

Construção de um mapa comparativo preliminar do cromossomo 6 do búfalo de rio (*Bubalus bubalis*) utilizando um painel de células somáticas híbridas irradiadas

Nedenia Bonvino Stafuzza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre.

Construção de um mapa comparativo preliminar do cromossomo 6 do búfalo de rio (*Bubalus bubalis*) utilizando um painel de células somáticas híbridas irradiadas

Nedenia Bonvino Stafuzza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof^ª Dr^ª M. Elisabete J. Amaral

Stafuzza, Nedenia Bonvino.

Construção de um mapa comparativo preliminar do cromossomo 6 do búfalo de rio (*Bubalus bubalis*) utilizando um painel de células somáticas híbridas irradiadas / Nedenia Bonvino Stafuzza. - São José do Rio Preto : [s.n], 2007.

53 f. : il ; 30 cm.

Orientador: Maria Elisabete Jorge Amaral

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética animal. 2. Mapeamento cromossômico. 3. Cromossomo 6. 4. Búfalo de rio – Genética molecular. I. Amaral, Maria Elisabete Jorge. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 575.116.4

NEDENIA BONVINO STAFUZZA

**CONSTRUÇÃO DE UM MAPA COMPARATIVO PRELIMINAR DO CROMOSSOMO 6 DO
BÚFALO DE RIO (*BUBALUS BUBALIS*) UTILIZANDO UM PAINEL DE CÉLULAS SOMÁTICAS
HÍBRIDAS IRRADIADAS.**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Profa. Dra. M. Elisabete Jorge Amaral

2º Examinador: Profa. Dra. Eliana Morielle Versute

3º Examinador: Prof. Dr. Humberto Tonhati

São José do Rio Preto, 27/Fevereiro/2007.

“À minha mãe, por ter deixado de realizar seus sonhos para que eu pudesse tornar os meus uma realidade. Sem você eu não teria conseguido”.

Agradecimentos

A elaboração de uma dissertação de mestrado é um produto coletivo. Várias pessoas contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho chegasse a bom termo. A todas elas registro minha eterna gratidão.

Especialmente à minha orientadora Elisabete por ter me dado a chance de aprender a trabalhar com pesquisa, me ensinado a seguir os caminhos da Ciência sempre com ética e discernimento, tudo o que sei devo à ela. Agradeço sua disponibilidade irrestrita, sua forma exigente, crítica e criativa de argüir as idéias, dando norte a este trabalho e facilitando o alcance dos objetivos. Obrigada por sua compreensão, por sua amizade, pela alegria de trabalhar ao seu lado. Obrigada principalmente pela confiança depositada.

Aos membros da banca examinadora Profa. Dra. Eliana Morielle Versute e Prof. Dr. Humberto Tonhati pela contribuição signitifactiva fornecida à esse trabalho.

À CNPq por ter me concedido uma bolsa de mestrado para que esse projeto pudesse ser realizado com dedicação. Portanto, deixo aqui expresso os meus agradecimentos.

Ao Luciano, meu eterno namorado, por seu carinho, respeito, amor e confiança. Obrigada pela compreensão silenciosa dos momentos difíceis pelos quais passei, permitindo que meu tempo fluísse, respeitosamente. Você me ensinou a acreditar mais nos outros e em mim, me incentivando sempre a correr atrás dos meus sonhos, sem você teria sido muito mais difícil chegar aqui. Serei eternamente grata.

À toda a minha família, em especial à minha mãe que sempre esteve ao meu lado nos momentos difíceis. Por isso essa dissertação é dedicada à ela.

Aos meus sinceros amigos por estarem sempre ao meu lado, mesmo aqueles que estão distantes. Sinto muito a falta de vocês.

Aos meus colegas de laboratório, com os quais eu sempre estou aprendendo algo novo. É muito gratificante trabalhar ao lado de vocês.

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”.

Isaac Newton

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis".*

Bertolt Brecht

Resumo



STAFUZZA, N. B. Construção de um mapa comparativo preliminar do cromossomo 6 do búfalo de rio (*Bubalus bubalis*) utilizando um painel de células somáticas híbridas irradiadas. São José do Rio Preto, 2007. 53p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Nesse trabalho apresentamos o primeiro mapa comparativo do cromossomo 6 do búfalo de rio (BBU6), desenvolvido a partir da utilização de um painel de células somáticas híbridas irradiadas búfalo-roedor com fragmentação de 5000 rads. O mapa preliminar construído é composto por 33 marcadores, os quais estão ordenados em dois grupos de ligação compostos por 12 microssatélites, 19 genes codificantes e duas ESTs. A frequência de retenção observada entre os marcadores variou de 14.4% a 40%. A ordem dos marcadores dentro dos grupos de ligação do BBU6, em sua maioria, é consistente com o mapa RH bovino. Esse mapa preliminar do BBU6 é um ponto de partida para comparar a ordem dos genes entre as espécies, fornecendo uma oportunidade para estudar micro-arranjos nesse cromossomo, além de possibilitar a clonagem posicional em búfalo de rio.

Palavras-chave: búfalo de rio, BBU 6, mapeamento RH.

Abstract



STAFUZZA, N. B. Construction of preliminary comparative map of river buffalo (*Bubalus bubalis*) chromosome 6 using a radiation hybrid panel. São José do Rio Preto, 2007. 53p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

We present the first radiation hybrid map of BBU6 developed from a recently constructed river buffalo whole-genome radiation hybrid panel (BBURH₅₀₀₀). The preliminary map contains 33 cattle-derived markers, including 12 microsatellites, 19 coding genes and two ESTs, distributed in two linkage groups. The retention frequency of individual markers ranged from 14.4% to 40.0%. Most of the marker order within the linkage groups is consistent with the cattle RH maps. This preliminary BBU6 RH map is the starting point for comparing gene order between both species, presenting opportunity for examination of micro-rearrangements of these chromosomes and, thereby enhancing the possibility of positional candidate cloning in river buffalo.

Key-words: river buffalo, BBU 6, RH mapping.

Sumário



SUMÁRIO

I. Introdução	11
1. A Importância Econômica do Búfalo de rio	11
2. O Genoma do Búfalo de rio	14
3. Panorama atual do mapeamento genômico do búfalo de rio	16
4. O Cromossomo 6 do Búfalo de rio	21
II. Objetivos	24
III. Artigo submetido à publicação	26
IV. Discussão	37
V. Conclusão	42
VI. Referências Bibliográficas	45

I. Introdução



1. A importância econômica do búfalo de rio

O búfalo é uma espécie originária da Ásia e África, de onde se difundiu para praticamente todos os continentes, cuja população mundial está estimada em 146 milhões de animais, apresentando uma taxa de crescimento anual em torno de 2% (Tonhati et al., 2000). Sugere-se que a domesticação do búfalo tenha ocorrido a aproximadamente 5000 anos, sendo que hoje essa espécie encontra-se espalhada por 38 países na Ásia, Europa, África e América do Sul (Nanda e Nakao, 2003). O Brasil, segundo o ANUALPEC (2006) possui o maior rebanho das Américas com uma população estimada em 1 milhão de animais, englobando as raças Jafarabadi, Murrah, Mediterrâneo e Carabao (CPATU-Embrapa, 2006).

A história do búfalo no Brasil tem origem no final do século XIX, na Ilha de Marajó no estado do Pará. Atualmente, a população brasileira de búfalos é destinada à produção de carne e leite, onde metade do rebanho se concentra na região Norte e o restante se espalha por praticamente todos os estados. O primeiro pólo de produção do estado de São Paulo foi instalado na década de 1950 no Vale do Ribeira, onde hoje cerca de 250 criadores produzem carne, leite e derivados, sendo que o estado de São Paulo já responde por cerca de 10% dos animais da população nacional.

A população de búfalo de rio no Brasil vem apresentando nos últimos 5 anos o maior índice de crescimento dentre todos os animais de interesse econômico, com uma taxa anual de crescimento em torno de 10%, representando uma proporção quatro vezes maior do que em bovinos. Algumas das características inerentes da espécie são: docilidade, adaptabilidade e precocidade, vida útil até os 15 anos (cinco anos a mais que a de bovino),

grande produtividade em leite e carne, alta taxa de natalidade (80%) e mortalidade inferior a 3% ao ano (ABCB, 2006).

Pesquisas comparando as qualidades químicas e nutricionais das carnes bubalina e bovina revelaram que a carne de búfalo tem 40% menos colesterol, 12 vezes menos gordura, 55% menos calorias, 11% mais proteína e 10% mais minerais. Além disso, apresenta superioridade em composição nutricional e baixo índice de gordura intramuscular, permitindo a obtenção de uma carne magra e saudável (CPATU-Embrapa, 2006).

O leite de búfala também apresenta uma superioridade na composição química em relação ao leite de vaca, calculada em: 43,81% em sólidos totais, 43,60% em gordura, 17,10% em extrato seco desengordurado, 41,54% em proteínas, 2,4% em lactose, 15,30% em resíduo mineral fixo, 42,10% em cálcio e 42,86% em fósforo (CPATU-Embrapa, 2006).

Em todo o país o búfalo tem se tornado uma boa opção econômica, principalmente pela exploração leiteira e conseqüente elaboração do queijo *Mozzarella* (Tonhati et al., 2000). A composição físico-química do leite de búfala permite maior rendimento na fabricação de produtos lácteos, além de conferir-lhes excepcional qualidade (Tonhati et al., 1996). O leite de búfala, dada suas características peculiares, é a matéria-prima ideal para a elaboração de diversos tipos de queijos, sendo que o segmento industrial paulista produz: *Mozzarella*, coalhada, ricota e queijo frescal, além de doce de leite e manteiga como derivados do leite de búfala.

Trata-se de um animal de extrema versatilidade, podendo produzir carne, leite e força de tração em todas as latitudes, longitudes e altitudes (Silva et al., 2003). Dentre todos os animais domésticos, o búfalo de

rio apresenta a maior promessa em potencial para a produção (Nanda e Nakao, 2003).

2. O genoma do búfalo de rio

Os 146 milhões de búfalos no mundo são divididos em duas espécies: os numerosos búfalos asiáticos (*Bubalus bubalis*) e o raro búfalo africano (*Syncerus caffer*). Os búfalos asiáticos são divididos em duas subespécies: o búfalo de rio ($2n=50$) e o búfalo de pântano ($2n=48$). Os búfalos de rio são os mais numerosos, correspondendo a 80% da população bubalina mundial (Iannuzzi, 1994).

O número diplóide de cromossomos ($2n$) da família Bovidae varia de 30 à 60, mas o número de braços cromossômicos é relativamente constante, variando de 56 à 58 para a maioria dos cariótipos de bóvidos (Cribiu et al., 2001). Wurster e Benirschke (1968) especularam que a constância em número de braços autossômicos é indicativo de fusões cêntricas e que a estimativa cromossômica para os bóvidos originou-se de um cariótipo primitivo de 58 cromossomos autossomos acrocêntricos, uma condição vista em bovino (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*), cabra (*Capra hircus*) e outros bóvidos (Gallagher e Womack, 1992; Othman, 2004).

O genoma do búfalo de rio consiste em cinco pares de cromossomos autossomos metacêntricos e 19 pares acrocêntricos, além do par de cromossomos sexuais X e Y. O genoma bovino, por sua vez, consiste de 29 cromossomos autossomos acrocêntricos e um par de cromossomos sexuais (Iannuzzi et al., 2003). Os cinco primeiros cromossomos do búfalo de

rio são os metacêntricos, resultantes de fusões entre cromossomos acrocêntricos do genoma bovídeo ancestral (Iannuzzi, 1994).

Estudos envolvendo a conservação de genes de um mesmo grupo sintênico têm relatado uma extensa conservação cromossômica entre boi e búfalo (El Nahas et al., 1996; El Nahas et al., 2001; Iannuzzi et al., 2001a; Navani et al., 2002). Sintenia significa “no mesmo fio”, que em termos genéticos corresponde “no mesmo cromossomo” (Womack, 1996). Assim, conservação de sintenia, ou seja, a localização de dois ou mais genes ortólogos no mesmo cromossomo em diferentes espécies permitiu estabelecer uma correspondência de todos os grupos sintênicos do genoma bovino com os cromossomos do búfalo de rio (El Nahas et al., 2001; Iannuzzi et al., 2003; Othman, 2004).

3. Panorama atual do mapeamento genômico do búfalo de rio

Apesar de uma população relativamente grande e em crescimento, e levando-se em consideração que o búfalo de rio apresenta importância econômica em muitos países, estudos envolvendo caracterização e manipulação do genoma encontram-se atrasados quando comparados com os estudos genômicos de outras espécies de interesse econômico. Isto se reflete, por exemplo, no número de marcadores moleculares mapeados no genoma bubalino, com apenas 302 marcadores (Iannuzzi et al., 2003; Di Meo et al., 2006). O genoma bovino por sua vez apresenta cerca de 3200 marcadores moleculares mapeados (Womack, 2005).

A partir de um projeto de pesquisa iniciado em 2004 no Laboratório de Genômica Comparativa - IBILCE/UNESP, com financiamento conjunto da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo 02/10150-5) e da fundação Americana “National Science Foundation” (processo OISE-0405-743), foi construída uma ferramenta genômica de última geração para o mapeamento do genoma bubalino. Esta ferramenta genômica consiste de um painel celular de 90 linhagens de células somáticas irradiadas do genoma total bubalino fusionadas com o genoma de roedor (painel RH – *radiation hybrid panel*). O esforço conjunto dessas instituições financiadoras resultou no estabelecimento do programa de colaboração internacional FAPESP-NSF, intitulado: “U.S.- Brazil collaborative Research: Program to develop a RH map of the river buffalo genome”. Esta ferramenta genômica já foi caracterizada em nível molecular e já se encontra disponível à comunidade científica nacional e internacional para trabalhos em colaboração (Amaral et al., *in press*).

A ferramenta genômica de painéis de células somáticas híbridas irradiadas tem sido extensivamente utilizada no mapeamento das principais espécies de animais de interesse econômico desde o final da década de 90, quando a tecnologia originalmente empregada no mapeamento do genoma humano (Cox et al., 1990), foi utilizada de maneira pioneira por Womack e colaboradores (1997) no mapeamento do genoma bovino. Desde então, a tecnologia de mapeamento de genomas eucarióticos, por meio de painéis RHs tem sido aplicada em estudos de diversos animais, como, por exemplo, cachorro (Priat et al., 1998), porco (Hawken et al., 1999), zebrafish (Geisler et al., 1999), camundongo (Van Etten et al., 1999), gato (Murphy et al.,

1999), cavalo (Kiguwa et al., 2000) e mais recentemente em búfalo de rio (Amaral et al., *in press*).

O sucesso da utilização desta ferramenta na construção de mapas genômicos, principalmente do genoma de animais de interesse econômico, se deve ao poder desta técnica no mapeamento comparativo de genes, os quais são, geralmente, conservados entre as espécies e por este motivo não são incluídos nos mapas de ligação tradicionais devido à falta de variação alélica (Boehnke et al., 1991; Murphy et al., 2000). Outra vantagem da tecnologia de mapeamento de genomas eucarióticos por meio de painéis de células somáticas híbridas irradiadas reside no fato de ser utilizada em conjunto com a tecnologia de PCR. A associação das tecnologias de RH e de PCR permitem que o mapeamento genômico da espécie de interesse seja realizado em larga escala.

A disponibilidade de uma ferramenta genômica adequada ao mapeamento do genoma de uma espécie fornece a possibilidade de exploração por informações do genoma nunca antes possível. Particularmente no caso do genoma bubalino, ainda inexplorado, o desenvolvimento de um mapa do genoma total desta espécie irá permitir uma rápida e eficiente transferência de informação dos mapas gerados em outras espécies próximas de ruminantes, como o bovino, facilitando a identificação de genes candidatos relacionados com características de interesse econômico por meio da comparação dos genomas (Yang e Womack, 1998; O'Brien et al., 1999; Murphy et al., 2000).

O mapeamento comparativo entre o búfalo e outras espécies de mamíferos, como por exemplo, bovino, humano e camundongo, também poderá ser realizado (Schibler et al., 1998). De particular importância é a

comparação da ordem gênica de regiões cromossômicas destas duas espécies de ruminantes, búfalo e bovino, um estudo até o momento impossível. A inclusão de marcadores moleculares e seqüências expressas no mapa do genoma bubalino que também tenham sido mapeados no genoma bovino, irá permitir o acesso aos tipos de rearranjos que aconteceram nestes genomas ao longo do processo evolutivo, contribuindo numa última instância, para o entendimento do funcionamento e da regulação dos genes, principalmente daqueles envolvidos em características de interesse econômico (Koonin et al., 2000; Murphy et al., 2001).

A localização de marcadores do tipo I (genes codificantes) e do tipo II (microsatélites) em regiões específicas dos cromossomos adiciona informações detalhadas sobre a organização física do genoma da espécie de interesse, permitindo comparações detalhadas sobre como o genoma de espécies relacionadas e não relacionadas estão organizados (Schibler et al., 1998; Di Meo et al., 2000; 2002; Iannuzzi et al., 2001a; 2001b).

A genômica comparativa é particularmente instrutiva na identificação de elementos reguladores conservados fora das regiões de genes. O poder desta estratégia tem sido implementado nos últimos anos pela disponibilidade de seqüências completas de genomas, principalmente de espécies de interesse econômico. A caracterização de elementos genômicos altamente conservados em bovinos e bubalinos, por exemplo, poderá gerar informações que levem ao entendimento de quais porções do genoma são únicas entre os ruminantes, porções estas que não são óbvias quando comparadas entre espécies muito distantes. Boffelli e colaboradores (2003) mostraram que a comparação do genoma humano com o genoma de primatas gerou informações que permitiram a identificação de grande parte dos

elementos funcionais no genoma humano, muitos dos quais não foram detectados pela comparação entre o genoma humano e de camundongo. Assim, considerando a necessidade de entender, sobretudo a porção codificante do genoma bubalino e também do bovino, estudos comparativos poderão fornecer informações valiosas sobre o funcionamento destes genomas, informações estas não detectáveis a partir de comparações entre espécies mais distantes, como por exemplo, com o genoma humano.

Assim, o estudo do genoma bubalino torna-se de fundamental importância para identificação e manipulação de genes responsáveis por características de interesse econômico como resistência a parasitas, ganho de peso, produção e qualidade de leite, produção e qualidade de carne, fertilidade e reprodução, os quais poderão ser aplicados na criação de estratégias racionais para otimizar a utilização e conservação da disponibilidade da variabilidade genética em búfalos, no melhoramento genético desses animais e um maior retorno econômico para o setor (Kumar et al., 2006).

4. O cromossomo 6 do búfalo de rio

O cromossomo 6 bubalino é o primeiro cromossomo acrocêntrico do cariótipo. Estudos citogenéticos realizados com o búfalo de rio envolvendo hibridização *in situ* (Iannuzzi et al., 2003) e genética de células somáticas (El Nahas et al., 2001) identificaram o cromossomo 6 do genoma bubalino (BBU6) como homólogo ao cromossomo 3 bovino (BTA3).

Na mais recente revisão dos marcadores mapeados no genoma do búfalo de rio, publicado por Iannuzzi et al. (2003), há a indicação de

somente 6 genes (ACADM, CRP, HSD3B1, NGFB, NRAS e UOX) e 6 marcadores do tipo microssatélite (BM723, D3S2, D3S25, D3S29, D3S4 e S100A6) no BBU6. Por outro lado, o mais atual mapa do BTA3 (Everts-van der Wind et al., 2004), um mapa do tipo RH, apresenta um total de 88 marcadores.

O BBU6 é um cromossomo extremamente interessante com muito ainda para ser explorado, principalmente se for considerado que nos cromossomos correspondentes em bovino (BTA3) e ovino (OAR1) foram indicadas regiões com QTLs (*Quantitative Trait Loci*) relacionadas com produção e qualidade de leite (Calvo et al., 2006). O BTA3 tem sido descrito como um dos principais cromossomos bovinos portador de regiões de QTL com efeitos pleiotrópicos em múltiplos traços relacionados com produção e qualidade do leite, apresentando vários trabalhos descritos na literatura (Georges et al., 1995; Heyen et al., 1999; Frank et al., 2002; Plante et al., 2001; Olsen et al., 2002; Khatkar et al., 2004; Schulman et al., 2004). Dentre essas regiões de QTL presentes no BTA3 destaca-se a D3S20-D3S34-D3S3 que controla características relacionadas com a produção de leite, a qual apresenta uma extensa conservação de sintonia entre diversas espécies incluindo humano, camundongo e ovino (Frank et al., 2002).

A maioria dos traços economicamente importantes do búfalo de rio, assim como em todos os animais domésticos, são poligênicos e conseqüentemente difíceis de isolar e identificar em nível de genoma. Entretanto, o sucesso recente em identificar os loci de características quantitativas (QTL) em bovinos e em outras espécies de animais domésticos demonstrou novas oportunidades de análise destes traços continuamente distribuídos (Montgomery, 2000; Khatkar et al., 2004).

Embora alguns trabalhos tenham indicado genes a cromossomos específicos de búfalo (Iannuzzi et al., 1993a; 1993b; 1993c; 1994; 1996a; 1996b; 1998; 1999; 2001a; 2001b; 2001c; 2003) utilizando métodos como hibridização *in situ*, a construção de um mapa do tipo RH do cromossomo 6 bubalino faz-se essencial, uma vez que as informações geradas a partir de um mapa saturado de marcadores poderão contribuir para os programas de melhoramento genético desta espécie, para seleção de genes candidatos em regiões de características quantitativas mapeadas, clonagem posicional e futuramente para a manipulação de genes que codifiquem proteínas de interesse econômico.

A geração de um mapa comparativo entre o BBU6 e o BTA3 permitirá, ainda, avanços no conhecimento sobre os mecanismos de rearranjos cromossômicos que acompanharam a evolução desses cromossomos, em especial durante a evolução da família Bovidae (Womack, 2005).

II. Objetivos



Visando contribuir para o conhecimento dos genes presentes no cromossomo 6 bubalino e sua relação com o genoma bovino, o presente trabalho teve como objetivos:

- avaliar o aproveitamento de pares de *primers* para PCR derivados do cromossomo 3 bovino para o mapeamento do cromossomo 6 do genoma de búfalo-de-rio;

- construir um mapa preliminar do tipo RH do cromossomo 6 do búfalo de rio utilizando a estratégia de mapeamento por meio de células somáticas híbridas irradiadas, integrando marcadores do tipo microssatélite, ESTs (Etiquetas de Seqüências Expressas) e genes codificantes;

realizar uma prévia análise comparativa entre o cromossomo 6 bubalino e o cromossomo 3 bovino, evidenciando as porções de conservação de sintenia entre os mesmos.

III. Artigo submetido à publicação

Revista Animal Genetics – ISSN impresso: 0268-9146 / ISSN
eletrônico: 1365-2052. Oxford – England
Short communication



Preliminary comparative RH mapping between river buffalo chromosome 6 (BBU6) and bovine chromosome 3 (BTA3).

N. B. STAFUZZA¹, P. IANELLA¹, M. N. MIZIARA¹, A. A. SCHÄFFER², R. AGARWALA², J. E. WOMACK³, P. K. RIGGS⁴ and M. E. J. AMARAL¹

¹ *UNESP – São Paulo State University, IBILCE, Dept. Biologia, São Jose Rio Preto, SP, 15054-000, Brazil.*

² *National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Bethesda, Maryland 20894, USA.*

³ *Department of Veterinary Pathobiology, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA.*

⁴ *Department of Animal Science, Texas A&M University, College Station, TX, 77843, USA*

Summary

We present the first radiation hybrid map of BBU6 developed from a recently constructed river buffalo whole-genome radiation hybrid panel (BBURH₅₀₀₀). The preliminary map contains 33 cattle-derived markers, including 12 microsatellites, 19 coding genes and two ESTs, distributed in two linkage groups. The retention frequency of individual markers ranged from 14.4% to 40.0%. Most of the marker order within the linkage groups is consistent with the cattle RH maps. This preliminary BBU6 RH map is the starting point for comparing gene order between both species, presenting opportunity for examination of micro-rearrangements of these chromosomes and, thereby enhancing the possibility of positional candidate cloning in river buffalo.

Keywords: river buffalo, chromosome 6, RH mapping

A member of the Bovidae family, river buffalo (*Bubalus bubalis*) contributes immensely to the world agricultural economy as a resource for 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 important species lags behind the level at which research is supported for many other domestic species (Womack 2005).

High quality genome maps are essential for the identification of genes affecting economically important traits in domestic animals, but 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 involving *in situ* hybridization and somatic cell genetics (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 conserved synteny observed between both chromosomes allows the use of cattle markers for mapping of the corresponding buffalo chromosome. The most recent reports regarding river buffalo genome mapping (Iannuzzi *et al.* 2003; Di Meo *et al.* 2006) describe a total of 302 loci physically assigned to its genome, with the BBU6 map containing only 12 loci (six genes and six microsatellites) assigned by FISH. In contrast, the map of BTA3 includes 88 radiation hybrid (RH) markers (Everts-vand der Wind *et al.* 2004) and also has been reported to anchor numerous QTLs with pleiotropic effects on multiple milk production traits, such as milk yield, protein percentage, protein yield, fat percentage and fat yield (Khatkar *et al.* 2004).

In this report, we present a preliminary comparative RH map between BBU6 and BTA3 based on cattle-derived markers published on linkage and RH maps and its comparison with BTA3 RH map of (Ihara *et al.* 2004; Everts-vand der Wind *et al.* 2004; 2005) in order to establish the order within the syntenic conservation between both species. It was anticipated that PCR primers for most of the BTA3 markers would amplify from buffalo DNA. Although some PCR amplification failures were observed,

the percentage of cattle PCR primers from microsatellites, ESTs and coding genes producing reliable scores are consistent with those described by Amaral *et al.* (2007).

PCR reactions were performed in a MJ Research PTC-200 (Peltier Thermal Cycler) thermocycler with thermal gradient. The markers were scored after amplification of DNA from the 90 radiation hybrid lines and control bovine and hamster DNA by PCR in 96-well micro titer plates, as described elsewhere (Amaral *et al.*, 2007).

PCR reactions containing: 50ng of DNA, 10mM Tri-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50mM KCl, pH 8.3 (20°C), 10 mM dNTPs, 0.2 mM each primer, and 0.5 unit of Taq polymerase (AmpliTaq Gold, Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA), were carried out in a total volume of 10 µl. PCR conditions included an initial denaturation at 94°C for 10 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 sec (denaturation), 50 to 65°C for 30 sec (annealing -according with the primer pair), and extension of 72°C for 30 sec, with a final extension of 7 min at 72°C.

Most of the PCR primer pairs produced amplified products exclusively from buffalo DNA, and did not amplify hamster DNA. Eight markers (BMS835, NRAS, IDVGA53, BMS963, MUF1, BMS2904, BMS723 and F3), also showed PCR amplification from the control hamster DNA. From this group, five markers (BMS835, NRAS, IDVGA53, BMS963 and MUF1), were suitable for the scoring because the PCR products from the hybrid cell lines were easily distinguished from the hamster control. The remaining three markers were discarded.

The PCR products were electrophoresed through 2% agarose gels in 1.0X TBE buffer containing ethidium bromide, and photographed under UV light. PCR products were scored as 1 for presence, 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 BBU6 RH map was constructed using the software *rh_tsp_map* (Agarwala *et al.* 2000) and CONCORDE (Applegate *et al.* 1998) linked to QSOPT. We used the maximum likelihood criterion and our framework maps are called "MLE-consensus" maps estimated by software analysis (Agarwala *et al.* 2000).

A total of thirty-three markers were typed with the BBU6 panel requiring a LOD score greater than 5. All 33 markers were placed on the MLE-consensus map, of which 29 were in the computed map and four were placed in bins. The markers were distributed in two linkage groups, LG1 including 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). The BBU6 LG1 spans 303.2 cR and BBU6 LG2 spans 334.9 cR, giving a total length of approximately 638.1 cR. Additional information about the mapped markers is described on Table 1.

The retention frequency (RF) of the mapped markers ranged from 14.4% for RPS8 to 40.0% for NRAS. The marker order on both linkage groups is not entirely consistent with the cattle RH maps (Everts-van der Wind *et al.* 2004; 2005). When data was available, the corresponding position of the markers within the linkage groups was also verified regarding their cytogenetic assignment on BBU6 (IDVGA-53, HSD3B1, CSSM054, NGFB, NRAS and UOX).

Since a prior linkage map does not exist for river buffalo, our BBU6 RH map results were compared with the BTA3 second generation RH map (Everts-van der Wind *et al.* 2004). Few disagreements were observed in the order of the markers on both linkage groups obtained from BBU6. However, since the BBU6 RH map generated does not cover the entire length of the buffalo chromosome, enough information is not available to characterize signs of disrupted conservation. By mapping 19 new genes, we initiate the comparative map of the BBU6, verifying that high density RH maps can be generated based on the available bovine genome information. Increasing the number of

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

References

Agarwala R., Applegate D.L., Maglott D., Schuler G.D. & Schäffer A.A. (2000) A Fast and Scalable Radiation Hybrid Map Construction and Integration Strategy. *Genome Research* **10**, 350-64.

Amaral et al. Construction of a river buffalo (*Bubalus bubalis*) whole-genome radiation hybrid panel and preliminary RH mapping of chromosomes 3 and 10. *In press*

Applegate D., Bixby R., Chvátal V. & Cook W. (1998) On the solution of traveling salesman problems. *Documenta mathematica, extra volume International Congress of Mathematics: III*, 645-56.

Brinkmeyer-Langford C., Raudsepp T., Lee E-J. et al. (2005) A High-Resolution Physical Map of Equine Homologues of HSA19 Shows Divergent Evolution Compared to Other Mammals. *Mammalian Genome* **16**, 631-49.

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 Science of the United States of America* **102**, 18526-31.

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.

Khatkar M.S., Thomson P.C., Tammen I. & Raadsma H.W. (2004) Quantitative trait loci mapping in dairly cattle: review and meta-analysis. *Genetics Selection Evolution* **36**, 163-90.

Williams J.R., Eggen A., Ferretti L. *et al.* (2002) A bovine whole-genome radiation hybrid panel and outline map. *Mammalian Genome* **13**, 469-74.

Womack J. E. (2005) Advances in livestock genomics: Opening the barn door. *Genome Research* **15**, 1699-705.

Figure 1. Comparison of the BBU6 RH map (center) with the buffalo cytogenetic (left), and the bovine RH map from BTA3 (right). The framework markers, whose order is better than the second best at least 0.50 LOD score units, are shown in bold letters. Markers common to both BBU and BTA RH maps are joined by a solid line. The distances in cR₅₀₀₀ are shown in the left of each corresponding map.

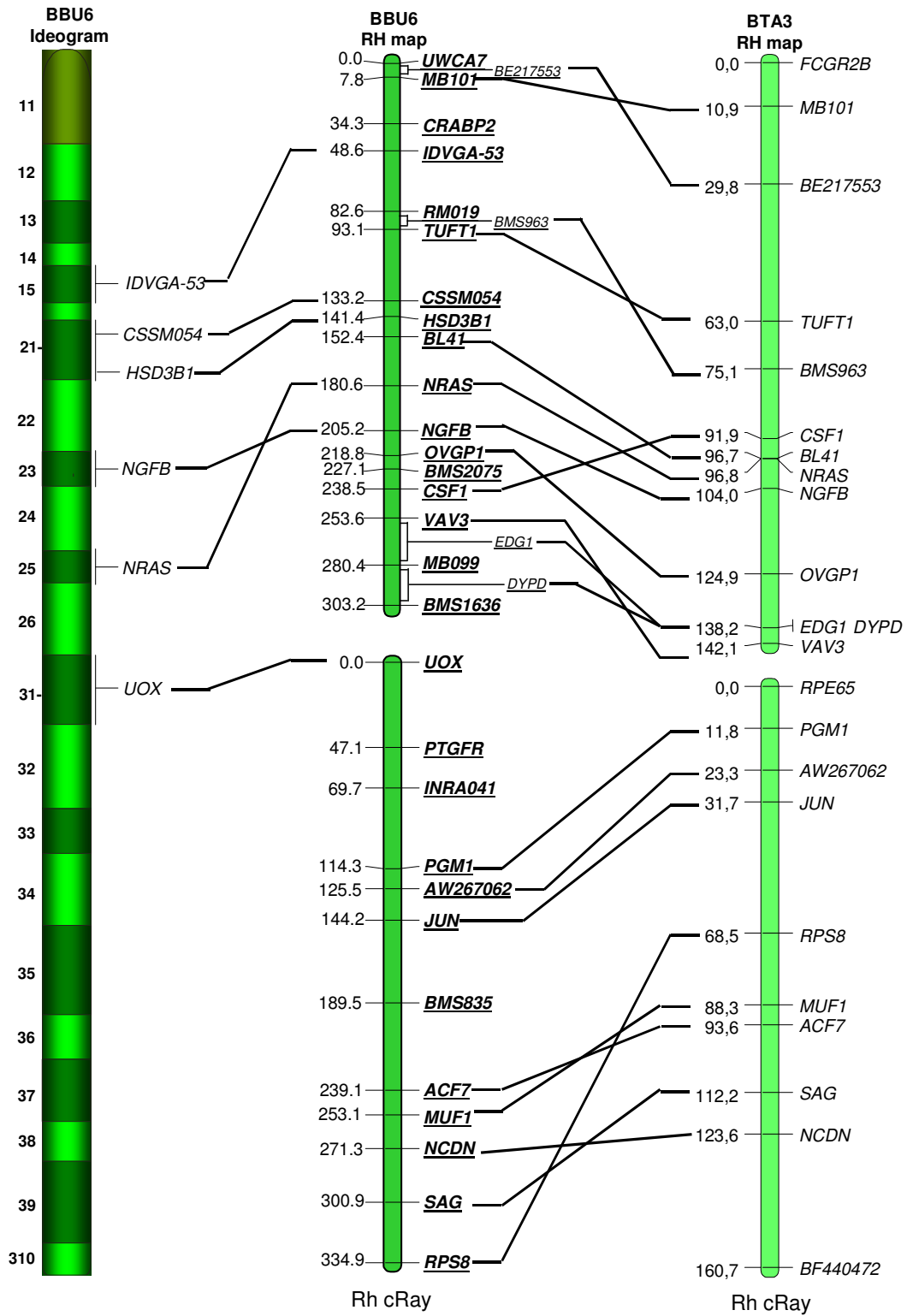


Table 1. Cattle-derived markers from BTA3 typed on the BBURH₅₀₀₀ panel DNA, followed by the retention frequency, the marker distance on the BBU6 RH map, annealing temperature and the PCR primer sequences.

Marker	Type	RF (%)	Marker placement distance cR	Tm (°C)	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
LG1						
UWCA7 ¹	MS	32.2	0.0	61	TGTAGCTCCCTGGAGGAGAA	GCAAATACAACCCAGTCTGGTG
BE217553 ²	EST	33.3	placed	50	TCTGAATCTTAACCAAAAAAT	CAAAGCTGAGACCCCTACAT
MB101 ¹	MS	32.2	7.8	65	AGGAATATCTGTATCAACCTCAGTC	CTGAGCTGGGGTGGAGCTATAAATA
CRABP2 ³	Gene	30.0	34.3	65	AAACAGGGAGGGGGACACTTT	TCGTTGGTTCAGTTCTCTGGT
IDVGA-53* ¹	MS	25.5	48.6	65	ACGGGACGCCTCGGTTCAGTG	GAAGGGGAAGGGGAAGATGAAC
RM019 ¹	MS	33.3	82.6	59	CCAGGGTGCTGATATCTGGAGG	TTCATGAACAAGATGGAGACTT
BMS936 ¹	MS	32.2	placed	50	GGAGGATGAAGGAGTCTTTGG	AATTTACCACAGTCCACCGC
TUFT1 ²	Gene	35.5	93.1	60	GTCTTCTCTTGGCGTGTTTGGA	CGGGATAACAAACTGATGGTGG
CSSM054* ¹	MS	30.0	133.2	63	AAACACATGGAGAATCAGACCTCC	TCCAACAACCGTAGCACCTCCTG
HSD3B1* ⁴	Gene	30.0	141.4	63	AGCACCATAGAAGTGGCTGG	CAGGATGCCGTTGTATTCA
BL41 ¹	MS	31.1	152.4	65	CCTCTGCCATCTTTATTCCG	AAGATCAACTTATTCCTCACAGTGG
NRAS* ²	Gene	40.0	180.6	50	CTTTTCATTTAGGGCCAAGGAGG	GAGGAGCTCAGTGAAGTTGTA
NGFB* ²	Gene	34.4	205.2	65	TTCTCGGTGTGCGACAGCAT	TCCCGGCATCTGGTCTCAA
OVGP1 ²	Gene	32.2	218.8	60	GGTTACTTTGGTCTTGAGACA	CTGGGATCCTTTATTACAGC
BMS2075 ¹	MS	28.9	227.1	57	TCCCATTCCTGAGCTGATG	AGTCATTTCCCTCTTTGGG
CSF1 ²	Gene	28.9	238.5	65	GCAGAGCTGAAAGGAGGACA	GCCAGCAAGACCAGGATGAT
VAV3 ²	Gene	23.3	253.6	58	AAGGTGTCTCTTGGAGTGGA	TGCTCTCTGGTAACAGTTGG
EDG1 ²	Gene	15.5	placed	51	TGGCCCTCTCAGACCTGTTG	TGGCGAGGAGACTGAACACG
MB099 ¹	MS	15.5	280.4	65	CTGAGGTGTGTGAGCCCCATTTA	CTAAGAGTCGAAGGTGTGACTAGG
DPYD ²	Gene	21.1	placed	58	AAGGCCAGAGTGTTCAGTAACC	GGCTTTAACAGAGTTCATCC
BMS1636 ¹	MS	18.9	303.2	65	CATTATTCAGTGCCTTTGGATG	GTGTTGGAGTCTTCAGCAGG
LG2						
UOX* ⁵	Gene	17.8	0.0	56	CCTCCAGTCATTCATCTG	ACATCTCTGCCCTGGTGGTA
PTGFR ⁴	Gene	23.3	47.1	65	CTGGAAAAATCAGCCCTCAC	AAGAAGCCACAATCAATCCC
INRA041 ¹	MS	18.9	69.7	50	TGCAAAAATCTTCTAAGATACTTTAA	AACATTTTATGTAGTTTAAATTTGAAAC
PGM1 ²	Gene	18.9	114.3	62	AGAGCTGATTGGAGAGAAGGCA	ACTGGAAGATGGAGGTTGAGCA
AW267062 ²	EST	18.9	125.5	65	ACCTAACTCAGCCTTAAAGCATC	CCAGAAGTACCTCTTTACCCAG
JUN ²	Gene	21.1	144.2	65	GAAGCAGAGCATGACCCTGAAT	ATATGCCCGTTGTCTGGACTGTA
BMS835 ¹	MS	21.1	189.5	60	TCATGTGCATGGGGTTTG	ATCTGCCTACCTGGGCATC
ACF7 ²	Gene	22.2	239.1	65	ATTACAGGGTTACCAGGAGGCA	CCAAGCCTCTCTCCACTTTGAA
MUF1 ²	Gene	22.2	253.1	50	TTACATGGTGAATGAGGCCA	AGTGTCTGTGCTGAACGGC
NCDN ²	Gene	18.9	271.3	56	AGGCCGTTGACATTGCAGTT	GAAAGCTCACATGGAAGGAGGTT
SAG ²	Gene	16.7	300.9	61	AAGGAAGAGAAGACAGACCA	ACGTCATAAAGGGCTAACT
RPS8 ²	Gene	14.4	334.9	55	ACAAGAAACGATCAAGAAA	TGAGCTAAGACAGGAGAGAA

* markers with FISH assignment on buffalo chromosome 6.

¹ Ihara N., Takasuga A., Mizoshita K., Takeda H., Sugimoto M., Mizoguchi Y., Hirano T., Itoh T., Watanabe T., Reed K.M., Snelling W.M., Kappes S.M., Beattie C.W., Bennett G.L. & Sugimoto Y. (2004) A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Research* **14**, 1987-1998.

² Everts-van der Wind A., Kata S.R., Band M.R., Rebeiz M., Larkin D.M., Everts R.E., Green C.A., Liu L., Natarajan S., Goldammer T., Lee J.H., McKay S., Womack J.E., Lewin H.A. (2004) A 1463 gene cattle-human comparative map with anchor points defined by human genome sequence coordinates. *Genome Research* **14**, 1424-1437.

³ This paper

⁴ Nakata L.C., Kata S.R., Womack J.E., Coutinho L.L., Amaral M.E. (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.

⁵NCBI Map Viewer - Electronic PCR UniSTS:253506
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/sts.cgi?uid=253506>

IV. Discussão



Um total de 54 pares de *primers* para PCR derivados do BTA3 (29 microssatélites, 21 genes codificantes e 4 ESTs) foram testados no genoma bubalino. Destes, 33 pares de *primers* (12 microssatélites, 19 genes e 2 ESTs) amplificaram produtos adequados ao mapeamento do cromossomo 6 bubalino. Dos 21 pares de *primers* que foram excluídos (17 microssatélites, 2 genes e 2 ESTs), 3 não amplificaram produto de PCR com o DNA bubalino (BE217536, BMS2095, BE217521), 15 apresentaram ampliações inespecíficas com o DNA bubalino (BM7225, BMC5227, HUIJ246, IDVGA-27, HUII77, CA065, RME23, IDVGA-35, BM4021, BMS2522, BM4129, S100A6, BM862, NEED5, RM003) e 3 amplificaram produtos de mesmo tamanho com o DNA de búfalo e de roedor (BMS723, BMS2904, F3).

Quando comparado a porcentagem de aproveitamento de pares de *primers* para PCR de seqüências codificantes (84%) com as de seqüências não codificantes (41%), observa-se que um número maior de *primers* que amplificam genes e ESTs foram utilizados com sucesso. Esse resultado já era esperado, visto que as seqüências codificantes apresentam-se mais conservadas entre os mamíferos do que as seqüências repetitivas do tipo microssatélite, que em sua maioria são espécie-específica.

É importante ressaltar que a ausência de amplificação com DNA bubalino utilizando um par de *primer* desenhado a partir da seqüência do genoma bovino não exclui a possibilidade da presença da seqüência homóloga em búfalo, uma vez que não existe disponível na literatura a seqüência do genoma bubalino para que possa ser realizada essa comparação.

A freqüência de retenção dos marcadores mapeados nas linhagens híbridas do painel apresentou uma variação de 14,4% com o

marcador RPS8 a 40% com o marcador NRAS. A diferença na frequência de retenção observada com o marcador RPS8 é justificada pelo fato desse gene ter sido mapeado na porção telomérica do cromossomo 6 bubalino, ou seja, região com menor chance de ser mantida durante o processo de fusão da célula irradiada (búfalo) com a célula doadora (roedor) na formação dos clones durante a construção do painel.

Um mapa preliminar cR_{5000} do cromossomo bubalino 6 foi construído com 33 marcadores, representando um total de 638,1 cR, distribuídos em dois grupos de ligação com um LOD *score* > 5. O grupo de ligação 1 (LG1) apresentou um tamanho de aproximadamente 303,2 cR contendo 21 marcadores (10 microssatélites, 10 genes e 1 EST). Já o grupo de ligação 2 (LG2) apresentou um tamanho de aproximadamente 334,9 cR, composto por 12 marcadores (2 microssatélites, 9 genes e 1 EST) (Fig. 1).

A ordem dos marcadores dentro dos grupos de ligação não se apresenta inteiramente consistente com os mapas de ligação (Ihara et al., 2004) e RH do genoma bovino (Everts-van der Wind et al., 2004; 2005). Quando comparado com o mapa citogenético do cromossomo 6 bubalino publicado por Iannuzzi e colaboradores (2003), os marcadores IDVGA-53, HSD3B1, CSSM054 e UOX apresentam a mesma ordem indicada por FISH, enquanto que os genes NGFB e NRAS aparecem em posições invertidas. No entanto, considerando o número de marcadores mapeados nesta fase, não foram obtidas informações suficientes para caracterizar sinais de quebra na conservação. A adição de novos marcadores nesse grupo de ligação (LG1) poderá elucidar essa questão.

Como não há mapa de ligação do genoma de búfalo de rio disponível na literatura, as análises comparativas foram realizadas com o mapa

RH do BTA3 apresentado na segunda geração de mapas RH do genoma bovino (Everts van-der Wind et al., 2004). O BTA3 também apresenta 2 grupos de ligação: o grupo de ligação 1 (LG1) com 58 marcadores distribuídos em 142,1 cR e o grupo de ligação 2 (LG2) com 30 marcadores distribuídos em 160,7 cR. Entre os mapas RH do BTA3 e do BBU6 há 21 marcadores em comum, onde foram observadas algumas inversões nas posições de alguns marcadores, como por exemplo, entre o gene TUFT1 e o microssatélite RM019 (Fig. 1).

A correlação entre as distâncias de um mapa RH (medida em *centiray*) e as distâncias de um mapa genético (medido em *centimorgan*) pode indicar a extensão do mapa obtido (Williams et al., 2002). Na ausência de mapa de ligação do genoma de búfalo, o mapa RH do BBU6 foi comparado com o mais recente mapa de ligação do BTA3 que possui 128,9 cM (Ihara et al., 2004), na tentativa de gerar uma primeira avaliação da extensão do mapa RH obtido em cM e em pares de bases. Desse modo, foram comparados o primeiro marcador do LG1 (UWCA7) com o último marcador do LG2 (BMS835) presentes no mapa RH do BBU6 e no mapa de ligação do BTA3. Assim, o tamanho do intervalo em cR no mapa RH do BBU6 totalizou 492,7 cR, enquanto que o tamanho deste mesmo intervalo no mapa de ligação do BTA3 totalizou 81,7 cM, gerando uma correlação aproximada de 6 cR para cada 1 cM. Considerando-se que 1 cM corresponde à aproximadamente 1MB (White et al., 1989) podemos especular que o tamanho do intervalo do mapa RH do BBU6 possui aproximadamente 82 MB. Com esse resultado, podemos ainda inferir que o mapa do BBU6 gerado apresenta uma cobertura de 63,4% deste cromossomo.

V. Conclusão



A partir dos resultados obtidos, podemos chegar às conclusões descritas abaixo:

- os *primers* para PCR desenvolvidos a partir de seqüências do BTA3, incluindo aqueles que amplificam genes codificantes, ESTs e microssatélites mostraram um aproveitamento de 61% quando utilizados com o DNA de búfalo de rio, representando uma importante fonte de marcadores a ser utilizada no mapeamento RH do BBU6. Com o sequenciamento completo do genoma bovino disponível no banco de dados público NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=genomeprj&cmd=Retrieve&opt=Overview&list_uids=10708), aliado ao número de marcadores mapeados no BTA3 e à metodologia de mapeamento utilizando células somáticas híbridas irradiadas torna possível a geração de mapas RH de alta resolução deste cromossomo bubalino;

- pela primeira vez o cromossomo 6 bubalino foi estudado com a utilização da tecnologia de mapeamento RH e no nível de resolução obtido, onde 33 novos marcadores foram mapeados, integrando 19 genes codificantes, 2 ESTs e 12 microssatélites;

- ao realizar a análise comparativa entre os mapas RH dos cromossomos BBU6 e BTA3, poucas discrepâncias foram observadas quanto à ordem dos marcadores em ambos os grupos de ligação. Porém, o número de marcadores mapeados deve ser levado em consideração;

- dezenove genes foram mapeados no BBU6, possibilitando o início dos estudos de mapeamento comparativo entre este cromossomo e o BTA3.

VI. Referências Bibliográficas



ABCB. Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos

<http://www.bufalo.com.br/> Acesso em: 10 dezembro 2006.

AMARAL, M. E. J. et al. Construction of a river buffalo (*Bubalus bubalis*) whole-genome radiation hybrid panel and preliminary RH mapping of chromosome 3 and 10. **Animal Genetics**. *In press*.

ANUALPEC

<http://ifnp.org.br/>

BOEHNKE, M.; LANGE, K.; COX, D. R. Statistical methods for multipoint radiation hybrid mapping. **The American Journal of Human Genetics**, v. 49, p. 1174-88, 1991.

BOFFELLI, D. et al. Phylogenetic shadowing of primate sequences to find functional regions of the human genome. **Science**, v. 299, p. 1391-4, 2003.

CALVO, J. H. et al. Isolation, mapping and identification of SNPs for four genes (ACP6, CGN, ANXA9, SLC27A3) from a bovine QTL region on BTA3. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 114, p. 39-43, 2006.

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. 245-50, 1990.

CPATU–Embrapa. Amazônia Oriental: Rebanho bubalino.
<http://www.cpatu.embrapa.br/> Acesso em: 15 dezembro 2006.

CRIBIU, E. P. et al. International System for Chromosome Nomenclature of Domestic Bovids. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 92, p. 283-99, 2001.

DI MEO, G. P. et al. Thirteen type I loci from HSA4q, HSA6p, HSA7q and HSA12q were comparatively FISH-mapped in four river buffalo and sheep chromosomes. **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 90, p. 102-5, 2000.

DI MEO, G. P. et al. Comparative mapping of twenty-eight bovine loci in sheep (*Ovis aries*, 2n = 54) and river buffalo (*Bubalus bubalis*, 2n = 50) by FISH. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 98, p. 262-4, 2002.

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.

EL NAHAS, S. M. et al. Synteny mapping in river búfalo. **Mammalian Genome**, v. 7, p. 831-4, 1996.

EL NAHAS, S. M., DE HONT, H. A., WOMACK, J. E. Current status of the river búfalo (*Bubalus bubalis* L.) gene map. **The Journal of Heredity**, v. 92, p. 221-25, 2001.

EVERTS-VAN DER WIND, A. E. et al. Gene cattle-human comparative map with anchor points defined by human genome sequence coordinates. **Genome Research**, v. 14, p. 1424-37, 2004.

EVERTS-VAN DER WIND, A. E. et al. A high-resolution whole-genome cattle-human comparative map reveals details of mammalian chromosome evolution. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 102, p. 18526-31, 2005.

FRANK, M. T. et al. Homogeneity of recombination rate within a conserved region on BTA3 that contains QTL. **Animal Genetics**, v. 33, p. 56-60, 2002.

GALLAGHER, D. S. J.; WOMACK, J. E. Chromosome conservation in the Bovidae. **Journal of Heredity**, v. 83, p. 287-97, 1992.

GEISLER, R. et al. A radiation hybrid map of the zebrafish genome. **Nature Genetics**, v. 23, p. 86-9, 1999.

GEORGES, M. et al. Mapping quantitative trait loci in dairy cattle by exploiting progeny testing. **Genetics**, v. 139, p. 907-20, 1995.

HAWKEN, R. J. et al. A first-generation porcine whole-genome radiation hybrid map. **Mammalian Genome**, v. 10, p. 824-30, 1999.

HEYEN, D. W. et al. A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. **American Physiological Society**, v.1, p. 165-75, 1999.

IANNUZZI, L. et al. Chromosomal localization of the major histocompatibility complex in cattle and river buffalo by fluorescent *in situ* hybridization. **Hereditas**, v. 118, p. 187-90, 1993a.

IANNUZZI, L. et al. Chromosomal localization of the lysozyme gene cluster in river buffalo (*Bubalus bubalis* L.). **Chromosome Research**, v. 1, p. 253-5, 1993b.

IANNUZZI, L. et al. Chromosomal localization of omega and trophoblast interferon genes in cattle and river buffalo by sequential R-banding and fluorescent *in situ* hybridization. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 62, p. 224-7, 1993c.

IANNUZZI, L. Standard karyotype of the river buffalo (*Bubalus bubalis* L., 2n=50). Report of the committee for the standardization of banded karyotypes of the river buffalo. **Cytogenetics and Cell Genetics**, n. 67, p. 102-13, 1994.

IANNUZZI, L. et al. Assignment of genes coding for leukocyte surface molecules to river buffalo chromosomes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 52, p. 435-43, 1996a.

IANNUZZI, L. et al. High-resolution FISH mapping of β -defensin genes to river buffalo and sheep chromosomes suggests a chromosome discrepancy in cattle standard karyotypes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 75, p. 10-3, 1996b.

IANNUZZI, L. et al. Eight molecular markers from bovine syntenic groups U2, U5, U24, U14, U12, U28, X and Y were fluorescence *in situ* mapped to eight river buffalo chromosomes. **Chromosome Research**, v. 6, p. 656-9, 1998.

IANNUZZI, L. et al. Comparative FISH-mapping of six expressed gene loci to river buffalo and sheep chromosomes. **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 84, p. 161-3, 1999.

IANNUZZI, L. et al. FISH-mapping of 31 type I loci (Texas markers) to river buffalo chromosomes. **Chromosome Research**, v. 9, p. 339-42, 2001a.

IANNUZZI, L. et al. Twelve loci from HSA10, HSA11 and HSA20 were comparatively FISH-mapped on river buffalo and sheep chromosomes. **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 93, p. 124-6, 2001b.

IANNUZZI, L. et al. Comparative FISH-mapping in river buffalo and sheep chromosomes: assignment of forty autosomal type I loci from sixteen human chromosomes. **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 94, p. 43-8, 2001c.

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. A et al. Comprehensive Genetic Map of the Cattle Genome Based on 3802 Microsatellites. **Genome Research**, v. 14, p. 1987-98, 2004.

KHATKAR, M. S. et al. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. **Genetics Selection Evolution**, v. 36, p. 163-90, 2004.

KIGUWA, S. L. et al. A horse whole-genome-radiation hybrid panel: chromosome 1 and 10 preliminary maps. **Mammalian Genome**, v. 11, p. 803-5, 2000.

KOONIN, E. V.; ARAVIND, L.; KONDRASHOV, A. S. The impact of comparative genomics on our understanding of evolution. **Cell**, v.101, p. 573-6, 2000.

KUMAR, S. et al. Genetic variation and relationships among eight Indian riverine buffalo breeds. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 593-600, 2006.

MONTGOMERY, G. W. Genome mapping in ruminants and map locations for genes influencing reproduction. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 5, p. 25-37, 2000.

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. 53, p. 1-8, 1999.

MURPHY, W. J. et al. A Radiation Hybrid Map of the Cat Genome: Implications for Comparative Mapping. **Genome Research**, v. 10, p. 691-702, 2000.

MURPHY, W. J.; STANYON, R.; O'BRIEN, S. J. Evolution of mammalian genome organization inferred from comparative gene mapping. **Genome Biology**, v. 2, p.1-5, 2001.

NANDA, A. S.; NAKAO, T. Role of buffalo in the socioeconomic development of rural Asia: current status and future prospectus. **Animal Science Journal**, v. 74, p. 443-55, 2003.

NAVANI, N. et al. A set of cattle microsatellite DNA markers for genome analysis of riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Genetics**, v. 33, p. 149-54, 2002.

NCBI. National Center for Biotechnology Information.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Acesso em: 18 Janeiro 2007.

O'BRIEN, S. J. et al. The promise of comparative genomics in mammals. **Science**, v. 286, p. 458-81, 1999.

OLSEN, H. G. et al. A Genome Scan for Quantitative Trait Loci Affecting Milk Production in Norwegian Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 3124-30, 2002.

OTHMAN, E. O. Chromosome and gene mapping homology between river buffalo, cattle and sheep using molecular markers. **Biotechnology**, v.2, p. 119-25, 2004.

PLANTE, Y. et al. Detection of Quantitative Trait Loci Affecting Milk Production Traits on 10 Chromosomes in Holstein Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1516-24, 2001.

PRIAT, C. et al. A whole-genome radiation hybrid map of the dog genome. **Genomics**, v. 54, p. 361-78, 1998.

SCHIBLER, L. et al. Comparative Gene Mapping: A Fine-Scale Survey of Chromosome Rearrangements between Ruminants and Humans. **Genome Research**, v. 8, p. 901-15, 1998.

SCHULMAN, N. F. et al. Quantitative trait Loci for Health Traits in Finnish Ayrshire Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 443-9, 2004.

SILVA, M. S. T. et al. Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores. **PRONAF**. Agosto 2003.

TONHATI, H. et al. Melhoramento genético em bubalinos. Programa Vale do Ribeira, SP. **Simposio nacional de melhoramento genético animal**, Ribeirao Preto-SP, p.69-72, 1996.

TONHATI, H. et al. Parâmetros para produção de leite, gordura e proteínas em bubalinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p.2051-56, 2000.

VAN ETTEN, W. J. et al. Radiation hybrid map of the mouse genome. **Nature Genetics**, v. 22, p. 384-7, 1999.

WHITE, R. et al. Linkage maps of human chromosomes. **Genome**, v. 31, p. 1066-72, 1989.

WILLIAMS, J. L. et al. A bovine whole-genome radiation hybrid panel and outline map. **Mammalian Genome**, v. 13, p. 469-74, 2002.

WOMACK, J. E. Genome analysis in farm animals. **Genomes of Plants and Animals**. 21 st Stadler Genetics Symposium, p. 127-37, 1996.

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. 1699-705, 2005.

WURSTER, D. H.; BENIRSCHKE, K. Chromosome studies in the super family Bovoidea. **Chromosoma**, v. 25, p. 152-71, 1968.

YANG, Y. P.; WOMACK, J. E. Parallel radiation hybrid mapping: a powerful tool for high-resolution genomic comparison. **Genome Research**, v. 8, p. 731- 6, 1998.

Autorizo a reprodução deste trabalho
São José do Rio Preto, 27/03/2007

Nedenia Bonvino Stafuzza