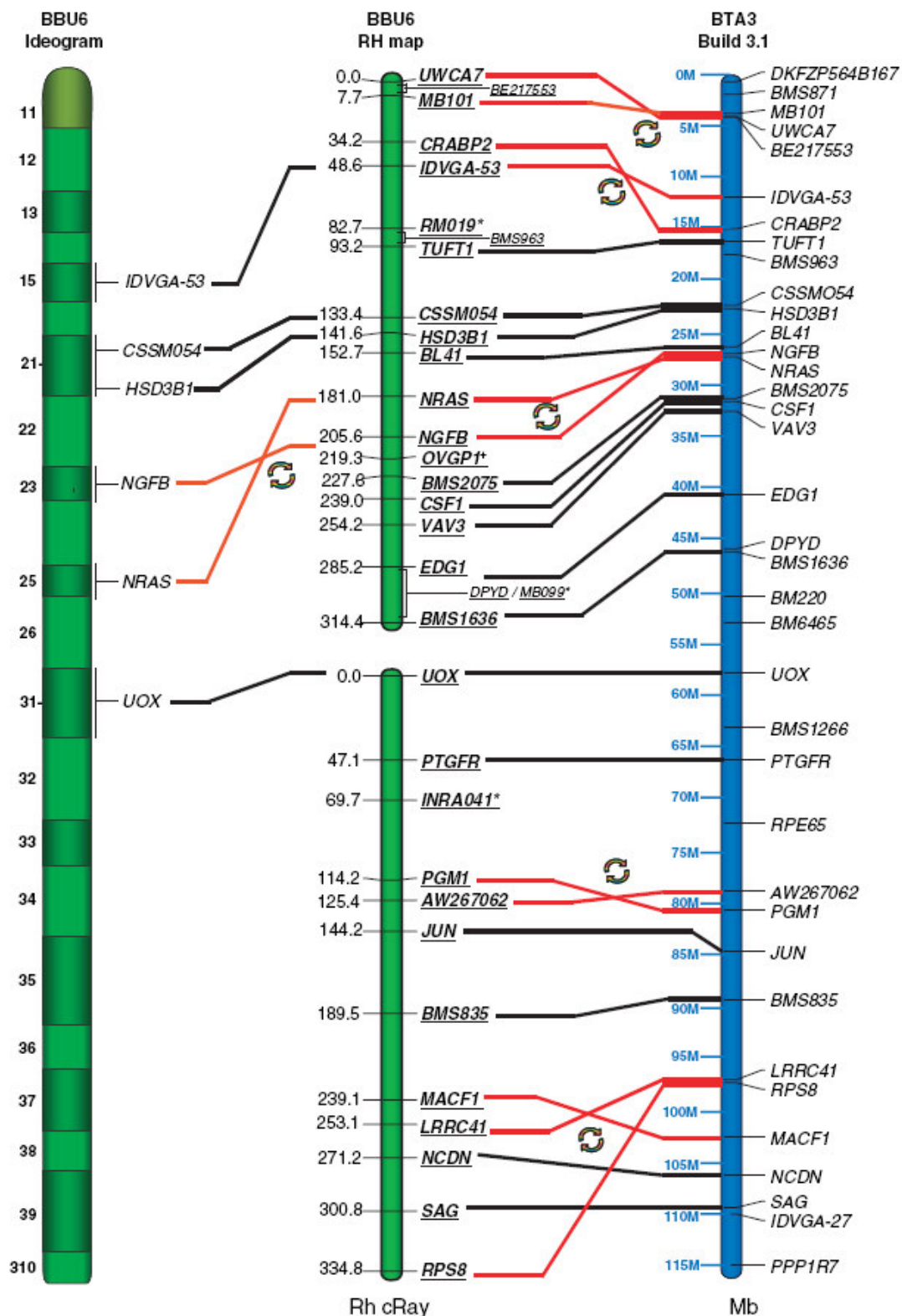


Figure 1 Comparison of the river buffalo chromosome 6 (BBU6) RH map (center) with the buffalo cytogenetic (left) and the bovine genome build 3.1 for BTA3 (right). Framework markers are bolded and have been placed at a position that was better than the next best alternative by at least 0.50 LOD. Markers common to both the BBU6 framework map and the BTA3 genome sequence are joined by a solid line. Positions in the BBU6 map are in cR_{500a}, while positions in the BTA3 map are in megabases (Mb). Solid red lines indicate markers that were inverted between the two species. Four markers on the BBU6 map are not currently assigned a Mb position on BTA3: orders for *RM019*, *MB099* and *INRA041* were in agreement with the cattle linkage map (Ihara et al. 2004) whereas the order for *OVGP1* was in agreement with the cattle RH map (Band et al. 2000).

Table 1 Cattle-derived markers from BTA3 typed on the BBURH₅₀₀₀ panel.

Marker	Type	RF (%)	Location (cR)	T _m (°C)	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	UniSTS ID	GenBank accession no. (cattle)
LG1								
UWCA7 ¹	MS	32.2	0.0	61	TGTAGCTCCTCGAGGAGAA	GCAATACAACCCAGTCTGGTG	250762	L14709
BE217553 ²	EST	33.3	Placed	50	TCTGAATCTTAACCAAAAT	CAAACCTGAGACCCTACAT	279334	BE217553
MB101 ¹	MS	32.2	7.7	65	AGCAATATCTGTATCAACCTCAGTC	CTGAGCTGGGTGGAGCTATAATA	250773	X63795
CRABP2 ³	Gene	30.0	34.2	65	AAACAGGAGGGGACACTTT	TCGTGTGTCAGTCTCTGGT	251461	NM_001008670
IDVCA-53 ^{1,4}	MS	25.5	48.6	65	ACGCGACCTCGTCACTG	GAAGCGGAAGGGCAACATGAC	X85070	X85070
RM019 ¹	MS	33.3	82.7	59	CCAGGTGCTGATATCTGAGG	TTCAATGAACAAGATGAGACTT	251183	U03049
BMS936 ¹	MS	32.2	Placed	50	GGAGATGAAGAGTCTTTGG	AATTACCAAGTCCACCC	52014	G18761
TUFT1 ²	Gene	35.5	93.2	60	GTCTCTCTCGGTGTTTGA	CGGATAAACAACATGATGGTG	279227	M64924
CSSM054 ^{1,4}	MS	30.0	133.4	63	AAACATGGAGATCAGACCTCC	TTCCAACAACCGTAGCACCTCTG	250977	U03832
HSD3B1 ^{4,5}	Gene	30.0	141.6	63	AGCACATCAAGTGGCTGG	CAGGATCCGTTGTTATCA	NM_174343	NM_174343
BL41 ¹	MS	31.1	152.7	65	CCTCTGCATCTTATTCG	AAGATCAACTTATCTCACAGTG	250736	CM000179.2
NRAS ^{2,4}	Gene	40.0	181.0	50	CTTTCATTAGGCCAAGGAGG	GAGGAGCTCAGTGAAGTTGTA	278946	AW267011
NGFB ^{2,4}	Gene	34.4	205.6	65	TTCTCGTGTGCGACAGCAT	TCCCGGCACTGGTCTCAA	278830	Y09566
OVGP2 ²	Gene	32.2	219.3	60	GGGTACTTTGGTCTTGAGACA	CTTGCGATCTTTATTCACAGC	278872	D16639
BMS2075 ¹	MS	28.9	227.6	57	TCCATTCCTGACCTGATG	AGTCATTCCCTCTTTGGG	66478	G18719
CSF1 ²	Gene	28.9	239.0	65	GCAGAGCTGAAGGAGGACA	GCACGAAGACAGGATGAT	278247	NM_174026
VAV3 ²	Gene	23.3	254.2	58	AAGGTGTCTTGGAGTGGA	TGCTCTCTGTAACAGTTGG	279251	Aw417792
EDG1 ²	Gene	15.5	285.2	51	TGGCCCTCTCAGACCTGTG	TGCGAGGAGACTGAACAGC	278327	NM_001013585
M8099 ¹	MS	15.5	Placed	65	CTGAGGTGTGTGAGCCCAATTA	CTAAGAGTGAAGGTGTGACTAGG	250771	X63794
DPYD ²	Gene	21.1	Placed	58	AAGCCAGAGTGTGACTAACC	GGCTTAACCAAGTTCATCC	278317	U20981
BMS1636 ¹	MS	18.9	314.4	65	CATTATCACTGCCCTTTGGATG	GTGTGAGTTCCTTCAGCAGC	28634	G18681
LG2								
UOX ⁴	Gene	17.8	0.0	56	CCTCAGTCATTCATCTG	ACATCTGCCCTGTGGTGA	253506	NM_001075648.1
PTGFR ⁵	Gene	23.3	47.1	65	CTGGAAAATCAGCCCTCAC	AAGAAGCCACAATCAATCCC	NM_181025	NM_181025
INRA041 ¹	MS	18.9	69.7	50	TGCAAAATCTTAAGTACTTTAA	AACATTTATGTAGTTTAAITGAAC	251127	X71559.1
PGM1 ²	Gene	18.9	114.2	62	AGAGCTGATTGGAGAGAGGCA	ACTGCAAGTGGAGGTTGACCA	278900	AW289393
AW267062 ²	EST	18.9	125.4	65	ACCTACTCAGCCTTAAGCATC	CCAGAGTACCTCTTTACCCAG	278033	AW267062
JUN ²	Gene	21.1	144.2	65	GAAGCAGACATGACCTGAAT	ATATGCCCTGTGCTGGACTGA	278588	AF069514
BMS835 ¹	MS	21.1	189.5	60	TCAATGTCATGGGTTTG	ATCTCCCTACCTGGGATC	65587	G18891
MACF1 ²	Gene	22.2	239.1	65	ATTACAGGGTACAGGAGGCA	CCAAGCCTCTCTCACTTTGAA	277920	AW289374
LRRC41 ²	Gene	22.2	253.1	50	TTACATGGTGAATGAGGCCA	AGTGTCTGTCTGCAACCGC	278799	AW461454
NCDN ²	Gene	18.9	271.2	56	AGCGCGTTGACATTCAGTT	GAAGCTCACATGGAAGAGGTT	278815	AW464751
SAG ²	Gene	16.7	300.8	61	AAGCGAGAGACAGACCA	ACGTCACTAAAGGCTAACT	J02955	J02955
RPS8 ²	Gene	14.4	334.8	55	ACAAGAACGATCAAGAAA	TGAGCTAAGACAGGAGAGAA	279402	BE217560

RF, retention frequency.

¹Ihara et al. (2004).²Everts-van der Wind et al. (2004).³Newly designed.⁴Markers with FISH assignment on buffalo chromosome 6.⁵Nakata et al. (2006).

RH mapping for BBu6 and comparison to BTA3

4 Stafuzza *et al.*

NRAS, IDVGA53, BMS963 and MUF1) were suitable for scoring because the PCR products of buffalo and hamster were resolvable. The remaining three markers were not included in the analysis.

The BBU6 RH map was constructed using rh_tsp_map (Schäffer *et al.* 2007) and CONCORDE (Applegate *et al.* 1998) linked to Qsopt (<http://www2.isye.gatech.edu/~wcook/qsopt/>). We used the maximum likelihood criterion for creating 'MLE-consensus' maps (Agarwala *et al.* 2000). In contrast to the rh_tsp_map tutorial (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/pub/agarwala/rhmapping/rh_tsp_map.tar.gz), we used a pairwise LOD score threshold of 5.0 because of the small number of markers.

A total of 33 markers were predicted to be on BBU6 based on previous assignments to BTA3. The markers were distributed in two linkage groups: LG1 included 21 markers (10 coding genes, one cattle EST and 10 microsatellites) and LG2 with 12 markers (nine coding genes, one EST and two microsatellites) (Fig. 1). Twenty-nine of the 33 markers were ordered and assigned cR positions on the MLE-consensus map and the remaining four markers were placed in bins. The map of LG1 spanned 303.2 cR and the map of LG2 spanned 334.9 cR, giving a total estimated length of 638.1 cR. The retention frequency of the mapped markers ranged from 14.4% for RPS8 to 40.0% for NRAS. Additional information about the mapped markers is given in Table 1. The positions of six markers (IDVGA-53, HSD3B1, CSSM054, NGFB, NRAS and UOX) corresponded to their cytogenetic assignment on BBU6 (Iannuzzi *et al.* 2003).

Because a linkage map does not exist for river buffalo, our BBU6 RH map results were compared with the current genome build 3.1 of BTA3. A few disagreements were observed in the order of the markers on BBU6 (Fig. 1). Also, the marker orders in the two linkage groups on BBU6 were not entirely consistent with cattle RH maps (Everts-van der Wind *et al.* 2004, 2005).

Increasing the number of genes on the BBU6 map and comparing their positions with the map locations on BTA3 will elucidate the conserved breakpoints between these two chromosomes.

Acknowledgements

This work was funded by grants from FAPESP-Brazil (02/10150-5) to MEJA and NSF-USA (OISE-0405743) to JEW. This research was supported in part by the Intramural Research Programme of the NIH, NLM.

References

- Agarwala R., Applegate D.L., Maglott D. *et al.* (2000) A fast and scalable radiation hybrid map construction and integration strategy. *Genome Research* 10, 350–64.
- Amaral M.E.J., Owens K.E., Elliott J.S., Fickey C., Schäffer A.A., Agarwala R. & Womack J.E. (2007) Construction of a river buffalo (*Bubalus bubalis*) whole-genome radiation hybrid panel and preliminary RH mapping of chromosomes 3 and 10. *Animal Genetics* 38, 311–4.
- Applegate D., Bixby R., Chvátal V. & Cook W. (1998) On the solution of traveling salesman problems. *Documenta Mathematica, Extra Volume International Congress of Mathematics* 3, 645–56.
- Band M.R., Larson J.H., Rebeiz M. *et al.* (2000) An ordered comparative map of the cattle and human genomes. *Genome Research* 10, 1359–68.
- Di Meo G.P., Gallagher D., Perucatti A. *et al.* (2006) Mapping of 11 genes by FISH to BTA2, BBU2q, OAR2q and CHI2, and comparison with HSA2q. *Animal Genetics* 37, 299–300.
- El Nahas S.M., Oraby H.A., de Hondt H.A. *et al.* (1996) Synteny mapping in river buffalo. *Mammalian Genome* 7, 831–4.
- El Nahas S.M., de Hondt H.A. & Womack J.E. (2001) Current status of the river buffalo (*Bubalus bubalis* L.) gene map. *The Journal of Heredity* 92, 221–5.
- Everts-van der Wind A., Kata S.R., Band M.R. *et al.* (2004) A 1463 gene cattle-human comparative map with anchor points defined by human genome sequence coordinates. *Genome Research* 14, 1424–37.
- Everts-van der Wind A., Larkin D.M., Green C.A. *et al.* (2005) 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* 102, 18526–31.
- Iannuzzi L., DiMeo G.P., Perucatti A. *et al.* (2003) 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* 102, 65–75.
- Ihara N., Takasuga A., Mizoshita K. *et al.* (2004) A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Research* 14, 1987–98.
- Khatkar M.S., Thomson P.C., Tammen I. & Raadsma H.W. (2004) Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. *Genetics Selection Evolution* 36, 163–90.
- Nakata L.C., Kata S.R., Womack J.E. *et al.* (2006) Assignment of the bovine PTGFR and HSD3B1 genes to bovine chromosome 3 with somatic and radiation hybrid panel mapping. *Cytogenetic and Genome Research* 114, 94E.
- Schäffer A.A., Rice E.S., Cook W. & Agarwala R. (2007) rh_tsp_map 3.0: end-to-end radiation hybrid mapping with improved speed and quality control. *Bioinformatics* 23, 1156–8.
- Womack J.E. (2005) Advances in livestock genomics: opening the barn door. *Genome Research* 15, 1699–705.

ANEXO B

***Artigo publicado na Revista
Cytogenetics and Genome Research
SSN 1365 – 2052
2007***

Original Article

Cytogenet Genome Res 119:100–104 (2007)
DOI: 10.1159/000109625

Cytogenetic and
Genome Research

A radiation hybrid map of river buffalo (*Bubalus bubalis*) chromosome 1 (BBU1)

M.N. Miziara^a T. Goldammer^b N.B. Stafuzza^a P. Ianella^a R. Agarwala^c
A.A. Schäffer^c J.S. Elliott^e P.K. Riggs^d J.E. Womack^e M.E.J. Amaral^a

^aDepartamento Biologia, UNESP – São Paulo State University, IBILCE, São Jose Rio Preto, SP (Brazil)

^bResearch Unit Molecular Biology, Research Institute for the Biology of Farm Animals (FBN),

Dummerstorf (Germany); ^cDepartment of Health and Human Services, National Center for

Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD, Departments of ^dAnimal Science and

^eVeterinary Pathobiology, Texas A&M University, College Station, TX (USA)

Manuscript received 16 March 2007; accepted in revised form for publication by K. Reed, 27 April 2007.

Abstract. The largest chromosome in the river buffalo karyotype, BBU1, is a submetacentric chromosome with reported homology between BBU1q and bovine chromosome 1 and between BBU1p and BTA27. We present the first radiation hybrid map of this chromosome containing 69 cattle derived markers including 48 coding genes, 17 microsatellites and four ESTs distributed in two linkage groups spanning a total length of 1330.1 cR₅₀₀₀. The RH map was constructed based on analysis of a recently developed

river buffalo-hamster whole genome radiation hybrid (BBURH₅₀₀₀) panel. The retention frequency of individual markers across the panel ranged from 17.8 to 52.2%. With few exceptions, the order of markers within linkage groups is identical to the order established for corresponding cattle RH maps. The BBU1 map provides a starting point for comparison of gene order rearrangements between river buffalo chromosome 1 and its bovine homologs.

Copyright © 2007 S. Karger AG, Basel

As livestock, the river buffalo (*Bubalus bubalis*) plays an important role in the livestock world economy by contributing high quality milk and meat for human consumption. Despite its economic importance, the river buffalo genome is not as intensively studied as other livestock species, such as domestic cattle. Thus, genome mapping of river buffalo remains important for identification of genes affecting economic traits.

The karyotypes of buffalo and domestic cattle appear very similar at the level of chromosome arms. While the cattle genome consists of 29 acrocentric autosomes and a pair of sex chromosomes (X/Y), the river buffalo genome has five biarmed and 19 acrocentric autosomes plus the X and Y chromosomes. According to previous studies and this latest map, all buffalo chromosome arms have homology to single bovine acrocentric chromosomes. Buffalo (BBU) chromosome 1 appears to be a fusion of *Bos taurus* (BTA) chromosome 1 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 (El Nahas et al., 1996, 2001; Iannuzzi et al., 2003). All the other chromosomes have a one-to-one correspondence between the two species. Assignment of genes to these buffalo chromosomes to date is consistent with the cytogenetic prediction.

This work was funded by grants from FAPESP-Brazil (02/10150-5) to M.E.J.A. and NSF-USA (OISE-0405743) to J.E.W. This research was supported in part by the Intramural Research Program of the NIH, NLM.

Request reprints from M. Elisabete J. Amaral
UNESP – São Paulo State University, IBILCE, Dept. Biologia
São José do Rio Preto, SP, 15054-000 (Brazil)
telephone: +55-17-3221-2407; fax: +55-17-3221-2390
e-mail: eamaral@ibilce.unesp.br

Recent reports regarding the river buffalo genome mapping (Iannuzzi et al., 2003; Di Meo et al., 2006) describe a total of 302 loci (180 of type I and 122 of type II) physically assigned to its genome. Of the 302 loci, 256 were mapped by in situ hybridization (254 by FISH), 15 by both FISH and somatic cell hybrid analysis and 33 by using only somatic cell hybrid analysis. BBU1, the largest of the five biarmed chromosomes in the river buffalo genome, has only 13 genes and 10 microsatellites assigned by FISH or somatic cell panel mapping (Iannuzzi et al., 2003; Di Meo et al., 2006). In contrast, the third generation bovine RH map includes 67 markers and 175 markers assigned to BTA27 and to BTA1, respectively (Everts-van der Wind et al., 2005). BTA27 is known to contain economic trait loci (ETLs) influencing clinical mastitis (Goldammer et al., 2004) and both bovine chromosomes contain quantitative trait loci (QTLs) affecting milk yield as well as milk fat and protein content (Polineni et al., 2006).

Taking advantage of buffalo-bovine homologies and the extensive resources now available as a result of the bovine genome sequencing project, the goal of this study was to construct the first radiation hybrid (RH) map of BBU1 by utilizing markers chosen from BTA1 and BTA27.

Materials and methods

Sixty-nine markers (including coding genes, ESTs and microsatellites) identified on BTA1 and BTA27 from the previous publications were typed on the RH panel as described elsewhere (Amaral et al., 2007). Most of these markers appeared on at least one of the genome-wide linkage and RH maps (Everts-van der Wind et al., 2004, 2005; Ihara et al., 2004); the original source for each marker is listed in Table 1.

Briefly, PCR reactions were performed in a MJ Research PTC-200 thermocycler with a thermal gradient software. The markers were scored after amplification of DNA from the 90 radiation hybrid cell lines and control buffalo and hamster DNA. PCR mixtures included: 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8.3 (20°C), 10 mM dNTPs, 0.2 mM each primer, 0.5 unit of AmpliTaq Gold polymerase (PerkinElmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and 50 ng DNA in a 10 µl-volume. The PCR conditions were as follows: initial denaturation at 94°C for 10 min, followed by 35 cycles at 94°C for 30 s (denaturation), 50 to 65°C for 30 s (annealing), extension at 72°C for 30 s and a final extension at 72°C for 7 min.

The PCR products were electrophoresed through 2% agarose gels in 1× TBE buffer containing ethidium bromide and photographed under UV light. PCR products were scored as 1 for present, 0 for absent or 2 for ambiguous amplification. All primer sets were typed twice with the RH panel DNA and scored independently in order to increase the accuracy of the results. Primer pairs that showed ambiguous results were typed a third time.

The BBU1 RH map construction was performed by using the software *rh_tsp_map*, version 3.0 (Schäffer et al., 2007) and CONCORDE (Applegate et al., 1998) linked to QSOPT (<http://www2.isye.gatech.edu/~wcook/qsopt/>). We used the maximum likelihood criterion and our framework maps are called 'MLE-consensus' maps because the markers are chosen so that the optimal order is the same for three variants of the MLE criterion that differ in the treatment of uncertain (coded as 2) entries in the RH vectors (Agarwala et al., 2000). The software distribution of *rh_tsp_map* tutorial (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/pub/agarwala/rhmapping/rh_tsp_map.tar.gz) includes a tutorial describing the steps that can be used to construct a map for markers typed on a single or multiple panels. For the construction of the BBU1 map, we followed all

the steps from 'Preparing files' through 'Placing additional markers' for making a map, but we did not continue to assign cR-positions to the placed markers because this is a coarse map. Considering the number of markers, linkage groups were made using a pairwise LOD score threshold of 5.5.

Results and discussion

The newly constructed BBU1 RH map (Fig. 1) contained markers distributed within two linkage groups. Linkage group 1 (LG1; spanning 1118.9 cR) included a total of 58 markers (39 coding genes, 15 microsatellites and four ESTs) spanning the entire short arm and extending across much of the long arm, with 47 markers placed as framework and eleven markers placed in bins. The second linkage group (LG2; spanning 211.2 cR) included eleven markers (nine coding genes and two microsatellites) covering the remaining portion of the BBU1 long arm with nine framework markers and two placed in bins.

Of the 69 markers typed on the river buffalo-hamster whole genome radiation hybrid (BBURH₅₀₀₀) panel, *APOD* and *PPP1R2* had the same RH vector and were placed at the same position. Retention frequencies (RF) for all mapped markers ranged from 17.8% (SR140) to 52.2% (BM6438). Additional information about mapped markers including their RF and cR-position on the map is compiled in Table 1.

Because no other river buffalo linkage maps are currently available, we compared the mapped order of the markers from this new BBU1 RH map to the current bovine genome assembly (build 3.1) of chromosomes BTA1 and BTA27. The markers *SLC25A4*, *PLAT*, *BM6526*, *DEFB1*, *KRTAP8*, *SOD1*, *AHSG* from LG1 and the markers *NCK1* and *CRYAA* from LG2 were also compared to their positions previously assigned by FISH (Iannuzzi et al., 2003), serving as anchor markers for the BBU1 RH map. As indicated in Fig. 1, eleven inversions of gene order were observed, including one disagreement with the order of FISH assigned markers and one inversion not supported by the map in Everts-van der Wind et al. (2005).

This first RH map from BBU1, including 48 coding genes and four ESTs, is the starting point for the construction of a high resolution comparative map for this river buffalo chromosome. With our data we were able to generate a large linkage group (LG1) including markers from both bovine homologs (BTA27 and BTA1) spanning most of BBU1. The number of observed disagreements in the gene order among our RH map 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.

Table 1. Cattle-derived markers mapped to BBU1 based on the BBURH₅₀₀₀ panel, along with their retention frequencies (RF), distances on the RH map, PCR primer sequences, annealing temperatures, GenBank Accessions and UniSTS ID

Marker*	Type*	RF (%)	Marker position cR	Foward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')	GenBank Accession	Ref./ UNISTS ID	Tm (°C)
BBU1 linkage group LG1								
SH2D4A	gene	30.0	placed	TGCTGAAACAGATCCTGTGCG	GGACTCCTGTTTTCCATCG	XM_582664	§	58
PLAT	gene	32.2	0.0	AGACTTTGTCTGCCAGTGCC	CTCTCTGCCGTGCTCCAC	X85800	251598	65
HOOK3	gene	30.0	placed	CTAGGGCAGCAGATCAATGAC	CAGCACAGCCTAAAATGAGC	XM_602978	§	60
THAP1	gene	28.8	placed	AGAAGCTGAAGGAGGTGGTG	CACGCTGGGACTTCGACTAT	NM_001034648	§	58
ADAM2	gene	28.8	20.5	CTCTGCACTCCAGCACCATA	GGGCAATGGCATTGTGAAT	NM_174228	§	58
BRF2	gene	31.1	44.6	TGAGCTCGTGGAGACTCG	CGTCACTGAAAGTGCTGTA	NM_001015582	§	58
CSSM036	MS	34.4	52.4	GGATAACTCAACCAACGCTCTCTG	AAGAACTACTGTTGCCAATCGTG	U03827	250971	65
INRA134	MS	34.4	placed	CCAGGTGGGAATAATGTCTCC	TTGGGAGCCTGTGGTTTATC	X73125	250829	59
WRN	gene	35.5	90.8	AACGCCATATATAGCAAGAC	GATCCAAAACAAGCAAGAA	BE217410	279411	56
DCTN6	gene	32.2	113.4	CGTATGTGGGCAGAAATGTG	GCAGGCAGTCTCCACCATAG	NW_930571	§	58
NRG1	gene	27.7	121.8	ACGGAAAAAGCTTCATGACC	ACCAGCTGCACGTTCTCG	XM_592564	§	58
C8orf79	EST	33.3	139.0	TCTGAAAGTGAACAGCCAGGT	TGAGAGGGTTTGCGTTATG	AW632623	§	58
CNOT7	gene	38.8	167.5	CCACCCAGTTACAGCATTGA	GGAATATGTACCAGACCAGAG	AW289341	278215	64
RM209	MS	33.3	186.4	GTAGAAGTTAGTGACTGTCAATCC	CCTCAGAGCCCCATACATTTCC	U32921	250931	65
MTNR1A	gene	34.4	placed	TTTCAACAGCTGCCTCAATG	GGAGAGGGTTTGCGTTTAAAT	U73327	278796	61
SLC25A4	gene	34.4	199.6	CATTGATTGCGTGGTGAGAA	ATAATGATGCCCTGGACCGA	M24102	a	65
BM1856	MS	38.8	215.2	GGCCTCAAGTTTCATCCATG	CATCAGCATGAAGCAACCC	G18402	53060	65
ODZ3	gene	33.3	233.8	TGACCAACGTGACATTTCCA	TTGAACCATGGTGTAGAACGA	XM_865074	§	58
CARF	gene	27.7	257.5	AGCACTGCCTCTCAGGTGAC	CGATCCACTTTGTTGTCTGG	XM_590926	§	58
DEFB1	gene	30.0	285.4	GGAAGACAGGAAGGCTCTGG	CCTCACGTTTTGAGAACAC	NW_001501821	251704	64
BM6526	MS	37.7	317.3	CATGCCAAACAATATCCAGC	TGAAGGTAGAGAGCAAGCAGC	G18454	28213	65
TGLA179	MS	40.0	placed	CTTTAATCAGCACACAGCTTCCCA	ATATGTGCTAGAAGTTTGGTCAACC	CM000203	251232	65
BMS1001	MS	42.2	327.1	GAGCCAAATTCCTACAATCTCT	AGACATGGCTGAAATGACTGA	G18605	44386	65
DLGAP2	gene	42.2	359.4	CGGACCTCCATCCACTCC	CGTCCTGCTGTCATAGTGG	XM_600714	§	58
CLN8	gene	46.6	369.0	CCCTTCATGTGTCCAATGC	ATCCAGGAGATGCAGGTGAA	XM_609353	§	58
IFNAR1	gene	37.7	441.6	TGAAGATAAGGCAATATAC	TGAAGAGTTTTTCCAGATAA	BE217555	279374	54
AW267109	EST	45.5	462.7	ATGAAAGTCTTCTGTGCCATGC	TCAGTATTGCCATGACATGC	AW267109	278038	60
IFNGR2	gene	51.1	472.2	AGACAAAGGCACAGCATTCCAC	GATTTCAAAGGGAGAGCTGGGT	AW289292	278555	60
BM6438	MS	52.2	placed	TTGAGCACAGACACAGACTGG	ACTGAATGCCCTCCTTTGTGC	G18435	79562	63
ADAMTS1	gene	45.5	placed	CGACACAAGAGAGGAAAGATGG	CATCACTTTACCCCTGCTATG	AW428596	277932	60
C21orf45	EST	47.7	placed	CCACCAAGGAAATCCAGCATAC	TATCCAAAGTCACTCCAGGTCA	AW463565	278143	60
KRTAP8	gene	46.6	503.2	TTGCTGAAATACCAGAGGCA	ATGACAAGAGTCATGAGCATGG	XM_001250875	b	59
TGLA49	MS	50.0	520.3	GGCAGGACTTCACTCTTTTCA	AGAAAAGGAATAATGAGACAGATTA	CM000177	239049	56
SOD1	gene	35.5	546.7	GTTTGGCCTGTGGTGTAATTGGAA	GGCCAAAATACAGAGATGAATGAA	NM_174615	c	56
PRSS7	gene	34.4	619.0	CCAAGGTTACAGAGTGGAT	GGCTGTGACATGAGCTTAC	U09859	278971	65
RM095	MS	41.1	637.5	TCCATGGGGTCGCAACAGTGG	ATCCCTCCATTTGTTGTGGAGTT	U32918	250928	58
STCH5	gene	38.8	652.8	TGATCTTCAGAACACGTCATAC	GTGAATGAATTTTGGTGTGAG	AW267080	279153	56
ROBO2	gene	27.7	placed	GAATTGGCTGTGATCTG	ACCTTTGTCTGATCAGG	AW653888	279030	50
POU1F1	gene	34.4	710.1	GGCTGAAAGAACTAAACCTGGAG	TAGGAGAGCCTATCTGCATTG	X12657	278932	52
PROS1	gene	30.0	730.1	GTACAGGTGGATTGGATGAAG	GAGAGCAACAGAGGTAAGAACA	X12891	278968	52
ESDN	gene	26.6	744.5	ATTGGGCTAGACCGTGCATA	GGAACAGCACAGTTAAAGG	AW314878	278348	65
DOC1	gene	33.3	761.6	TTCAACCAAGACAAGTTGCAG	CCCTTCCTTATCCCGTTTAT	AW289233	278315	58
ALCAM	gene	28.8	placed	CTGGAGAGCAGAACATGGGAAA	TATCCAGGACTGATCCACTGA	X73801	277962	65
TGLA57	MS	30.0	802.2	GCTTTTAACTCCTCAGCTTGCTG	GCTTCCAAAACCTTTACAATATGTAT	CM000177	250987	56
BBX	gene	34.4	812.9	CCAGTGAAGCGCCTTTAAT	ACCACATGGACTCACTAGCATC	AW428450	278098	65
LOC151584	EST	30.0	823.6	ACCAATGCTGCTGTCAACT	ACTCCAGGCCTGCAATGAAT	AW352867	278663	65
TACTILE	gene	20.0	849.5	TTGTAGACTGCACTGGTGGAAAC	GGAGTCCATTGGAAGTGATCTG	AW289280	279172	65
BMS527	MS	25.5	904.2	TCAGTGAAGGCAAGAGAAATATCC	TCCATTCCCTTTGAATATCCC	G18871	65219	60
BM1312	MS	30.0	921.8	CCATGTGCTGCAACTCTGAC	GGAATGTTACTGAACCTCTCCG	G18434	30885	54
BMS4030	MS	30.0	938.8	TGTACCCCAACACAGGAGCAC	TGACAGAGGGACCCATATCC	G19083	74568	65
CASR	gene	23.3	964.3	CGGTGTGCTTCTGTGGTTAGGT	CAGGTGTCTGCAAAGTTCAGG	S67307	278154	65
PDIR	gene	24.4	983.6	AACGTGTGTTTGGCGGAGAATAC	GAAAGTTGACCTGAGTGCAAAAG	AW289373	278896	64
TRAD	gene	30.0	1004.7	GCGAGGAAAGGATAAAATC	ACATTTTCCAGTTCACC	AW353439	279211	62
APOD	gene	26.6	1025.4	GAAGATCCCAAGTGAGCTTTG	ATCAGCTCTCAGCTCCTTGT	AW357610	277980	51
PPP1R2	gene	26.6	1025.4	GCATCACTGCTGAATTTGAGAC	GTCAGTGTTCAGTTCTAGCCAA	AW315482	278944	64
BM6506	MS	26.6	1057.4	GCACGTGGTAAAGGATGGC	AGCAACTTGAGCATGGCAC	G18455	47201	63
AHSG	gene	27.7	1065.9	GTCCCAACTTCTCATCTTCCA	GGCAAGAGCACCTTTCAAAGTC	X16577	277947	60
TLOC1	gene	20.0	1118.9	CATAGCAGTTCTCCTGATCTGA	GTGATCTTTCTACAGCAGCTTC	AW289224	279200	65
BBU1 linkage group LG2								
IL12A	gene	22.2	placed	AAAGTCAAGCTCTGCATCCT	GTTATGAGAGACCTCAGCATTC	U14416	278561	58
SR140	gene	17.8	0.0	TACTACTGCCAGCAGATCCA	CTGCATCTGTAGACCTGTTG	AW289396	279143	58
RNF7	gene	24.4	39.6	CCTGTTCCCTGGTCCAAACTTA	GGAGTTATTGAAGCGGTTCCGT	AW428600	279028	65
FOX12	gene	25.5	63.0	TCCTCCGGACGACACACTACAA	GAAATGTGAAACCCGGCAGCAG	AW267121	278443	65
CSSM019	MS	23.3	placed	TTGTACAGCACTTCTGTATCTTT	TGTTTAAAGCCACCCAAATTTTG	U03794	251074	59
NCK1	gene	25.5	75.6	CGCTCTTCTCTGCTTCTAA	TGCAGAAGTAACTAAGGTGG	AW425735	278818	58
MX1	gene	20.0	109.2	CCGTAGTCTCTGCTGTCTCTTA	GGAATGACCTTCTACAGTGCT	U88329	278800	65
CRYAA	gene	27.7	134.1	CCTAGAAAGTGGGCGCATCAT	GGTCACTCTGAGGCTCTTTGCA	NM_174289	c	64
HLC5	gene	27.7	152.7	TGAGCAGTGGCTGCGTTTAT	AACAGCTTCTCCTCCGTGAATC	AW354578	278525	61
CBR1	gene	22.2	168.9	CCCTGAAGTGCAGCAGAAATTG	CCCGTTCTTTGTGTCTTCCA	AW461769	278157	61
BMS2263	MS	23.3	211.2	AACCCAGTCAACCGAGAAAG	CACCCAGCGCATCACTTC	G18934	2985	65

* Genes from chromosome BTA27 are in italics, genes from chromosome BTA1 are in normal. * MS – Microsatellite, EST – Expressed Sequence Tag. § New designed primers from known cattle ESTs. a Li and Womack, 1997; b Harlizius et al., 1997; c Barendse et al., 1994.

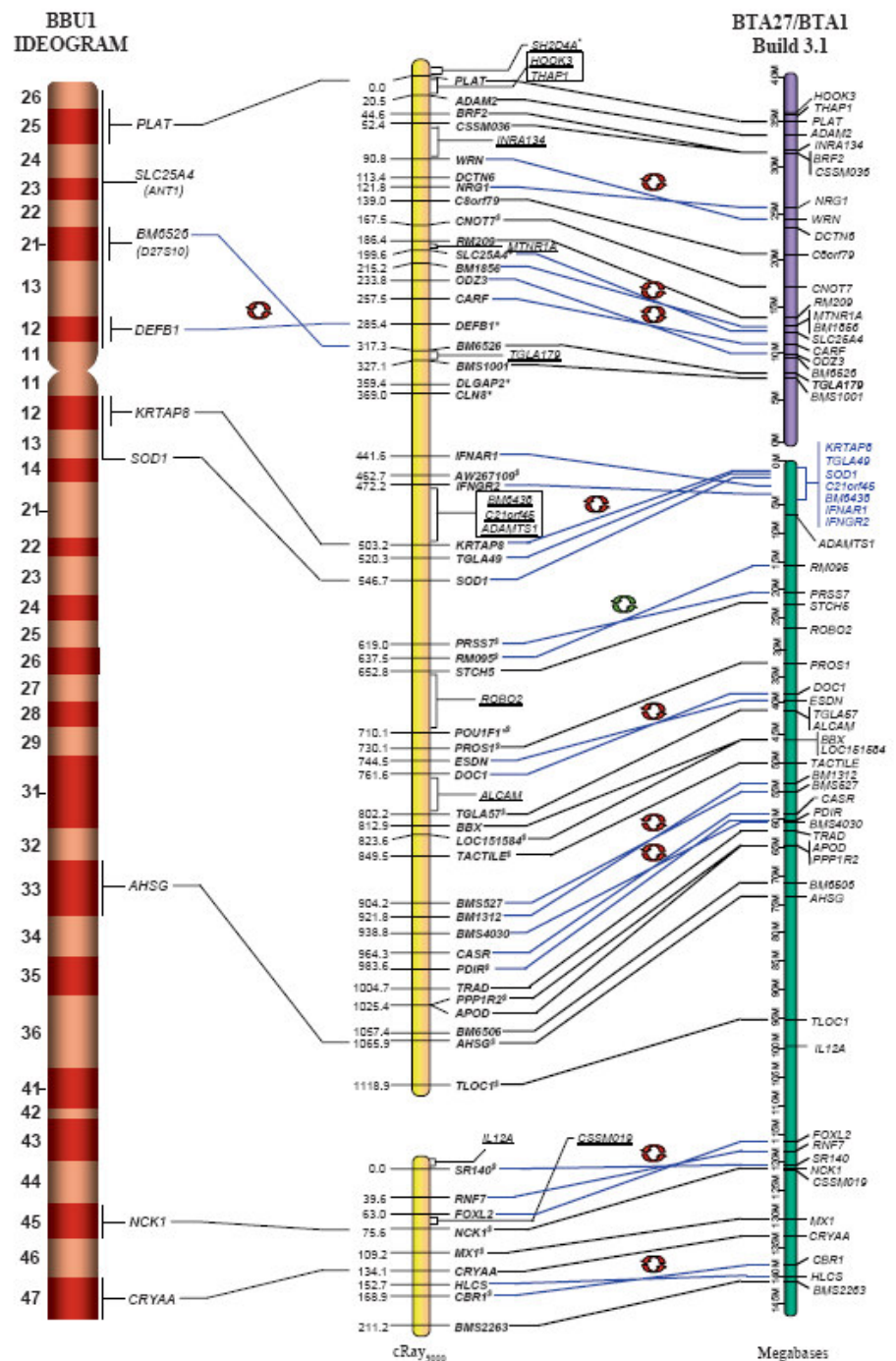


Fig. 1. Comparison of BBU1 RH map (centre) with bubaline cytogenetic map (left) and cattle genome build 3.1 for BTA1 and BTA27 (right). The framework markers, whose order is better than the second best at least 0.50 LOD units, are in bold font. Placed markers assigned to the same MLE-consensus map interval are shown in boxes. Markers common to both BBU and BTA maps are joined by a solid line. A black line joins those markers on the BBU1 RH-map that have been physically mapped by FISH to their location on the ideogram (Iannuzzi et al., 2003). Blue lines indicate markers on the BBU1 RH-map with inverted order regarding the cattle maps and the river buffalo cytogenetic map. Comparison of *SLC25A4* on the cytogenetic map with RH map is not shown as this marker is not localized to a band on 1p. The highlighted interval (4 Mb) of BTA1 map indicates the gene order based on Drögemüller et al. (2005) and Wunderlich et al. (2006). *: *SH2D4A*, *DEFB*, *DLGAP2*, *CLN8*, and *POU1F1* are assigned to contigs unplaced on BTA build 3.1. †: Eighteen markers on RH MLE-consensus map and on the map of Everts-van der Wind et al. (2005) have a consistent marker order between the two maps. Since the map of Everts-van der Wind et al. (2005) supports the marker order of RH map for *PRSS7* and *RM095*, inversion for this pair with BTA 3.1 build is shown in green.

References

- Agarwala R, Applegate DL, Maglott D, Schuler GD, Schäffer AA: A fast and scalable radiation hybrid map construction and integration strategy. *Genome Res* 10:350–364 (2000).
- Amaral MEJ, Owens KE, Elliott JS, Fickey C, Agarwala R, et al: Construction of a river buffalo (*Bubalus bubalis*) whole-genome radiation hybrid panel and preliminary RH mapping of chromosomes 3 and 10. *Anim Genet* 38:311–31 (2007).
- Applegate D, Bixby R, Chvátal V, Cook W: The traveling salesman problem: A computational study (Princeton University Press, Princeton 2006).
- Barendse W, Armitage SM, Kossarek LM, Shalom A, Kirkpatrick BW, et al: A genetic linkage map of the bovine genome. *Nat Genet* 6:227–235 (1994).
- Di Meo GP, Gallagher D, Perucatti A, Wu X, Incarnato D, et al: Mapping of 11 genes by FISH to BTA2, BBU2q, OAR2q and CHI2, and comparison with HSA2q. *Anim Genet* 37:299–300 (2006).
- Drögemüller C, Wöhlke A, Leeb T, Distl O: A 4 Mb high resolution BAC contig on bovine chromosome 1q12 and comparative analysis with human chromosome 21q22. *Comp Func Genomics* 6:194–203 (2005).

- El Nahas SM, Oraby HA, de Hondt HA, Medhat AM, Zahran MM, et al: Synteny mapping in river buffalo. *Mamm Genome* 7:831–834 (1996).
- El Nahas SM, de Hondt HA, Womack JE: Current status of the river buffalo (*Bubalus bubalis* L.) gene map. *J Hered* 92:221–225 (2001).
- Everts-van der Wind A, Kata SR, Band MR, Rebeiz M, Larkin DM, et al: A 1463 gene cattle-human comparative map with anchor points defined by human genome sequence coordinates. *Genome Res* 14:1424–1437 (2004).
- Everts-van der Wind A, Larkin DM, Green CA, Elliott JS, Olmstead CA, et al: A high-resolution whole-genome cattle-human comparative map reveals details of mammalian chromosome evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:18526–18531 (2005).
- Goldammer T, Kata SR, Brunner RM, Kühn C, Weikard R, et al: High-resolution comparative mapping between human chromosomes 4 and 8 and bovine chromosome 27 provides genes and segments serving as positional candidates for udder health in cattle. *Genomics* 84:696–706 (2004).
- Harlizius B, Tammen I, Eichler K, Eggen A, Hetzel DJS: New markers on bovine chromosome 1 are closely linked to the polled gene in Simmental and Pinzgauer cattle. *Mamm Genome* 8: 55–257 (1997).
- Iannuzzi L, Di Meo GP, Perucatti A, Schibler L, Incarnato D, et al: The river buffalo (*Bubalus bubalis*, 2n=50) cytogenetic map: assignment of 64 loci by fluorescence in situ hybridization and R-banding. *Cytogenet Genome Res* 102:65–75 (2003).
- Ihara N, Takasuga A, Mizoshita K, Takeda H, Sugimoto M, et al: A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Res* 14:1987–1998 (2004).
- Li L, Womack JE: Somatic cell mapping of the adenine nucleotide translocator gene family in cattle. *Mamm Genome* 8:773–774 (1997).
- Polineni P, Aragonda P, Xavier SR, Furuta R, Adelson DL: The bovine QTL viewer: a web accessible database of bovine Quantitative Trait Loci. *BMC Bioinformatics* 7:283 (2006).
- Schäffer AA, Rice ES, Cook W, Agarwala R: rh_tsp_map 3.0: End-to-end radiation hybrid mapping with improved speed and quality control. *Bioinformatics* 23:1156–1158 (2007).
- Wunderlich KR, Abbey CA, Clayton DR, Song Y, Schein JE, et al: A 2.5-Mb contig constructed from Angus, Longhorn and horned Hereford DNA spanning the polled interval on bovine chromosome 1. *Anim Genet* 37:592–594 (2006).