



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José do Rio Preto

Programa de Pós-Graduação em Genética

---

**CONSTRUÇÃO DE UM MAPA RH DO  
CROMOSSOMO 1 DO BÚFALO DE RIO (*Bubalus  
bubalis*) E ANÁLISE COMPARATIVA COM OS  
GENOMAS BOVINO, HUMANO E DE OUTROS  
MAMÍFEROS.**

**Melissa Nunes Miziara**

**Tese apresentada para  
obtenção do título de Doutor  
em Genética.**

---

**São José do Rio Preto – SP**

**CONSTRUÇÃO DE UM MAPA RH DO  
CROMOSSOMO 1 DO BÚFALO DE RIO (*Bubalus  
bubalis*) E ANÁLISE COMPARATIVA COM OS  
GENOMAS BOVINO, HUMANO E DE OUTROS  
MAMÍFEROS.**

**Melissa Nunes Miziara**

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

**Orientadora: Profa Dra M. Elisabete J. Amaral**

Miziara, Melissa Nunes

Construção de um Mapa RH do cromossomo 1 do búfalo de rio (*Bubalus bubalis*) e análise comparativa com os genomas bovino, humano e de outros mamíferos / Melissa Nunes Miziara. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2008.

92 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Maria Elisabete Jorge Amaral

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

1. Genética animal. 2. Mapeamento cromossômico. 3. Cromossomo 1. 4. Búfalo de rio. 5. Sintonia. 6. Blocos homólogos – Genética molecular. I. Amaral, Maria Elisabete Jorge. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 575.116.4

## **MELISSA NUNES MIZIARA**

### **Construção de um Mapa RH do Cromossomo 1 do Búfalo de Rio (*Bubalus bubalis*) e Análise Comparativa com os Genomas Bovino, Humano e de Outros Mamíferos.**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

#### **BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Herminone Elly Melara de Campos Bicudo  
Professora Emérita  
UNESP – São José do Rio Preto  
Presidente

Profa. Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano  
Pesquisadora  
EMBRAPA – São Carlos

Profa. Dra. Eliana Morielle Versute  
Professora Assistente Doutora  
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Artur Luiz da Costa da Silva  
Docente  
UFPA – Belém

Profa. Dra. Mônica Regina Vendrame Amarante  
Professora Assistente  
UNESP- Botucatu

São José do Rio Preto, 29 de fevereiro de 2008.

“Ao meu marido André, que me apoiou em todas as minhas decisões...”

## ***Meus agradecimentos***

À minha orientadora Elisabete, que me abriu as portas para a Ciência, permitindo que eu conhecesse a realidade da vida acadêmica e os frutos que ela pode nos trazer, como a satisfação e o orgulho pela pesquisa científica.

À CAPES, por ter me concedido uma bolsa de estudos para realização deste trabalho.

A Rosemar e Rosana, da Seção de Pós-Graduação, por auxiliarem gentilmente no cumprimento de minhas atividades acadêmicas.

À minha amiga Paola, que sempre me apoiou no trabalho e na minha vida, com conselhos e incentivos que me fazem pôr os pés no chão nos momentos mais difíceis. Obrigada por sua amizade.

À Nedenia que, de colega de trabalho passou à grande amiga, me mostrando que a vida é cheia de tropeços, mas também repleta de sucessos. Sempre me ajudando e me incentivando. Sem você, eu não teria conseguido. Obrigada por sua amizade e disponibilidade em todos os momentos em que precisei.

Ao meu marido André, que sempre me estimulou a trabalhar por meus objetivos, mesmo que isso nos trouxesse saudades, desesperança e até tristeza. Você me ensinou que a vida é uma luta constante pelos nossos objetivos. Obrigada pelo amor, companheirismo e paciência. Marido! Passemos agora para uma próxima fase!

Aos meus pais, que sempre me aconselharam, incentivaram e apoiaram nessa empreitada. Obrigada pelo carinho, confiança e educação moral que me deram. Vocês estão sempre em meus pensamentos.

À minha avó Olga, que reza todos os dias pelo meu sucesso.

Obrigada a todos pelo carinho, amizade e consideração.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação,  
abraçar a vida com paixão, perder com classe  
e vencer com ousadia, porque o mundo  
pertence a quem se atreve e a vida é “muito”  
pra ser insignificante”

***Charles Chaplin***

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

**Leonardo da Vinci**

# Resumo

MIZIARA, M. N. Construção de um Mapa RH do Cromossomo 1 do Búfalo de Rio (*Bubalus bubalis*) e Análise Comparativa com os Genomas Bovino, Humano e de Outros Mamíferos. São José do Rio Preto, 2008. 92p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

O cromossomo 1 do genoma bubalino (BBU1), o maior cromossomo do cariótipo do búfalo de rio, é um cromossomo submetacêntrico que possui homologia com os cromossomos 1 e 27 do genoma bovino. Neste trabalho, apresentamos o primeiro mapa RH para este cromossomo, construído por meio da utilização de um painel de células somáticas híbridas irradiadas búfalo-roedor, denominado BBURH<sub>5000</sub>. O mapa consistiu em 69 marcadores derivados dos cromossomos bovinos BTA1 e BTA27, incluindo 48 genes codificantes, 17 microssatélites e quatro ESTs distribuídos em dois grupos de ligação. A frequência de retenção observada entre os marcadores variou de 17.8% a 52.2%. A ordem dos marcadores dentro dos grupos de ligação foi, em sua maioria, idêntica a ordem encontrada nos mapas RH e de sequência do genoma bovino. A análise comparativa do mapa RH obtido para BBU1 com o genoma humano revelou oito blocos homólogos de sintenia entre BBU1 e segmentos correspondentes dos cromossomos humanos 3, 4, 8 e 21, sendo a maioria deles rearranjados quanto à ordem dos genes e orientação dos blocos. Os blocos de sintenia também foram comparados com os genomas de outras espécies de mamíferos, como boi, chimpanzé, cachorro e cavalo. Considerando a inexistência de mapas de ligação para o búfalo de rio, o mapa RH obtido neste estudo fornece dados essenciais para os estudos comparativos deste cromossomo com qualquer outra espécie de mamífero.

Key-words: búfalo de rio – BBU1 – mapeamento RH

***Abstract***



MIZIARA, M. N. Construction of a radiation hybrid map for river buffalo chromosome 1 (BBU1) and comparative analysis with bovine, human and other mammal genomes. São José do Rio Preto, 2008. 92p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

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. The RH map was constructed based on the analysis of a recently developed river buffalo-hamster whole genome radiation hybrid panel (BBURH<sub>5000</sub>). 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 sequence and RH maps. Comparative analysis between BBU1-RH<sub>5000</sub> and the human genome revealed eight homologous synteny blocks corresponding to HSA3q, HSA4q, HSA8p and HSA21q. Most of the blocks showed rearrangements in the gene order and in the orientation of the synteny blocks. The synteny blocks were also compared with other mammalian genomes, such as bovine, chimpanzee, dog and horse. Considering that a genetic linkage map does not exist for river buffalo, the radiation hybrid map generated in this study provides valuable data for comparative mapping of BBU1 chromosome.

Key-words: river buffalo – BBU1 – RH mapping

## SUMÁRIO

---

### **CAPÍTULO I – Construção de um mapa RH do cromossomo 1 do búfalo de rio (*Bubalus bubalis*) utilizando células somáticas híbridas irradiadas.**

Introdução	13
Objetivos	22
Artigo publicado na Revista <i>Cytogenetics and Genome Research</i>	24
Discussão	30
Conclusões	34

### **CAPÍTULO II – Análise comparativa entre o mapa do cromossomo 1 bubalino e seus cromossomos correspondentes nos genomas bovino, humano e de outros mamíferos.**

Introdução	37
Objetivo	41
Metodologia	43
Resultados e Discussão	45
Conclusões	52

### **Referências Bibliográficas**

55

**Anexo A** – Trabalho publicado nos Anais do I Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal 64

**Anexo B** – Artigo publicado na Revista *Animal Genetics* 72

**Anexo C** – Artigo publicado na Revista *Cytogenetics and Genome Research* 77

**Anexo D** – Artigo publicado na Revista *Animal Genetics* 85

---

**Capítulo 1:** Construção de um mapa RH do cromossomo 1 do búfalo de rio (*Bubalus bubalis*) utilizando células somáticas híbridas irradiadas.

---

---

# Introdução

O búfalo é um animal originário da Ásia e da África que se difundiu para praticamente todos os continentes, representando até o ano de 2005 uma população mundial de aproximadamente 168 milhões de cabeças (Borghese e Mazzi, 2005). Esse rebanho está dividido em duas espécies: os búfalos asiáticos (*Bubalus bubalis*) e os búfalos africanos (*Syncerus caffer*), sendo o búfalo de rio uma subespécie de búfalo asiático encontrada em diversos países da Ásia, África, Europa e América do Sul, incluindo o Brasil (Iannuzzi et al., 1994a).

O rebanho bubalino brasileiro começou a se formar a partir do final do século XIX, quando animais da Ásia, Europa e Caribe foram trazidos em pequenos lotes para o norte do país (Bernardes, 2007). Hoje, o Brasil detém o maior rebanho de búfalos das Américas, calculado em 1 milhão de cabeças e um crescimento anual de 3%, com estimativas de que dentro de 30 anos o país terá um rebanho de cerca de 50 milhões de animais (ANUALPEC, 2006; Bernardes, 2007). As raças encontradas aqui são Jafarabadi, Murrah, e Mediterrâneo, pertencentes ao grupo dos búfalos de rio, além da raça Carabao, representante dos búfalos de pântano (Borghese e Mazzi, 2005; Bernardes, 2007).

O cariótipo do búfalo de rio (*Bubalus bubalis*) consiste de 24 pares de autossomos e um par de cromossomos sexuais ( $2N=50$ ) (Iannuzzi et al., 1994a). Assim como o bovino (*Bos taurus*) - que possui 29 pares de autossomos acrocêntricos e um par de cromossomos sexuais - o búfalo de rio pertence à família Bovidae, a mais diversa das nove famílias da ordem Artiodactyla (Vaughan, 1986), da qual também fazem parte os ovinos, suínos, eqüinos, entre outros.

Dos 24 pares de cromossomos autossômicos do genoma bubalino, 19 são acrocêntricos e 5 são metacêntricos (Iannuzzi et al., 1994a). Estudos citogenéticos envolvendo os genomas bovino e bubalino mostram que os cinco cromossomos

metacêntricos de búfalo são resultantes de translocações por fusões cêntricas entre cromossomos acrocêntricos do genoma bovino, sendo elas: BBU1 = BTA1/BTA27; BBU2 = BTA2/BTA23; BBU3 = BTA8/BTA19; BBU4 = BTA5/BTA28 e BBU5 = BTA16/BTA29 (El Nahas et al., 2001; Iannuzzi et al., 2003). Estas translocações explicam o fato de que cada braço dos cromossomos metacêntricos do genoma bubalino apresenta correspondência com cromossomos acrocêntricos de bovino (El Nahas et al., 2001).

De acordo com Moreira e colaboradores (1994) e Bernardes (2007), algumas das características inerentes desta espécie são: a adaptabilidade a diversos ambientes, precocidade, vida útil até os 15 anos (5 anos a mais que o gado doméstico), aptidão para o consumo de alimentos não concorrentes com o de outras espécies, elevada taxa de produtividade em leite e carne, altas taxas de natalidade e mortalidade inferior a 3% ao ano. Análises da carne bubalina e bovina revelam que a carne de búfalo possui 40% menos colesterol, 12 vezes menos gordura, 55% menos calorias, 11% mais proteína e 10% mais sais minerais, sendo, portanto, mais indicada para a saúde humana (CPATU-Embrapa, 2006). O leite de búfala também apresenta composição superior em relação ao leite de vaca, em 43,8% nos sólidos totais, 43,6% em gordura, 41,5% de proteína, 2,4% de lactose e 42% de cálcio (CPATU-Embrapa, 2006).

Diante deste panorama, o búfalo de rio representa uma fonte crescente de produção pecuária e uma espécie com vantagens produtivas e reprodutivas que elevam seu *status* econômico no cenário agropecuário brasileiro e mundial. Dessa forma, o conhecimento do genoma desta espécie torna-se necessário para a identificação e a manipulação de genes responsáveis por características

economicamente importantes, que contribuirão para o melhoramento genético mais efetivo desses animais.

Para identificar e manipular um gene de interesse econômico é necessário inicialmente localizar sua seqüência de bases no genoma estudado. Este primeiro passo é obtido por meio da estratégia denominada mapeamento genômico que, além de localizar qualquer tipo de marcador molecular em uma região cromossômica específica no genoma, determina a ordem linear desses marcadores em relação a outras encontradas no mesmo cromossomo (Rexroad, 1998; Miziara e Amaral, 2007). Aliando-se os mapas genômicos aos estudos de segregação de características de interesse econômico em populações, é possível associar tais caracteres a potenciais genes candidatos que posteriormente poderão ser manipulados para diferentes estudos adicionais (Womack, 2005).

O mapeamento genômico comparativo é um método de análise de genomas que busca ganhar conhecimentos em uma espécie usando os conhecimentos do genoma de outra espécie (Yang e Womack, 1998; Rexroad et al., 1999; Goldammer et al., 2002; Womack, 2005). Estes estudos comparativos são baseados na observação de que genes ou quaisquer tipos de marcador molecular que estejam fisicamente próximos no genoma de uma espécie, geralmente também apresentam-se próximos em outras espécies relacionadas (Nadeau e Sankoff, 1998). Entre os mamíferos, espera-se que o mapeamento genômico comparativo auxilie numa maior compreensão da diversidade fisiológica, fenotípica e metabólica, tanto em níveis moleculares quanto sistêmicos (Band et al., 2000; Larkin et al., 2003). Dessa forma, genomas seqüenciados de mamíferos representam a base para estudos que permitirão compreender as diferenças moleculares relacionadas com a diversidade dos organismos dentro desta classe de vertebrados (O'Brien et al., 2001).

O genoma bovino possui atualmente 17.254 marcadores mapeados no genoma, incluindo genes, Etiquetas de Seqüências Expressas (ESTs) e seqüências repetitivas do tipo microssatélite, totalizando um tamanho de 2434 Mb (megabases) (Snelling et al., 2007). Comparando-se esses números aos dados de mapeamento do genoma do búfalo de rio, observa-se uma defasagem no estudo do genoma desta espécie que, até 2006, apresentava somente 302 marcadores mapeados (El Nahas et al., 2001; Iannuzzi et al., 2003; Di Meo et al., 2005; 2006). Tendo em vista a extensiva conservação cromossômica observada entre bovino e búfalo de rio, o mapa físico do genoma bovino pode potencialmente ser utilizado como fonte de marcadores para o desenvolvimento de mapas genômicos de búfalo (El Nahas et al., 2001), especialmente considerando que o genoma bovino é o mais amplamente estudado entre os animais de interesse econômico.

Embora alguns trabalhos tenham localizado genes e microssatélites em cromossomos específicos do búfalo de rio, por meio de métodos como hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e/ou células somáticas (El Nahas et al., 2001; Iannuzzi et al., 2003; Di Meo et al., 2005; 2006), a criação de um mapa de alta resolução do genoma bubalino faz-se essencial para possibilitar o estudo detalhado e a manipulação de genes envolvidos em características economicamente importantes. Além disso, as informações geradas a partir da construção de um mapa saturado de marcadores poderão ser utilizadas em programas de melhoramento genético desta espécie e na seleção de genes candidatos em regiões contendo *loci* associados a características quantitativas (*Loc*i de Característica Quantitativa - QTLs).

Recentemente, o Laboratório de Genômica Comparativa – IBILCE/UNESP, construiu uma ferramenta genômica que permite a construção de mapas de alta resolução do genoma bubalino – o painel de células somáticas híbridas irradiadas –

BBURH<sub>5000</sub> (Amaral et al., 2007). Por meio dessa ferramenta, 254 marcadores já foram mapeados nos cromossomos bubalinos 3 e 10 (Amaral et al., 2007), 6 (Stafuzza et al., 2007), 7 (Goldammer et al., 2007a) e X (Ianella et al., 2008).

A estratégia de mapeamento de genomas utilizando painéis de células somáticas híbridas irradiadas foi primeiramente descrita por Goss e Harris (1975) e redescoberta por Cox e colaboradores (1990). Neste método, uma dose de radiação é aplicada nas células do genoma de interesse, denominadas doadoras, com a função de quebrar, ao acaso, seus cromossomos em múltiplos fragmentos (Cox et al., 1990). Estes fragmentos são posteriormente incorporados ao genoma de uma célula receptora mutante, geralmente de roedor, por meio de um processo de fusão celular. Cada clone gerado a partir desta fusão contém um único conjunto de fragmentos cromossômicos da célula doadora incorporado ao genoma da célula receptora, que atinge a estabilidade após sucessivos processos de divisão celular (Miziara e Amaral, 2007).

Os clones híbridos são posteriormente testados quanto à presença ou ausência de marcadores de DNA do genoma de interesse. Esses dados são avaliados baseando-se na hipótese de que quanto menor a distância física entre dois *loci* no cromossomo, maior a probabilidade dos mesmos serem mantidos juntos durante o processo de fragmentação do genoma (Agarwala et al., 2000; Chowdhary e Raudsepp, 2005). Dessa forma, são gerados os mapas denominados RH (*Radiation Hybrid Maps*), que mostram a posição e a ordem física dos marcadores nos respectivos cromossomos.

A estratégia de mapeamento RH vem sendo aplicada de maneira crescente aos estudos do genoma de animais, principalmente aqueles de interesse econômico. Mapas RH já foram construídos para os genomas de camundongo (McCarthy et al.,

1997), bovino (Womack et al., 1997), cachorro (Priat et al., 1998), porco (Hawken et al., 1999), cavalo (Kiguwa et al., 2000), gato (Murphy et al., 1999) e búfalo de rio (Amaral et al., 2007).

Considerando que esta estratégia permite localizar qualquer seqüência de DNA sem a necessidade de polimorfismo ou acompanhamento de heterozigotos em famílias (pré-requisitos do mapeamento por segregação meiótica), é possível construir mapas contendo genes codificantes, possibilitando estudos comparativos entre genomas de diferentes espécies (Rexroad, 1999; Chowdhary e Raudsepp, 2005; Miziara e Amaral, 2007).

O cromossomo 1 bubalino (BBU1) é o maior cromossomo metacêntrico do genoma do búfalo de rio. Estudos citogenéticos mostram que o braço curto (BBU1p) é correspondente ao cromossomo 27 bovino (Iannuzzi et al., 1990; Iannuzzi et al., 1996a; 1996b; El Nahas et al., 1997; Iannuzzi et al., 1998; 2000a; Ramadam et al., 2000; El Nahas et al., 2001; Iannuzzi et al., 2001a; 2003) e o braço longo (BBU1q) ao cromossomo 1 bovino (Iannuzzi et al., 1990; 1994b; 1996a; El Nahas et al., 1996; 1997; de Hondt et al., 1997; Iannuzzi et al., 1998; El Nahas et al., 2001; Iannuzzi et al., 2001a; 2003). Até 2006, BBU1 possuía 23 marcadores (13 genes e 10 microssatélites) mapeados por meio de FISH e/ou células somáticas (Iannuzzi et al., 2003).

De acordo com os últimos mapas do genoma bovino publicados (Jann et al., 2006; Snelling et al., 2007), o cromossomo 1 bovino (BTA1) possui 1.026 marcadores, enquanto que o cromossomo 27 (BTA27) possui 289 marcadores mapeados. A utilização desta grande quantidade de informações proveniente do genoma bovino permite a utilização desses mapas no processo de seleção dos marcadores a serem mapeados no cromossomo 1 bubalino.

É importante ressaltar que os cromossomos bovinos BTA1 e BTA27 possuem genes e regiões com QTLs associadas à produção e qualidade de leite, reprodução e doenças (Bovine QTL Viewer, 2008).

No BTA1 existem evidências de duas regiões relacionadas com a produção de leite: a primeira, onde está localizado o marcador CSSM19, e a segunda onde se encontram os marcadores TGLA49, SOD1, RM095 e TGLA57 (Georges et al., 1995; Viitala et al., 2003). Existem também duas regiões associadas a características de composição do leite (porcentagem de gordura e proteína): o intervalo cromossômico entre os marcadores BMS527 e BMS4030 e a região contendo os genes BBX, TRAD, APOD, ALCAM e TACTILE (Georges et al., 1995; Casas et al., 2004). Além dessas importantes regiões, também foram mapeados no BTA1 genes de importância metabólica, tais como o gene IL12A, associado à resposta imune, o gene FOXL2, relacionado ao desenvolvimento do folículo ovariano e o gene MX1, cuja função está ligada à resposta a agentes virais (Gene Ontology, 2008).

O BTA27, por sua vez, também possui importantes regiões associadas a características de interesse econômico, como por exemplo, uma região com genes relacionados a caracteres de produção e composição de leite (Viitala et al., 2003) e uma outra região associada com a susceptibilidade à mastite, uma doença prejudicial aos rebanhos destinados à produção de leite (Kuhn et al., 2003; Goldammer et al., 2004). Além dessas regiões, este cromossomo também possui genes responsáveis por características interessantes, como por exemplo, o gene MTNR1A, que está relacionado com alterações na sazonalidade reprodutiva em mamíferos (Messer et al., 1997), e o gene ADAM2, que codifica uma subunidade da fertilina, uma glicoproteína que atua nas interações óvulo-espermatozóide (Eto et al., 2002).

Diante da relevância dos genes presentes nos cromossomos 1 e 27 bovinos, potenciais genes candidatos poderão ser indicados ao BBU1, possibilitando estudos adicionais dos mesmos em búfalo de rio. Além disso, a geração de um mapa comparativo entre búfalo e bovino permite avanços no conhecimento sobre a evolução cariotípica e os rearranjos cromossômicos que acompanharam a evolução dos genomas dessas espécies.

# Objetivos



Considerando a contribuição deste estudo para o conhecimento dos genes do cromossomo 1 bubalino e a identificação de rearranjos cromossômicos entre BBU1 e seus cromossomos correspondentes no genoma bovino, o presente trabalho teve como objetivos:

- Construir um mapa do tipo RH do cromossomo 1 do búfalo de rio (*Bubalus bubalis*) utilizando o painel BBURH<sub>5000</sub>, integrando-se marcadores do tipo microssatélite, genes e Etiquetas de Sequências Expressas (ESTs),
- Construir um mapa comparativo deste cromossomo evidenciando a conservação entre BBU1 e os cromossomos correspondentes no genoma bovino.

**Artigo publicado na Revista  
*Cytogenetics and Genome  
Research* – ISSN 1424-8581 –  
Basel – Switzerland, 2007.**

---

---

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

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

<sup>a</sup>Departamento Biologia, UNESP – São Paulo State University, IBILCE, São Jose Rio Preto, SP (Brazil)

<sup>b</sup>Research Unit Molecular Biology, Research Institute for the Biology of Farm Animals (FBN),

Dummerstorf (Germany); <sup>c</sup>Department of Health and Human Services, National Center for

Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD, Departments of <sup>d</sup>Animal Science and

<sup>e</sup>Veterinary 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 cR<sub>5000</sub>. The RH map was constructed based on analysis of a recently developed

river buffalo-hamster whole genome radiation hybrid (BBURH<sub>5000</sub>) 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 banded 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 MgCl<sub>2</sub>, 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](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 (BBURH<sub>5000</sub>) 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).

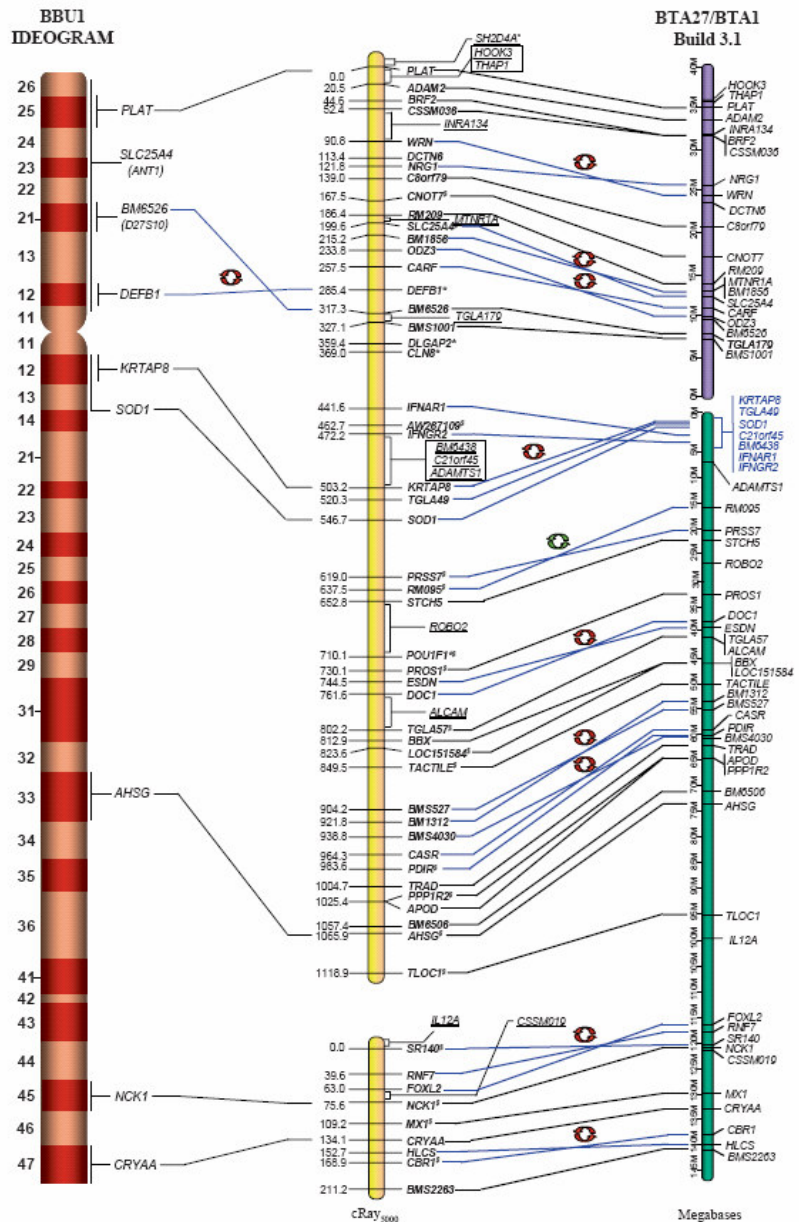
This first RH map from BBU1, including 48 coding genes and four ESTs, is the starting point for the construction of a high resolution comparative map for this river buffalo chromosome. With our data we were able to generate a large linkage group (LG1) including markers from both bovine homologs (BTA27 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 BBURH<sub>5000</sub> 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	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')	GenBank Accession	Ref./ UNISTS ID	Tm (°C)
<i>BBU1 linkage group LG1</i>								
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	CTCTGCATCCAGCACATA	GGGCAATGGCATTGTTAAT	NM_174228	§	58
BRF2	gene	31.1	44.6	TGAGCTCGTGGAAGACTCG	CGTCACTGAAGGTGGTCGTA	NM_001015582	§	58
CSSM036	MS	34.4	52.4	GGATAACTCAACCACAGTCTCTG	AAGAAGTACTGGTTGCCAATCGTG	U03827	250971	65
INRA134	MS	34.4	placed	CCAGGTGGGAATAATGTCTCC	TTGGGAGCCTGTGGTTTATC	X73125	250829	59
WRN	gene	35.5	90.8	AACGCCATATATAGCAAGAC	GATCCAAAACAAAGCAAGAA	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	TCTGAAAAGTGAACAGCCAGGT	TGACGCCTATGGAGATGATG	AW632623	§	58
CNO17	gene	38.8	167.5	CCACCCAGTTCACAGCATGA	GGAAATATGTGACCAGACCAGAG	AW289341	278215	64
RM209	MS	33.3	186.4	GTAGAAGTTAGTCACTGTCATCC	CCTCAGAGCCCATACATTTCC	U32921	250931	65
MTNR1A	gene	34.4	placed	TTTCAACAGCTGCCTCAATG	GGAGAGGGTTTGGCTTTAAT	U73327	278796	61
SLC25A4	gene	34.4	199.6	CATTGATTGCGTGGTGAGAA	ATAATGATGCCCTGGACCGA	M24102	<sup>a</sup>	65
BM1856	MS	38.8	215.2	GGCCTCAAGTTTCATCCATG	CATCAGCATGAAGCAACCC	G18402	53060	65
ODZ3	gene	33.3	233.8	TGACCAACGTGACATTTCCA	TTGAACATGGTGTAGAACGA	XM_865074	§	58
CARF	gene	27.7	257.5	AGCACTGCCTCTCAGGTGAC	CGATCCACTTTGTGTCTGG	XM_590926	§	58
DEFB1	gene	30.0	285.4	GGAAGACAGGAGGCTCTGG	CCTCACGTTTTTCAAGACCAC	NW_001501821	251704	64
BM6526	MS	37.7	317.3	CATGCCAAAACATATCCAGC	TGAAGGTAGAGAGCAAGCAGC	G18454	28213	65
TGLA179	MS	40.0	placed	CTTTAATCAGCACACAGCTTCCCA	ATATGTGTAGAAAGTTGGTCAACC	CM000203	251232	65
BMS1001	MS	42.2	327.1	GAGCCAAATTCCTACAATTCCTT	AGACATGGCTGAAATGACTGA	G18605	44386	65
DLGA2	gene	42.2	359.4	CGGACCTCCATCCACTCC	CGTCCTCGCTGCATAGTGG	XM_600714	§	58
CLN8	gene	46.6	369.0	CCCTTCATGTGTCCAATGC	ATCCAGGAGATGCAGGTGAA	XM_609353	§	58
IFNAR1	gene	37.7	441.6	TGAAGATAAGGCAATAATAC	TGAAGAGTTTTTCCAGATAA	BE217555	279374	54
AW267109	EST	45.5	462.7	ATGAAAGTCTTCTGTGCCATGC	TCAGTATTGCCACATGACATGC	AW267109	278038	60
IFNBR2	gene	51.1	472.2	AGACAAAGGCACAGCATTTCCAC	GATTTCAAAGGGAGAGCTGGGT	AW289292	278555	60
BM6438	MS	52.2	placed	TTGAGCACAGACAGACAGTGG	ACTGAATGCTCCTTTGTGTC	G18435	79562	63
ADAMTS1	gene	45.5	placed	CGACACAAGAGAGGAAAGATGG	CATCACTTTACCCGCTGCTATG	AW428596	277932	60
C21orf45	EST	47.7	placed	CCACCAAGGAAATCCAGCATA	TATCCAAGTACCTCCAGTCA	AW463565	278143	60
KRTAP8	gene	46.6	503.2	TTGCTGAAATACCCAGGGCA	ATGACAAGAGTCAATGAGCATGG	XM_001250875	<sup>b</sup>	59
TGLA49	MS	50.0	520.3	GGCAGGACTTCACTCTTTTCA	AGAAAAGGAATAATGAGACAGATTA	CM000177	239049	56
SOD1	gene	35.5	546.7	GTTTGGCCTGTGGTGTAAATGGAA	GGCCAAAATACAGAGATGAATGAA	NM_174615	<sup>c</sup>	56
PRSS7	gene	34.4	619.0	CCAAGGTTTCAAGAGTGGAT	GGCTGTGACATGAGCTTAC	U09859	278971	65
RM095	MS	41.1	637.5	TCCATGGGGTCCGAAACAGTGG	ATCCCTCCATTTGTGTGGAGTT	U32918	250928	58
STCH5	gene	38.8	652.8	TGATCTTCAGAACAGCTCATA	GTGAATGAATGTTTGGTGTGAG	AW267080	279153	56
ROBO2	gene	27.7	placed	GAATTGGCTGTGCTACTG	ACCTTTTGTGTGATCAGG	AW653888	279030	50
POU1F1	gene	34.4	710.1	GGCTGAAGAACTAACCTGGAG	TAGGAGAGCCTATCTGCATTGC	X12657	278932	52
PROS1	gene	30.0	730.1	GTACAGGTGGATTTGGATGAAG	GAGACGAACAGAGGTGAAGAACA	X12891	278968	52
ESDN	gene	26.6	744.5	ATTGGGCTAGACCGTGCATA	GGAACCCAGCACAGTTAAAGG	AW314878	278348	65
DOC1	gene	33.3	761.6	TTCAACAAGACAAGTTGCAG	CCCTTCCTTATCCGGTTTTAT	AW289233	278315	58
ALCAM	gene	28.8	placed	CTGGAGAGCAGAAAGATGGGAAA	TATCCAGGCACTGATCCACTGA	X73801	277962	65
TGLA57	MS	30.0	802.2	GCCTTTTAACTCCTCAGCTTGCTG	GCTTCCAAAACCTTACAATATGTAT	CM000177	250987	56
BBX	gene	34.4	812.9	CCAGTGAAGCGCCCTTAAAT	GACATGGACTCACTAGCATC	AW428450	278098	65
LOC151584	EST	30.0	823.6	ACCAATGCTGCTGCTAACT	ACTCCAGGCCTTGCATGAAT	AW352867	278663	65
TACTILE	gene	20.0	849.5	TTGTAGACTGCACTGGTGGAA	GGAGTCCATTGGAAGTATCTG	AW289280	279172	65
BMS527	MS	25.5	904.2	TCAGTGAAAGCAAGGAAATATCC	TCCATTCCCTTTGAATATCC	G18871	65219	60
BM1312	MS	30.0	921.8	CCATGTGTGCAACTCTGAC	GGAAATGTTACTGAACCTCTCCG	G18434	30885	54
BMS4030	MS	30.0	938.8	TGTACCCAACACAGGAGCAC	TGACAGAGGGACCCATATCC	G19083	74568	65
CASR	gene	23.3	964.3	CGGTGTGCTTCTGTGGTTAGGT	CAGGCTGTCTGCAAAAGTTCAGG	S67307	278154	65
PDIR	gene	24.4	983.6	AACTGTGGTTTGGGAGAATAC	GAAAGTTGACCTGAGTGCAAAAG	AW289373	278896	64
TRAD	gene	30.0	1004.7	GCGAGGAAAGGATAAAATC	ACATTTTCCAGTTCACC	AW353439	279211	62
APOD	gene	26.6	1025.4	GAAGATCCCAGTGAAGCTTTG	ATCAGCTCTCAGCTCCTTGT	AW357610	277980	51
PPP1R2	gene	26.6	1025.4	GCATCACTGCTGAATTCAGAC	GTCAGTGTTCAGTTCTAGCCAA	AW315482	278944	64
BM6506	MS	26.6	1057.4	GCACGTGGTAAAGAGATGGC	AGCAACTTGAGCATGGCAC	G18455	47201	63
AHSG	gene	27.7	1065.9	GTCCCACTTCTCATCTCTCCA	GGCAAGAGCACCTTCAAAAGTC	X16577	277947	60
TLOC1	gene	20.0	1118.9	CATAGCAGTTCTCTGATCTGA	GTGATCTTTCTACAGCAGCTTC	AW289224	279200	65
<i>BBU1 linkage group LG2</i>								
IL12A	gene	22.2	placed	AAAGTCAAGCTCTGCATCCT	GTTATGAGAGACCTCAGCATT	U14416	278561	58
SR140	gene	17.8	0.0	TACTACTGCCAGCAGATCCCA	CTGCATCTGTAGACCTGTG	AW289396	279143	58
RNF7	gene	24.4	39.6	CCTGTTCCTGTGCCAAACTTA	GGAGTTATTGAAGCGGTTCCGT	AW428600	279028	65
FOXL2	gene	25.5	63.0	TCCTCCGGACGACACTACAAA	GAAATGTGAAAACCCGGCAGCAG	AW267121	278443	65
CSSM019	MS	23.3	placed	TTGTGAGCAACTTCTGTATCTTT	TGTTTTAAGCCACCCAATTATTTG	U03794	251074	59
NCK1	gene	25.5	75.6	CGCTCTTCTTGTCTCTAA	TGCAGAAGTAACTAAGGTGG	AW425735	278818	58
MX1	gene	20.0	109.2	CGTAGTCTCTGCTGTCTTA	GGAAATGACCCCTTCTACAGTGT	U88329	278800	65
CRYAA	gene	27.7	134.1	CCTAGAAAGTGGGGCATCCAT	GGTCACTGTGAGGCTTTGCA	NM_174289	<sup>c</sup>	64
HLS3	gene	27.7	152.7	TGAGCAGTGGCTGCGTTTAT	AACAGCTTCTCCTCCGTGAATC	AW354578	278525	61
CBR1	gene	22.2	168.9	CCCTGAAGTGCAGCAGAAATG	CCCGTCTTTGTGCTTCCA	AW461769	278157	61
BMS2263	MS	23.3	211.2	AACCCAGTCAACCCAGCAAAAG	CACCCAGCCATCACTTC	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. <sup>a</sup> Li and Womack, 1997; <sup>b</sup> Harlizius et al., 1997; <sup>c</sup> 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*, *DEFB1*, *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).

## **Discussão**

O mapa RH do cromossomo 1 bubalino (BBU1-RH<sub>5000</sub>) foi construído com um total de 69 marcadores derivados dos cromossomos 1 e 27 do genoma bovino. Cinquenta e seis tiveram suas posições em centiRays (cR) definidas com *lod score* de 5.5 (denominados marcadores *framework*). Os demais 13 marcadores com suporte estatístico inferior a 5.5 (denominados marcadores *placed*) foram posicionados em intervalos entre marcadores *framework*, sem valores de distância em centiRays.

A análise estatística da genotipagem dos marcadores foi realizada utilizando-se os *softwares* rh\_tsp\_map versão 3.0 (Schäffer et al., 2007) e CONCORDE (Applegate et al., 1998) juntamente com QSOPT (<http://www2.isye.gatech.edu/~wcook/qsopt/>), que se baseiam no critério de máxima verossimilhança (*MLE - maximum likelihood estimate*) para a construção de um mapa consenso.

Os 69 marcadores foram distribuídos ao longo do BBU1 em dois grupos de ligação (LG1 e LG2), totalizando 1330.1 cR<sub>5000</sub>. O grupo de ligação 1 (LG1) englobou 58 marcadores (39 genes, quatro ESTs e 15 microssatélites), estendendo-se pelo braço curto e pela maior porção do braço longo do cromossomo, incluindo o centrômero, totalizando 1118.9 cR<sub>5000</sub>. Destes 58 marcadores, 47 foram indicados com posições em centiRays (*framework*) no mapa e 11 foram localizados em intervalos (*placed*). O grupo de ligação 2 (LG2) apresentou 11 marcadores (nove genes e dois microssatélites), ocupando a porção final do braço longo do cromossomo 1, totalizando 211.2 cR<sub>5000</sub>. Nove desses marcadores apresentaram posições em centiRays, enquanto dois foram indicados a intervalos.

A geração do mapa BBU1-RH<sub>5000</sub>, cuja densidade foi calculada em aproximadamente um *locus* para cada 19cR<sub>5000</sub>, resultou em um aumento expressivo do número de marcadores mapeados neste cromossomo (de 23 para 69).

Na tentativa de gerar uma avaliação preliminar da extensão do mapa BBU1-RH<sub>5000</sub> obtido em pares de base, foram comparados o primeiro e o último marcador de cada grupo de ligação nos mapas de seqüência de BTA1 e BTA27. No LG1, o intervalo entre os genes PLAT e TLOC1 corresponde a 1118.9 cR<sub>5000</sub> e nos mapas de seqüência de BTA1 e BTA27 equivale a 131,7Mb, enquanto que no LG2 o intervalo entre os marcadores SR140 e BMS2263 é de 211.2 cR<sub>5000</sub> e de 24Mb no mapa de seqüência de BTA1. Essa correspondência gerou uma correlação aproximada para LG1 e LG2 de 8.5 e 8.8 cR<sub>5000</sub> por megabase (Mb), respectivamente.

A freqüência de retenção (RF – *Retention Frequency*) para cada marcador foi calculada pela razão entre o número de linhagens celulares que apresentaram produto de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para o marcador e o número total de linhagens do painel RH (90 linhagens). Os valores de freqüência de retenção de cada marcador nas linhagens híbridas do painel BBU-RH<sub>5000</sub> apresentaram variação de 17,8% (SR140) a 52,2% (BM6438). Por apresentarem padrões de presença e ausência idênticos nas diferentes linhagens do painel, os genes APOD e PPP1R2 foram indicados a uma mesma posição no mapa.

Considerando a ausência de mapas de ligação do genoma bubalino, o mapa BBU1-RH<sub>5000</sub> foi comparado ao mapa citogenético da espécie (Iannuzzi et al., 2003) e ao mapa de seqüência dos cromossomos 1 e 27 do genoma bovino (NCBI – *Bos taurus* build 3.1).

O mapa citogenético do BBU1 apresenta 23 marcadores mapeados pelas tecnologias de células somáticas e/ou FISH (Iannuzzi et al., 2003). Deste total, nove marcadores (PLAT, SLC25A4, DEFB1, BM6526, KRTAP8, SOD1, AHSG, NCK1 e CRYAA) foram incluídos no mapa RH e auxiliaram na orientação dos grupos de

ligação. A localização do gene SLC25A4 nos mapas RH e citogenético não foi comparada porque este gene não foi localizado citogeneticamente em uma banda específica do braço curto do cromossomo. Observou-se ainda a inversão na ordem dos marcadores BM6526 e DEFB1 no mapa RH em relação ao mapa citogenético.

As comparações entre o mapa BBU1-RH<sub>5000</sub> e os mapas de seqüência do genoma bovino corroboraram os estudos citogenéticos que indicavam BBU1 como resultante da fusão cêntrica entre BTA1 e BTA27 (El Nahas et al., 2001; Iannuzzi et al., 2003).

Entre estes mapas foram identificadas dez alterações na ordem dos marcadores, sendo oito inversões no LG1 e duas no LG2. No entanto, essas alterações podem não representar rearranjos verdadeiros no cromossomo bubalino, uma vez que podem ser resultantes de erros no alinhamento da seqüência do genoma bovino. A adição de mais marcadores nas regiões onde essas inversões foram observadas poderá elucidar esta questão. Mesmo considerando as inversões, foi possível observar que a ordem dos marcadores dentro dos grupos de ligação de BBU1-RH<sub>5000</sub> corresponde, em sua maioria, à mesma ordem encontrada nos cromossomos 1 e 27 do genoma bovino.

A construção do mapa comparativo do cromossomo 1 (Miziara et al., 2007), assim como de outros cromossomos do genoma do búfalo de rio (Amaral et al., 2007; Stafuzza et al., 2007; Goldammer et al., 2007a; Iannella et al., 2008) representa um ponto de partida importante para a construção de mapas comparativos de alta resolução para todos os cromossomos do genoma bubalino.

## Conclusões



As conclusões obtidas no presente capítulo foram:

- Marcadores derivados dos cromossomos 1 e 27 bovinos, incluindo genes, microssatélites e ESTs, foram utilizados com sucesso no mapeamento do cromossomo 1 bubalino;
  
- Pela primeira vez o cromossomo 1 bubalino foi estudado com a utilização da tecnologia de mapeamento RH, onde 69 marcadores foram mapeados, integrando-se 48 genes, 17 microssatélites e 4 ESTs,
  
- A comparação entre o mapa BBU1-RH<sub>5000</sub> e os mapas de seqüência do BTA1 e do BTA27 revelou dez alterações na ordem dos marcadores, sendo oito inversões no LG1 e duas no LG2. Os demais marcadores apresentaram a mesma ordem nas duas espécies.

**Capítulo 2:** Análise comparativa entre o mapa do cromossomo 1 bubalino e seus cromossomos correspondentes nos genomas bovino, humano e de outros mamíferos.

# Introdução

A comparação entre genomas de espécies de mamíferos vem possibilitando o conhecimento mais detalhado a respeito da evolução dos cariótipos, dos mecanismos envolvidos nessa evolução e seu significado para a especiação, além de auxiliar na busca pelos fatores genéticos que distinguem organismos evolutivamente relacionados (Ferguson-Smith e Trifonov, 2007).

Uma das estratégias utilizadas na comparação de genomas é o mapeamento genômico comparativo, que utiliza informações de genomas altamente caracterizados para localizar seqüências de DNA em genomas pouco documentados, baseando-se na conservação existente entre os genomas de mamíferos (Goldammer et al., 2002; Womack, 2005).

A construção de mapas comparativos vem permitindo uma análise estrutural detalhada dos genomas de diferentes espécies, mostrando que organismos que se divergiram recentemente apresentam segmentos (blocos) de DNA homólogos contendo genes em posições relativamente idênticas (Brittanica Encyclopedia Online, 2008). O termo sintenia (do grego *syn* = junto/mesmo, *taenia* = fio) significa a ocorrência de *loci* no mesmo cromossomo. Dessa forma, se dois ou mais *loci* encontram-se na mesma ordem e no mesmo cromossomo em genomas de espécies relacionadas, define-se que essas espécies apresentam conservação de sintenia (Jaillon et al., 2004; Serov et al., 2005; Becker e Lenhard, 2007). A análise de conservação de sintenia entre mamíferos vem possibilitando desvendar a estrutura dos genomas deste grupo, por meio da identificação dos rearranjos cromossômicos que resultaram na evolução cariotípica e na diferenciação das espécies (Goldammer et al., 2002; Womack, 2005; Ferguson-Smith e Trifonov, 2007).

O mapeamento genômico utilizando painéis de células somáticas híbridas irradiadas (ou mapeamento RH) tem sido utilizado na construção de mapas

comparativos de alta resolução, integrando diferentes tipos de marcadores moleculares, dentre eles genes codificantes de proteínas, que são altamente conservados entre os genomas de mamíferos (Amaral et al., 2002; Womack, 2005). Adicionalmente, os mapas comparativos são a ferramenta necessária para a identificação de genes candidatos relacionados a características de interesse econômico, pois permitem a extrapolação da localização de genes de uma espécie para outra (Goldammer et al., 2002). Dentre os mamíferos, o mapa do genoma humano é o mais rico em informações, sendo amplamente utilizado em estudos comparativos envolvendo os genomas de mamíferos (Womack, 2005).

Considerando ainda que a diversidade genética requerida para a evolução dos cariótipos provém de rearranjos cromossômicos, a comparação entre os mapas dos cromossomos de diversas espécies de mamíferos fornece uma importante ferramenta para a compreensão dos mecanismos envolvidos na evolução cariotípica, identificando regiões conservadas e/ou rearranjadas entre os genomas (Villena, 2005; Ferguson-Smith e Trifonov, 2007).

A utilização de sondas de segmentos cromossômicos humanos para hibridizar no genoma bovino (Womack e Moll, 1986; Womack e Kata, 1995; Solinas-Toldo et al., 1995; Hayes, 1995; Chowdhary et al., 1996; Schlapfer et al., 1998) e no genoma bubalino (Iannuzzi et al. 1998; 2000a; 2000b; Di Meo et al., 2000; Iannuzzi et al., 2001a, 2001b), tem revelado conservação de sintenia entre esses genomas. Especificamente para o cromossomo 1 bubalino foram previamente identificadas, por meio de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), as seguintes homologias com o genoma humano: BBU1p com o cromossomo humano 8 e BBU1q com porções dos cromossomos humanos HSA3 e HSA21 (Iannuzzi et al., 1998; 2000a).

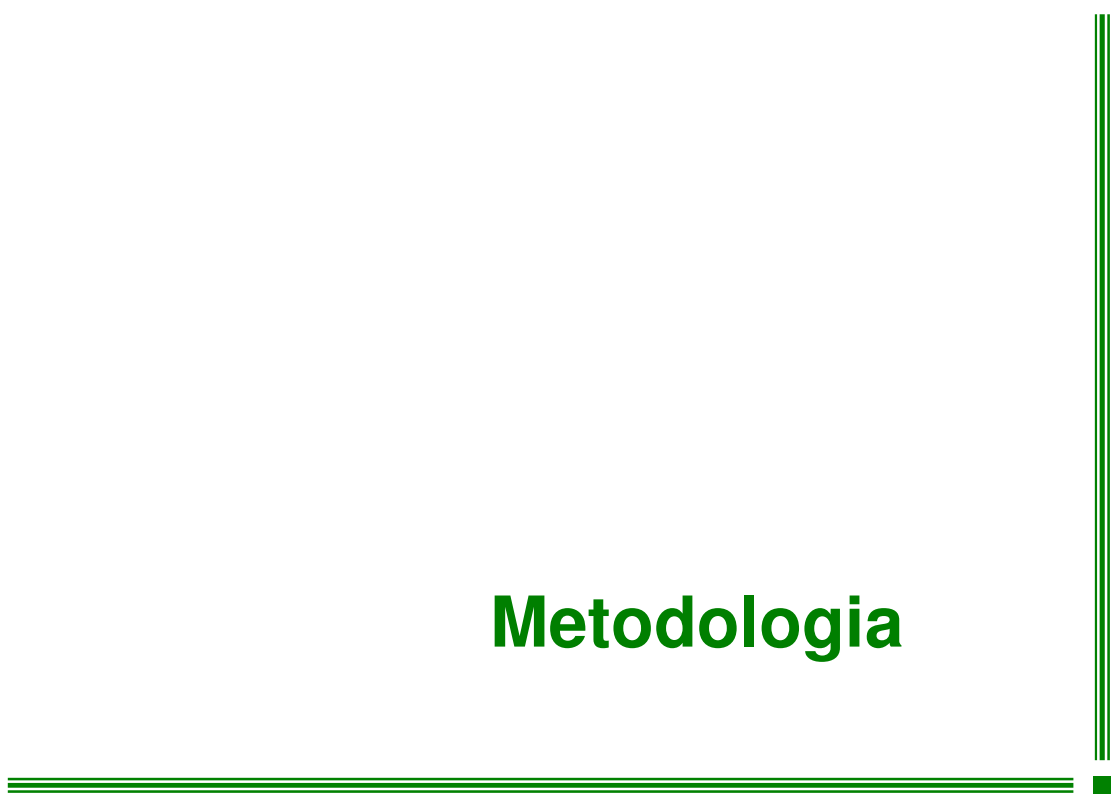
Dessa forma, a comparação entre o mapa de seqüência do genoma humano com o mapa RH do cromossomo 1 bubalino possibilitará a identificação de homologias adicionais e em maiores detalhes entre os cromossomos dessas duas espécies, além de adicionar conhecimentos sobre a evolução dos cromossomos homólogos a BBU1 em outros mamíferos, como cavalo, cachorro, entre outros.

**Objetivo**



A comparação entre o mapa do cromossomo 1 bubalino e seus cromossomos correspondentes no genoma humano e de outros mamíferos teve como objetivo evidenciar as porções de conservação de sintenia entre o cromossomo 1 bubalino e seus correspondentes no genoma humano e nos genomas de outras espécies de mamíferos, como bovino, chimpanzé, cachorro e cavalo.

# Metodologia



Para a análise comparativa dos blocos homólogos de sintonia entre BBU1 e o genoma humano, foram utilizados o mapa RH do cromossomo 1 bubalino (BBU1-RH<sub>5000</sub>) (Miziara et al., 2007) e os mapas de seqüência do genoma humano (NCBI *Homo sapiens* – build 36.2). Os mapas de seqüência dos cromossomos 1 e 27 do genoma bovino (NCBI – *Bos taurus* build 3.1) foram utilizados como referência de um genoma bovídeo.

Foram selecionados no mapa BBU1-RH<sub>5000</sub> os genes codificantes de proteínas com posições em centiRays que também apresentaram posição em megabases (Mb) nos mapas de seqüência do genoma humano. Os blocos homólogos de sintonia foram identificados a partir da observação da ordem dos genes e da orientação dos blocos em comum entre as duas espécies. Foram considerados blocos homólogos com conservação de sintonia aqueles que apresentaram a mesma ordem dos genes, independente da orientação do bloco no segmento cromossômico (Jaillon et al., 2004).

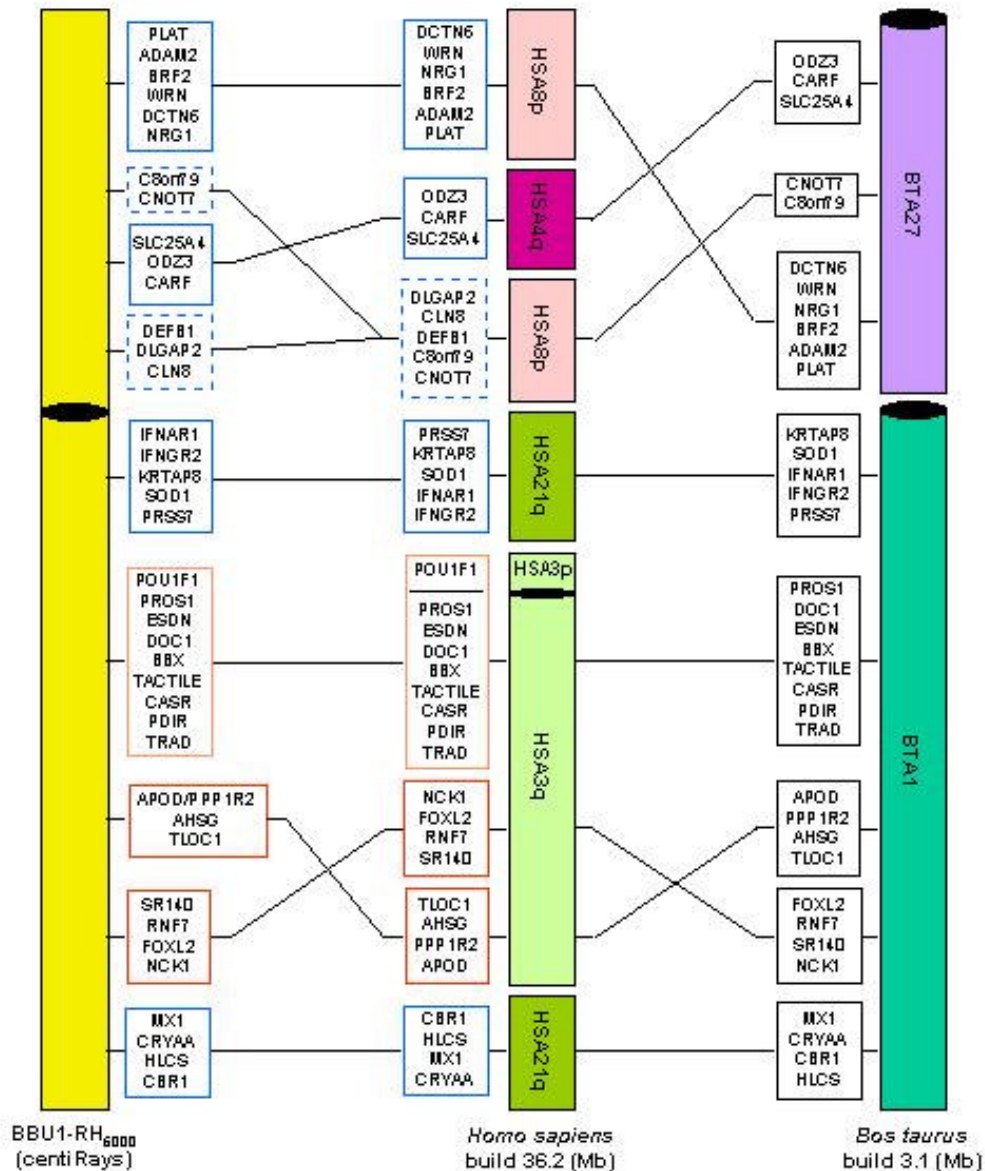
Posteriormente, esses blocos de sintonia foram analisados quanto à ordem dos genes e a orientação dos blocos nos mapas de seqüência dos genomas dos seguintes mamíferos: chimpanzé (NCBI – *Pan troglodytes* build 2.1), cachorro (NCBI – *Canis lupus familiaris* build 2.1) e cavalo (NCBI – *Equus caballus* build 1.1).

## **Resultados e Discussão**

A comparação entre o mapa BBU1-RH<sub>5000</sub> e a seqüência do genoma humano foi realizada a partir de 39 genes e uma Etiqueta de Seqüência Expressa (EST) em comum, os quais foram organizados em oito blocos homólogos de sintonia. A análise dos blocos revelou segmentos correspondentes aos cromossomos humanos 3 (HSA3q), 4 (HSA4q), 8 (HSA8p) e 21 (HSA21q) (Figura 1), sendo dois blocos homólogos com HSA8p, um com HSA4q, três blocos com HSA3q e dois com HSA21q. Destes oito blocos, cinco apresentaram rearranjos na ordem dos genes e na orientação dos blocos (PLAT/ADAM2/BRF2/WRN/DCTN6/NRG1; DLGAP2/CLN8/DEFB1/C8orf79/CNOT7; PRSS7/KRTAP8/SOD1/IFNAR1/IFNGR2; SLC25A4/ODZ3/CARF e CRB1/HLCS/MX1/CRYAA); dois revelaram conservação da ordem dos genes (APOD/PPP1R2/AHSG/TLOC1 e SR140/RNF7/FOXL2/NCK1), mas orientação do bloco invertida, e um bloco apresentou ordem e orientação conservadas (POU1F1/PROS1/ESDN/DOC1/BBX/TACTILE/CASR/PDIR/TRAD).

O bloco pertencente ao braço curto do cromossomo 1 bubalino (BBU1p) contendo os genes PLAT/ADAM2/BRF2/WRN/DCTN6/NRG1 apresentou a ordem dos genes e a orientação do bloco invertidas com relação àquela encontrada no cromossomo 8 humano (Figura 1). A análise deste bloco em outras espécies de mamífero (Quadro 1) revelou a conservação de sintonia entre os genes do segmento do cromossomo 8 humano e os blocos correspondentes aos cromossomos 27 bovino (BTA27) e 8 de chimpanzé (PTR8p).

Um fato inédito foi observado com relação à organização dos genes DLGAP2/CLN8/DEFB1/C8orf79/CNOT7 no cromossomo 1 bubalino quando comparado ao genoma humano. Em búfalo, os genes C8orf79 e CNOT7 encontram-se em um bloco separado dos genes DLGAP2, CLN8 e DEFB1 (Figura 1), enquanto que em humano (HSA8p) os cinco genes apresentam-se juntos. O que se observou



**Figura 1.** Análise da conservação de sintenia entre o mapa RH do cromossomo 1 bubalino e os mapas de seqüência em megabases (Mb) dos cromossomos humanos HSA3q, HSA4q, HSA8p e HSA21q (NCBI *Homo sapiens* build 36.2). Foram identificados cinco blocos cuja ordem dos genes e orientação dos blocos estão rearranjadas (destacados na cor azul), dois blocos cuja ordem dos genes permanece conservada e a orientação dos blocos em HSA encontra-se invertida (destacados na cor vermelha) e um bloco onde a ordem e a orientação estão integralmente conservadas (destacado na cor laranja). Os blocos destacados com linha pontilhada mostram a posição dos genes de HSA8p em BBU1p em segmentos separados por um intervalo contendo um bloco sintênico correspondente a HSA4q. Os mapas dos cromossomos 1 e 27 do genoma bovino (Miziara et al., 2007; NCBI *Bos taurus* build 3.1) foram utilizados como referência de um genoma bovino.

**Quadro 1.** Posição dos genes de BBU1-RH<sub>5000</sub> (Miziara et al., 2007) nos mapas de seqüência dos cromossomos correspondentes nos genomas de humano, bovino, chimpanzé, cachorro e cavalo. As cores representam os segmentos homólogos a HSA3 (cor verde), HSA4 (cor laranja), HSA8 (cor cinza), HSA21 (cor azul).

GENES	BBU1 (cR <sub>5000</sub> )	HSA (Mb) build 36.2	BTA (Mb) build 3.1	PTR (Mb) build 2.1	CFA (Mb) build 2.1	ECA (Mb) build 1.1
PLAT	1p - 0,0	8p - 42,18	27 - 35,54	8p - 38,97	16 - 26,40	27 - 2,7
ADAM2	1p - 20,5	8p - 39,81	27 - 34,16	8p - 36,54	16 - n.a.	27 - 5,5
BRF2	1p - 44,6	8p - 37,82	27 - 32,26	8p - 34,62	16 - 30,49	27 - 7,0
WRN	1p - 90,8	8p - 31,01	27 - 25,29	8p - 27,65	16 - 36,25	27 - 12,7
DCTN6	1p - 113,4	8p - 30,13	27 - 24,39	8p - 26,73	16 - 37,10	27 - 13,5
NRG1	1p - 121,8	8p - 32,52	27 - 26,50	8p - 29,20	16 - 35,72	27 - 11,3
C8orf79	1p - 139,0	8p - 12,85	27 - 21,88	8p - n.a.	#	#
CNOT7	1p - 167,5	8p - 17,14	27 - 18,17	4p - 63,72	16 - 43,52	27 - 19,7
SLC25A4	1p - 199,6	4q - 186,30	27 - 13,45	4q - 189,81	16 - 48,40	27 - 24,3
ODZ3	1p - 233,8	4q - 183,50	27 - 11,21	4q - 186,96	16 - 50,50	27 - 26,5
CARF	1p - 257,5	4q - 184,60	27 - 12,21	4q - 188,10	16 - 49,80	27 - 25,6
DEFB1	1p - 285,4	8p - 6,72	27 - n.a.*	8p - 6,93	24 - 61,80	27 - n.a.
DLGAP2	1p - 359,4	8p - 1,43	#	8p - 1,43	37 - 33,84	27 - 38,2
CLN8	1p - 369,0	8p - 1,69	#	8p - 1,69	37 - 33,87	27 - 37,9
IFNAR1	1q - 441,6	21q - 33,61	1 - 1,32	21q - 33,06	#	26 - 13,9
IFNGR2	1q - 472,2	21q - 33,69	1 - 1,23	21q - 33,13	31 - 31,04	26 - 11,8
KRTAP8	1q - 503,2	21q - 31,10	1 - n.a.	21q - 30,55	#	26 - 13,9
SOD1	1q - 546,7	21q - 31,95	1 - 2,93	21q - 31,40	31 - 29,55	26 - 13,3
PRSS7	1q - 619,0	21q - 18,69	1 - 21,59	21q - 18,50	31 - 17,60	26 - 25,0
POU1F1	1q - 710,1	3p - 87,40	1 - n.a.	3p - 89,57	31 - 3,76	26 - 38,6
PROS1	1q - 730,1	3q - 95,17	1 - 33,95	3q - 97,71	33 - 4,60	19 - 56,0
ESDN	1q - 744,5	3q - 100,10	1 - 40,19	3q - 102,70	33 - 8,60	19 - 52,2
DOC1	1q - 761,6	3q - 101,31	1 - 39,12	3q - 103,80	15 - 46,79	19 - 51,0
BBX	1q - 812,9	3q - 108,72	1 - 47,11	3q - 111,66	33 - 16,10	19 - 45,3
TACTILE	1q - 849,5	3q - 112,74	1 - 51,24	3q - 115,73	33 - 19,27	19 - 42,0
CASR	1q - 964,3	3q - 123,38	1 - 60,24	3q - 126,57	33 - 28,44	19 - 33,2
PDIR	1q - 983,6	3q - 124,26	1 - 61,05	3q - 127,40	33 - 29,20	19 - 32,5
TRAD	1q - 1004,7	3q - 125,29	1 - 63,18	3q - 128,60	33 - 30,50	19 - 31,0
APOD	1q - 1025,4	3q - 196,79	1 - 65,32	3q - 201,29	33 - 33,49	19 - 28,27
PPP1R2	1q - 1025,4	3q - 196,75	1 - 65,38	3q - 201,25	33 - 33,50	19 - 28,22
AHSG	1q - 1065,9	3q - 187,81	1 - 74,48	3q - 192,19	34 - 22,20	19 - 20,7
TLOC1	1q - 1118,9	3q - 171,16	1 - 95,64	3q - 175,1	34 - 37,50	19 - 6,4
SR140	1q - 0,0	3q - 144,20	1 - 120,66	3q - 147,7	23 - 41,60	16 - 83,4
RNF7	1q - 39,6	3q - 142,93	1 - 118,74	3q - 146,4	23 - 40,63	16 - 84,5
FOXL2	1q - 63,0	3q - 140,14	1 - 117,15	3q - 143,59	23 - 38,23	16 - 86,8
NCK1	1q - 75,6	3q - 138,06	1 - 121,72	3q - 141,49	23 - 36,35	16 - 72,0
MX1	1q - 109,2	21q - 41,72	1 - 130,48	21q - 41,12	31 - 38,23	26 - 4,8
CRYAA	1q - 134,1	21q - 43,46	1 - 133,35	21q - 42,85	31 - 39,60	26 - 3,3
HLCS	1q - 152,7	21q - 37,28	1 - 140,12	21q - 36,70	31 - 34,10	26 - 8,7
CBR1	1q - 168,9	21q - 36,36	1 - 138,12	21q - 35,81	31 - 33,40	26 - 9,4

(Mb) – megabases; (BBU) – *Bubalus bubalis*; (HSA) – *Homo sapiens*; (BTA) – *Bos taurus*; (PTR) – *Pan troglodytes*; (CFA) – *Canis lupus familiaris*; (ECA) – *Equus caballus*.

\* n.a. = não anotado – genes que foram indicados ao cromossomo, mas ainda não foram anotados no mapa de seqüência do genoma da espécie.

# genes não mapeados no genoma da espécie.

em BBU1 foi a presença do bloco contendo os genes SLC25A4, ODZ3 e CARF, mapeados no cromossomo 4 humano (HSA4q), intercalado entre os genes encontrados no cromossomo 8 humano. Esse rearranjo observado no braço curto de BBU1 não se encontra descrito no cromossomo correspondente em bovino (BTA27), uma vez que os genes DEFB1, DLGAP2 e CLN8 não foram mapeados e anotados no genoma bovino até o momento, com exceção de DEFB1, que apresenta dados de localização no cromossomo 27 bovino por meio de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (Sonstegard et al 2000; Goldammer et al., 2004; 2007b) e mapeamento RH (Everts van-der Wind et al., 2005).

Considerando os dados citogenéticos que apontaram BBU1p como homólogo somente ao cromossomo 8 humano (Iannuzzi et al., 1998; 2000a), o mapa RH obtido para o cromossomo 1 bubalino revelou a presença de genes do cromossomo 4 humano na formação de BBU1, sendo este originado a partir de rearranjos entre segmentos dos dois cromossomos humanos (HSA4q e HSA8p), e não somente do cromossomo 8.

A comparação dos dois blocos homólogos de sintonia identificados no braço longo do cromossomo 1 bubalino (BBU1q) e no cromossomo 21 humano (HSA21q) (PRSS7/KRTAP8/SOD1/IFNAR1/IFNGR2 e CRB1/HLCS/MX1/CRYAA) indicou rearranjos na ordem dos genes e inversão na orientação dos blocos (Figura 1). Estas diferenças também puderam ser observadas na comparação destes blocos com os cromossomos correspondentes de bovino, cavalo, cachorro e chimpanzé (Quadro 1).

As análises comparativas também evidenciaram outro aspecto interessante do ponto de vista de conservação de sintonia do bloco contendo os genes POU1F1/PROS1/ESDN/DOC1/BBX/TACTILE/CASR/PDIR/TRAD. Esse bloco

homólogo de sintenia se mostrou inteiramente conservado quanto a ordem dos genes e orientação do bloco no cromossomo 3 humano (HSA3q), assim como no cromossomo 3 de chimpanzé (PTR3) e no cromossomo 33 de cachorro (exceto pelos genes DOC1 e POU1F1, mapeados nos cromossomos 15 e 31, respectivamente). Considerando o tamanho deste bloco no mapa RH bubalino (295cR<sub>5000</sub>) em relação ao genoma humano, é possível estimar que este segmento de aproximadamente 38Mb (megabases), incluindo o centrômero de HSA3, esteja conservado entre as duas espécies. Com relação ao cromossomo 1 bovino (BTA1), observou-se uma inversão na ordem dos genes DOC1 e ESDN, que pode estar relacionada com erros no mapeamento e/ou no alinhamento da seqüência do genoma bovino. Além disso, o gene POU1F1 ainda não foi mapeado e anotado no mapa do genoma desta espécie.

Os demais blocos homólogos de sintenia observados entre o cromossomo 1 bubalino e o cromossomo 3 humano - APOD/PPP1R2/AHSG/TLOC1 e SR140/RNF7/FOXL2/NCK1 - apresentaram os genes na mesma ordem, mas com a orientação dos blocos invertida (Figura 1). Este fato também foi observado quando esses blocos de BBU1q foram comparados ao genoma de chimpanzé (Quadro 1). Em cachorro, somente o bloco contendo os genes SR140, RNF7, FOXL2 e NCK1 mostrou conservação de sintenia e orientação do bloco invertida com relação ao cromossomo bubalino. Entre búfalo, bovino e cavalo, somente o bloco APOD/PPP1R2/AHSG/TLOC1 apresentou sintenia conservada. Como referido no Capítulo 1 deste trabalho, os genes APOD e PPP1R2 ocupam a mesma posição no mapa RH de búfalo. Por isso, para a observação da ordem dos genes neste bloco, foi considerada a posição do gene APOD. Outro aspecto observado nos dois blocos

na comparação entre búfalo, bovino e humano, foi a inversão dos blocos observada em búfalo e bovino com relação ao cromossomo 3 humano (Figura 1).

Dados de mapeamento comparativo bovino-humano mostram que BTA27 (que possui homologia com BBU1p) possui regiões homólogas com os cromossomos 4q e 8p humanos (Band et al., 2000; Sonstegard et al., 2000; Goldammer et al., 2004; Everts van-der Wind et al., 2004; Everts van-der Wind et al., 2005; Goldammer et al., 2007b; Snelling et al., 2007), enquanto que BTA1 (homólogo a BBU1q) apresenta homologia com os cromossomos 3q e 21q humano (Rexroad e Womack 1999; Band et al., 2000; Everts van-der Wind et al., 2004; Everts van-der Wind et al., 2005; Snelling et al., 2007). Assim, como esperado, a comparação entre o mapa BBU1-RH<sub>5000</sub> e a seqüência do genoma humano (NCBI – *Homo sapiens* – build 36.2) confirmou os estudos de mapeamento comparativo bovino-humano, uma vez que o genoma do búfalo de rio apresenta uma alta conservação com o genoma bovino. Além disso, as associações entre partes de HSA3 com HSA21 e de HSA4 com HSA8 são comumente encontradas no cariótipo de diversos animais, indicando serem arranjos compartilhados presentes no cariótipo ancestral dos Eutherian (Ferguson-Smith e Trifonov, 2007).

A comparação da ordem dos genes mapeados no cromossomo 1 bubalino com os genomas de outras espécies de mamíferos gerou conhecimento a respeito dos rearranjos ocorridos nos cromossomos homólogos a BBU1 dos genomas de cachorro, cavalo e chimpanzé, ao longo do processo evolutivo.

## **Conclusões**



As conclusões obtidas no presente capítulo foram:

- A comparação entre o mapa RH do cromossomo 1 bubalino e o mapa de seqüência do genoma humano identificou oito blocos homólogos de sintenia entre o cromossomo e segmentos correspondentes dos cromossomos humanos 3 (HSA3q), 4 (HSA4q), 8 (HSA8p) e 21 (HSA21q);
- Dos oito blocos homólogos de sintenia, cinco apresentaram rearranjos na ordem dos genes e na orientação dos blocos, dois revelaram conservação da ordem dos genes, mas orientação do bloco invertida e um bloco apresentou ordem e orientação conservadas;
- O bloco pertencente ao braço curto do cromossomo 1 bubalino contendo os genes PLAT/ADAM2/BRF2/WRN/DCTN6/NRG1 apresentou ordem dos genes e a orientação dos blocos invertidas quando comparado aos cromossomos 8 humano, 27 bovino, 8 de chimpanzé, 16 de cachorro e 27 de cavalo;
- A comparação do bloco DLGAP2/CLN8/DEFB1/C8orf79/CNOT7 com o genoma humano mostrou que os genes DEFB1, DLGAP2 e CLN8 estão separados dos genes CNOT7 e C8ORF79 por um bloco pertencente ao cromossomo 4 humano, representando um rearranjo ainda não descrito na literatura para o genoma bubalino;
- Os blocos PRSS7/KRTAP8/SOD1/IFNAR1/IFNGR2 e CRB1/HLCS/MX1/CRYAA apresentaram rearranjos na ordem dos genes e inversão na orientação dos blocos entre búfalo e humano. Estas diferenças também puderam ser observadas em bovino, cavalo, cachorro e chimpanzé.

- O bloco de sintonia contendo os genes POU1F1/PROS1/ESDN/DOC1/BBX/TACTILE/CASR/PDIR/TRAD se mostrou inteiramente conservado quanto à ordem dos genes e a orientação do bloco, quando comparado com os cromossomos correspondentes em humano, chimpanzé e cachorro. É possível estimar que este segmento de aproximadamente 38 Mb de tamanho no genoma humano esteja conservado em búfalo;
- Os blocos homólogos de sintonia APOD/PPP1R2/AHSG/TLOC1 e SR140/RNF7/FOXL2/NCK1 apresentaram a mesma ordem gênica e orientação do bloco invertida entre BBU1q e os cromossomos correspondentes em humano e chimpanzé. Na comparação destes blocos entre búfalo, bovino e humano, foi observada uma inversão dos blocos em búfalo e bovino com relação ao cromossomo humano.

## **Referências Bibliográficas dos Capítulos 1 e 2**

---

---



AGARWALA, R. et al. A Fast and Scalable Radiation Hybrid Map Construction and Integration Strategy. **Genome Research**, v. 10, p. 350-364. 2000.

AMARAL, M. E. J. et al. 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.

**ANUALPEC 2006**. Disponível em: <<http://ifnp.org.br>>.

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.

BECKER, T. S.; LENHARD, B. The random versus fragile breakage models of chromosome evolution: a matter of resolution. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 278, p. 487-491. 2007.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 293-298. 2007.

BORGHESE, A.; MAZZI, M. Buffalo population and strategies in the world. In: **Buffalo Production and Research - FAO Regional Office for Europe**, REU Technical Series 67, Roma, 321p. 2005.

**BOVINE QTL Viewer**. Disponível em: <<http://bovineqtlv2.tamu.edu/index.html>>. Acesso em: 05 jan. 2008.

**BRITANNICA ENCYCLOPEDIA ONLINE**. Disponível em: < <http://www.britannica.com/eb/article-262018/heredity>>. Acesso em: 05 jan. 2008.

CASAS, E. et al. Identification of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. **Animal Genetics**, v. 35, p. 2-6. 2004.

CHOWDHARY, B. P. et al. Comparative analysis of the cattle and human genomes: detection of ZOO-FISH and gene mapping-based chromosomal homologies. **Mammalian Genome**, v. 7, p. 297–302. 1996.

CHOWDHARY, B. P.; RAUDSEPP, T. Mapping Genomes at the Chromosomal level. In: **Mammalian Genomics**. Wallingford, Oxfordshire, United Kingdom: CABI Publishing, 2005. p. 23-65.

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**: Rebanho bubalino. Disponível em: <<http://www.cpatu.embrapa.br/Bufalo/Bufalo.htm>>. Acesso em: 11 dez. 2006.

DE HONDT, H. A. et al. Gene mapping in river buffalo (*Bubalus bubalis L.*): five syntenic groups. **Journal of Animal Breeding Genetics**, v. 114, p. 79-85. 1997.

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. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 90, p. 102-105. 2000.

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.

EL NAHAS, S. M. et al. Assignment of genes coding for leukocyte surface molecules to river buffalo chromosomes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 52, p. 435-443. 1996.

EL NAHAS, S. M. et al. Use of molecular markers for the identification of river buffalo chromosomes: chromosome one. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 114, p. 451-455. 1997.

EL NAHAS, S. M. et al. Current status of the river buffalo (*Bubalus bubalis L.*) gene map. The **Journal of Heredity**, v.92, n. 3, p. 221-225. 2001.

ETO, K. et al. Functional Classification of ADAMs Based on a Conserved Motif for Binding to Integrin  $\alpha 9\beta 1$ . **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 17804-17810. 2002.

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. 1424-1437. 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 Sciences USA**, v. 102, p. 18526-18531. 2005.

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

**GENE ONTOLOGY**. Disponível em: <<http://www.geneontology.org/>>. Acesso em: 05 jan. 2008.

GEORGES, M. et al. Mapping Quantitative Trait Loci Controlling Milk Production in Dairy Cattle by Exploiting Progeny Testing. **Genetics**, v. 139, p. 907-920. 1995.

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. 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**, 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. 2007a.

GOLDAMMER, T. et al. Generation of an improved cytogenetic and comparative map of *Bos taurus* chromosome 27. **Chromosome Research**, v. 15, p. 203-213. 2007b.

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

HAWKEN, R. J. et al. A first-generation porcine whole-genome radiation hybrid map. **Mammalian Genome**, v. 10, n. 8, p. 824-830. 1999.

HAYES, H. Chromosome painting with human chromosome-specific DNA libraries reveals the extent and distribution of conserved segments in bovine chromosomes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 71, p. 168-174. 1995.

IANELLA, P. et al. First radiation hybrid map of the river buffalo X chromosome (BBUX) and comparison with BTAX. **Animal Genetics**, doi: 10.1111/j.1365-2052.2007.01696.x. 2008.

IANNUZZI, L. et al. A comparison of G and R-banding in cattle and river buffalo prometaphase chromosomes. **Caryologia**, v. 43, p. 283-290. 1990.

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

IANNUZZI, L. et al. localization of uridine monophosphate synthase (UMPS) gene to river buffalo chromosomes by FISH. **Chromosome Research**, v. 2, p. 255-256. 1994b.

IANNUZZI, L. et al. Assignment of genes coding for leukocyte surface molecules to river buffalo chromosomes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 52, p. 435-443. 1996a.

IANNUZZI, L. et al. High-resolution FISH mapping of  $\beta$ -defensin genes to river buffalo and sheep chromosomes suggests a chromosome discrepancy in cattle standard karyotypes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 75, p. 10-13. 1996b.

IANNUZZI, L. et al. ZOO-FISH and R-banding reveal extensive conservation of human chromosome regions in euchromatic regions of river buffalo chromosomes. **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 82, p. 210-214. 1998.

IANNUZZI, L. et al. Sixteen type I loci from six human chromosomes were comparatively fluorescence in-situ mapped to river buffalo (*Bubalus bubalis*) and sheep (*Ovis aries*) chromosomes. **Chromosome Research**, v. 8, p. 447-450. 2000a.

IANNUZZI, L. et al. Chromosomal localization of four HSA2 type I loci in river buffalo (*Bubalus bubalis*, 2n = 50) Chromosomes 2q and 12. **Mammalian Genome**, v.11, p. 241-242. 2000b.

IANNUZZI, L. et al. FISH-mapping of 31 type I loci (Texas markers) to river buffalo chromosomes. **Chromosome Research**, v. 9, p. 339-342. 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. 124-126. 2001b.

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.

JAILLON, O. et al. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. **Nature**, v. 431, p. 946-957. 2004.

JANN, O. C. et al. A second generation radiation hybrid map to aid the assembly of the bovine genome sequence. **BMC Genomics**, v. 7, p. 283-297. 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.

KUHN, C. et al. Quantitative Trait Loci Mapping of Functional Traits in the German Holstein Cattle Population. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 360-368. 2003.

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.

McCARTHY, L. C. et al. A first-generation whole genome-radiation hybrid map spanning the mouse genome. **Genome Research**, v. 7, n. 12, p. 1153-1161. 1997.

MESSER, L. A. et al. Mapping of the melatonin receptor 1a (MTNR1A) gene in pigs, sheep, and cattle. **Mammalian Genome**, v. 8, p. 368-370. 1997.

MIZIARA, M. N.; AMARAL, M. E. J. Mapas do genoma de animais de interesse econômico: estratégias atuais para construção e utilização. In: Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal, I., 2007, São Carlos. **Anais do I Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. São Carlos: EMBRAPÁ Pecuária Sudeste, 2007. 1 CD-ROM.

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. et al. Comportamento produtivo e reprodutivo de bubalinos mestiços Murrah-Mediterrâneo em pastagem cultivada em terra firme, no Estado do Acre. **Boletim de Pesquisa da EMBRAPA-CPAF**, Rio Branco, n. 13, 19p. 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. 53, p. 1-8. 1999.

**NCBI – *Bos taurus* build 3.1.** Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map\\_search.cgi?taxid=9913](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=9913)>. Acesso em: 20 dez. 2007.

**NCBI – *Canis lupus familiaris* build 2.1.** Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map\\_search.cgi?taxid=9615](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9615)>. Acesso em: 20 dez. 2007.

**NCBI – *Equus caballus* build 1.1.** Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map\\_search.cgi?taxid=9796](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9796)>. Acesso em: 20 dez. 2007.

**NCBI – *Homo sapiens* build 36.2.** Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map\\_search.cgi?taxid=9913](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=9913)>. Acesso em: 20 dez. 2007.

**NCBI – *Pan troglodytes* build 2.1.** Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map\\_search.cgi?taxid=9598](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9598)>. Acesso em: 20 dez. 2007.

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

O'BRIEN, S. J. et al. Genomics: On choosing mammalian genomes for sequencing. **Science**, v. 292, p. 2264-2266. 2001.

PRIAT, C. et al. A whole-genome radiation hybrid map of the dog genome. **Genomics**, v. 54, n. 3, p. 361-78. 1998.

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

RAMADAN, H. A. I. et al. Somatic cell hybrids characterization by monoclonal antibodies and assignment of CD71 to the q arm of buffalo and cattle chromosome one. **Journal of the Egyptian German Society for Zoology**, v. 31C, p. 133-143. 2000.

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.

REXROAD III, C. E.; WOMACK, J. E. Parallel RH mapping of BTA1 with HSA3 and HSA21. **Mammalian Genome**, v. 10, p. 1095-1097. 1999.

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.

SCHLÄPFER, J. et al. Comparative mapping of bovine chromosome 13 by fluorescence *in situ* hybridization. **Animal Genetics**, v. 29, p. 265-272. 1998.

SEROV, O. et al. Comparative gene mapping, chromosome painting and the reconstruction of the ancestral mammalian karyotype. In: **Mammalian Genomics**. Wallingford, Oxfordshire, United Kingdom: CABI Publishing, 2005. p. 349-392.

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

SOLINAS-TOLDO, S. et al. Comparative genome map of human and cattle. **Genomics**, v. 27, p. 489-496. 1995.

SONSTEGARD, T. S. et al. Comparative map alignment of BTA27 and HSA4 and 8 to identify conserved segments of genome containing fat deposition QTL. **Mammalian Genome**, v. 11, p. 682-688. 2000.

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.

VAUGHAN, T. A. **Mammalogy**. New York: CBS College Publishing, 1986. 210p.

VIITALA, S. M. et al. Quantitative Trait Loci Affecting Milk Production Traits in Finnish Ayrshire Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1828–1836. 2003.

VILLENA, F. P-M. Evolution of the Mammalian Karyotype. In: **Mammalian Genomics**, Wallingford, Oxfordshire, United Kingdom: CABI Publishing, 2005. p. 317-348.

WOMACK, J. E.; MOLL, Y. D. Gene map of the cow: conservation of linkage with mouse and man. **The Journal of Heredity**, v. 77, p. 2-7. 1986.

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.

YANG, Y-P.; WOMACK, J. E. Parallel radiation hybrid mapping: a powerful tool for high-resolution genomic comparison. **Genome Research**, v. 8, p. 731-736. 1998.

**Anexo A:** Trabalho publicado nos Anais do I Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal – ISBN 978-85-86764-16-5 – São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

## MAPAS DO GENOMA DE ANIMAIS DE INTERESSE ECONÔMICO: ESTRATÉGIAS ATUAIS PARA CONSTRUÇÃO E UTILIZAÇÃO

Melissa Nunes Miziara e Maria Elisabete Jorge Amaral

Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista, UNESP, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Palavras-chave: mapeamento, genoma, animais de interesse econômico.

O melhoramento genético de espécies animais de interesse econômico vem ocorrendo a milhares de anos por meio da domesticação e da seleção de fenótipos desejáveis. Entretanto, o cruzamento de animais com características comercialmente interessantes fornece poucas informações a respeito de quais fatores são responsáveis por estes caracteres e de como manipulá-los para se obter o melhoramento genético desses animais mais eficientemente (Ruvinsky & Graves, 2005).

A genética, que tem como um dos primeiros objetivos estudar os padrões de herança dos genes, tornou-se limitada para que pudéssemos alcançar um nível superior de conhecimento sobre o genoma completo de diversas espécies. Em virtude do desenvolvimento de novas técnicas e de novas estratégias de estudo do DNA para o Projeto Genoma Humano, grandes avanços foram obtidos nas pesquisas genéticas que envolvem animais de interesse econômico, mediante aplicação dessas mesmas tecnologias para melhor conhecer e para manipular o genoma destas espécies.

Surge então o que chamamos de “a era da genômica”, em que estratégias avançadas são utilizadas com o objetivo de aumentar o conhecimento sobre a estrutura e sobre o funcionamento de genomas inteiros (Hocquette, 2005). A Genômica é dividida em duas subáreas: a genômica estrutural e a genômica funcional. A primeira tem por objetivo caracterizar a natureza física (DNA) dos genomas, por meio da identificação e da localização dos genes, e a segunda estuda a expressão dos genes, ou seja, o funcionamento do genoma (Hocquette, 2005).

Em espécies de animais de interesse econômico, a genômica estrutural vem permitindo avanços significativos quanto à localização e à organização dos genes

por meio do mapeamento genômico, que é definido como a indicação de um gene a um *locus* (região específica) no cromossomo e o posicionamento desse gene em relação a outros genes encontrados no mesmo cromossomo (Womack, 2005).

Atualmente, os mapas genômicos são divididos em três categorias: mapas genéticos ou de ligação; mapas físicos, que abrangem os mapas de sintonia, citogenético e de híbridos irradiados (RH); e mapas moleculares ou de seqüências de DNA (Ruvinsky & Graves, 2005). Para que a seqüência de DNA do genoma de um animal de interesse econômico seja elucidada e para que todos seus genes sejam conhecidos, diferentes tipos de mapas vêm sendo desenvolvidos com base na utilização das estratégias de mapeamento do genoma humano. Essas estratégias definem desde a simples indicação de um gene a um cromossomo até a obtenção da sua seqüência completa de bases (CURSO, 2003).

O mapeamento genômico em animais de interesse econômico é importante por quatro motivos principais: para localizar genes responsáveis por características comercialmente importantes, tais como produção de leite e maciez de carne; para localizar genes associados a doenças, sejam eles envolvidos na patogênese ou na resistência à doença; para procurar genes que sirvam como modelo no estudo dos efeitos de doenças genéticas humanas; e finalmente, para estudar os mecanismos de rearranjos cromossômicos que resultaram na evolução das diferentes espécies de mamíferos (CURSO, 2003; Womack, 2005).

### **Como iniciar os estudos de mapeamento do genoma de uma espécie de mamífero de interesse econômico?**

O primeiro passo é saber quais genes pertencem a um mesmo cromossomo. Essa informação é obtida construindo-se o mapa denominado *sintênico* ou *de sintonia*. Esse tipo de mapa, que é construído sem a necessidade de cruzamento sexual, é feito por meio da utilização de um conjunto de linhagens de células híbridas resultantes da fusão do genoma das células de uma espécie “hospedeira” com o genoma das células da espécie de interesse (Ruvinsky & Graves, 2005). Cada linhagem celular apresenta o conjunto completo do genoma hospedeiro mais um ou dois cromossomos inteiros do genoma em estudo. O mapeamento de um grupo de genes se dá utilizando-se a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) com o DNA de todas as linhagens celulares do conjunto, seguida da análise

estatística do padrão de presença ou de ausência do gene nas diferentes linhagens celulares (Ruvinsky & Graves, 2005). Genes com padrões de presença e de ausência parecidos são categorizados em um mesmo grupo de sintenia. Entretanto, o mapa de sintenia não fornece informações quanto à ordem dos genes no cromossomo e quanto a qual cromossomo esse grupo de genes pertence (Ruvinsky & Graves, 2005).

### **Como saber em qual cromossomo um grupo de sintenia está localizado?**

Para obter essa informação, é preciso gerar outro tipo de mapa, o *mapa citogenético*. Este mapa é construído por meio da técnica de hibridização *in situ*, que utiliza seqüências de DNA (sondas) complementares aos genes-alvo, para hibridizar em cromossomos metafásicos do genoma de interesse contidos em lâminas de microscópio (Ruvinsky & Graves, 2005). Diferente do mapa de sintenia, o mapa citogenético permite a visualização dos genes nos cromossomos, pois a ligação da sonda ao gene produz um sinal visível que permite identificar o gene no cromossomo. Assim, os grupos de sintenia passam a pertencer a um cromossomo do cariótipo da espécie, sendo possível diferenciar em qual braço ou em qual região do cromossomo os genes estão localizados (Ruvinsky & Graves, 2005). Entretanto, a ordem e a distância desses genes ainda não são conhecidas, pois o mapa citogenético, apesar de ser classificado como um tipo de mapa físico, é um mapa de baixa resolução, ou seja, pouco detalhado.

### **Como conhecer a ordem dos genes e a distância entre eles no cromossomo?**

Existem duas estratégias que permitem identificar a ordem e a distância entre os genes: o *mapeamento genético* e o *mapeamento RH* – que utiliza células híbridas irradiadas (Ruvinsky & Graves, 2005). O *mapa genético* fornece a ordem dos genes em um cromossomo com base na frequência de recombinação entre eles (Griffiths et al., 2006). Sabemos que cada indivíduo diplóide possui duas cópias de cada gene em suas células – cada cópia localizada em um cromossomo homólogo. Quando essas cópias são iguais, ou seja, quando a forma do gene (alelo) representada é a mesma nos dois cromossomos homólogos, dizemos que o indivíduo é homozigoto para o gene (DICTIONARY, 2007). Quando os cromossomos homólogos possuem

alelos diferentes, dizemos que o indivíduo é heterozigoto para o gene (Griffiths et al., 2006).

Durante o processo de formação dos gametas (meiose), esses cromossomos podem trocar pedaços por meio do mecanismo chamado recombinação ou *crossing-over* (DICTIONARY, 2007). Nos gametas resultantes, os cromossomos podem conter os mesmos alelos do parental ou cromossomos recombinantes com combinações de alelos diferentes daquelas do parental (Griffiths et al., 2006).

Em 1911, um aluno de Thomas Hunt Morgan (descobridor do *crossing-over*), Alfred Sturtevant, utilizou a teoria da recombinação para gerar o primeiro mapa de ligação. A hipótese criada para a construção do mapa foi a seguinte: quanto menor for a distância entre dois genes em um mesmo cromossomo, tanto maior será a chance de eles serem herdados juntos – ligados (Ruvinsky & Graves, 2005).

Dessa forma, um mapa genético é construído pela análise da herança dos genes a partir dos progenitores para a prole, e para tanto é necessário o cruzamento sexual entre os animais para se observar a recombinação meiótica (Ruvinsky & Graves, 2005). Por meio da genotipagem (análise dos genótipos) dos pais e da progênie de uma família em relação a um par de genes, é possível determinar se eles estão sendo herdados ligados ou independentes (em cromossomos diferentes) (Ruvinsky & Graves, 2005). Um conjunto de genes ligados forma um grupo de ligação. A distância entre eles é dada em centiMorgan (cM); 1 cM representa 1% de probabilidade de um gene ser separado de seu vizinho pelo processo de recombinação meiótica (DICTIONARY, 2007).

Apesar de fornecer a ordem e a distância entre genes ligados, o mapa de ligação apresenta diversas limitações que o tornam pouco detalhado. Os grupos de ligação possuem informações quanto à ordem e à distância entre os genes, mas não fornece a posição do conjunto no cromossomo (Rexroad, 1999). Sua construção depende ainda da presença de indivíduos heterozigotos na família para que os alelos possam ser diferenciados na análise de recombinação (Ruvinsky & Graves, 2005). Além disso, a estratégia necessita que os genes apresentem diferentes alelos (polimorfismo), para que possam ser observados na população (Rexroad, 1999). Essa necessidade limita esta técnica, já que os genomas dos mamíferos são altamente conservados e os genes tendem a conter poucos alelos.

Assim, os mapas de ligação possuem poucos genes e a maioria de *microsatélites*, seqüências de DNA não codificantes que contêm pequenas repetições de um a seis pares de base (Ruvinsky & Graves, 2005). Os *microsatélites* são encontrados espalhados no genoma e apresentam alto grau de polimorfismo devido à presença de vários alelos diferenciáveis pelo número de repetições que possuem (Griffiths et al., 2006). Adicionalmente, existem regiões do genoma que possuem baixas taxas de recombinação meiótica e que não podem ser estudadas utilizando esta estratégia (Ruvinsky & Graves, 2005). Mesmo assim, os mapas genéticos são importantes, pois descrevem como os genes são transmitidos através das gerações.

No final do século XX, uma nova estratégia revolucionou os estudos de mapeamento do genoma de animais de interesse econômico. O *mapeamento RH*, inicialmente desenvolvido para o genoma humano em 1990, foi aplicado em 1997 ao primeiro genoma animal de importância econômica, o genoma bovino (Womack, 2005).

A estratégia que origina um *mapa RH* (classificado como um tipo de mapa físico) é uma adaptação da metodologia aplicada ao mapeamento sintênico. Neste caso, um conjunto de células híbridas é obtido fusionando-se as células hospedeiras às células da espécie de interesse, cujos cromossomos foram previamente fragmentados por radiação (Cox et al., 1990). As linhagens celulares híbridas denominadas *irradiadas* contêm diferentes combinações dos fragmentos cromossômicos do genoma de interesse e juntas representam o genoma completo da espécie-alvo (Cox et al., 1990). Essas linhagens são analisadas estatisticamente quanto à presença ou à ausência dos genes e a hipótese elaborada para a construção do mapa é parecida com aquela da análise de ligação: quanto mais próximos dois genes estiverem localizados em um cromossomo, tanto maior será a probabilidade de se encontrarem juntos no mesmo fragmento cromossômico (Ruvinsky & Graves, 2005). A unidade de distância do mapa RH é o centiRay (cR); 1 cR equivale a 1% de probabilidade de quebra entre dois genes após a exposição de determinada dosagem de radiação, a qual define a resolução do mapa (Cox et al., 1990).

A principal vantagem do mapeamento RH em relação ao mapeamento por ligação é, sobretudo, localizar e ordenar fisicamente um gene ou qualquer outra

seqüência de DNA sem a necessidade de polimorfismo ou de acompanhamento de indivíduos heterozigotos em famílias (Rexroad, 1999). Essa vantagem trouxe uma consequência importante para o estudo do genoma de espécies de interesse econômico: a possibilidade de construir outro tipo de mapa denominado *mapa comparativo* (Womack, 2005).

O mapeamento comparativo utiliza informações de genomas altamente caracterizados para localizar seqüências de DNA em genomas pouco documentados, baseando-se na conservação existente entre os genomas de mamíferos (Ruvinsky & Graves, 2005). Assim, a partir das informações dos diferentes tipos de mapas do genoma humano e de camundongo (que possuem a maior quantidade de informações dentre os genomas de mamíferos), começaram a ser construídos mapas comparativos com maior detalhamento para o genoma de animais de interesse econômico, tais como o boi, o cavalo, o porco e a ovelha (Goldammer et al., 2002).

Apesar das vantagens do mapeamento RH, a distância entre os genes ainda não é fornecida com a exatidão necessária para sua manipulação individual.

### **Mas, então, como conhecer a distância real entre os genes em determinado cromossomo, ou seja, em uma molécula de DNA?**

O mapa mais detalhado possível de se obter é o *mapa molecular* ou o *mapa de seqüências de DNA*, que é construído por meio da identificação e da ordenação de um conjunto de fragmentos clonados de DNA, que, quando superpostos, representam todo um cromossomo ou todo um genoma (Griffiths et al., 2006). Organizado em pares de base, o mapa molecular fornece a distância exata entre os genes. Assim, é possível estudar detalhadamente o funcionamento gênico, já que a localização de um gene não é casual no genoma e envolve seqüências de DNA adjacentes ou até mesmo distantes do próprio gene, mas que são responsáveis pelo controle de sua expressão (Ruvinsky & Graves, 2005).

Entretanto, a obtenção da seqüência completa de bases de um genoma por si só não é suficiente para conhecermos todos os genes e seu funcionamento. Sabemos que todos os genomas são compostos pelas mesmas bases nitrogenadas (A, T, C e G) e simplesmente conhecer a seqüência de todas as bases que compõem um genoma não basta para sabermos onde um gene e suas seqüências

reguladoras estão localizados. Por isso, a construção de diferentes tipos de mapas e a integração entre eles é que vai permitir um conhecimento mais aprofundado sobre todos os genes do genoma, desde a sua localização precisa até o seu funcionamento (Ruvinsky & Graves, 2005). A localização e o funcionamento dos genes representam pontos-chave para estudos de características economicamente importantes e para a manipulação de genes que tenha por objetivo a obtenção de fenótipos desejáveis e possíveis curas de doenças.

### Referências bibliográficas

COX, D. R.; BURMEISTER, M.; PRICE, E. R.; KIM, S.; MYERS, R. M. Radiation hybrid mapping: a somatic cell genetic method for constructing high-resolution maps of mammalian chromosomes. **Science**, v. 250, n. 4978, p. 245-250, 1990.

CURSO DE TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADAS A PRODUÇÃO ANIMAL, 4., 2003, São Carlos, SP. **Anais...** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2003. 64 p.

**DICTIONARY of genetic terms.** Disponível em: <[http://www.ornl.gov/sci/tech/resources/Human\\_Genome/publicat/primer2001/glossary.shtml](http://www.ornl.gov/sci/tech/resources/Human_Genome/publicat/primer2001/glossary.shtml)>. Acesso em 28 maio 2007.

GOLDAMMER, T.; KATA, S. R.; BRUNNERDAGGER, R. M.; DORROCHDAGGER, U.; SANFTLEBENDAGGER, H.; SCHWERINDAGGER, M.; WOMACK, J. E. A comparative radiation hybrid map of bovine chromosome 18 and homologous chromosomes in human and mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 4, p. 2106-2111, 2002.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M.; WESSLER, S. R. **Introdução à genética.** 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 764 p.

HOCQUETTE, J. F. Where are we in genomics? **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, supl. 3, p. 37-70, 2005.

REXROAD, C. E. **Radiation hybrid mapping of bovine chromosome one.** 1999. 125 f. Tese (Doutorado em Veterinary Pathobiology) – Texas A&M University, College Station, Texas, USA, 1999.

RUVINSKY, R.; GRAVES, J. M. **Mammalian genomics.** Wallingford, Oxfordshire, United Kingdom: CABI Publishing, 2005. 600 p.

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

**Anexo B:** Artigo publicado na  
Revista *Animal Genetics* – ISSN  
eletrônico 1365-2052 – Oxford –  
England, 2007.

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

N. B. Stafuzza\*, P. Ianella\*, M. N. Mizziara\*, R. Agarwala<sup>†</sup>, A. A. Schäffer<sup>†</sup>, P. K. Riggs<sup>‡</sup>, J. E. Womack<sup>§</sup> and M. E. J. Amaral\*

\*Department of Biologia, UNESP – São Paulo State University, IBILCE, São Jose Rio Preto, SP 15054-000, Brazil. <sup>†</sup>Department of Health and Human Services, National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20894, USA. <sup>‡</sup>Department of Animal Science, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA. <sup>§</sup>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 (BBURH<sub>5000</sub>). 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

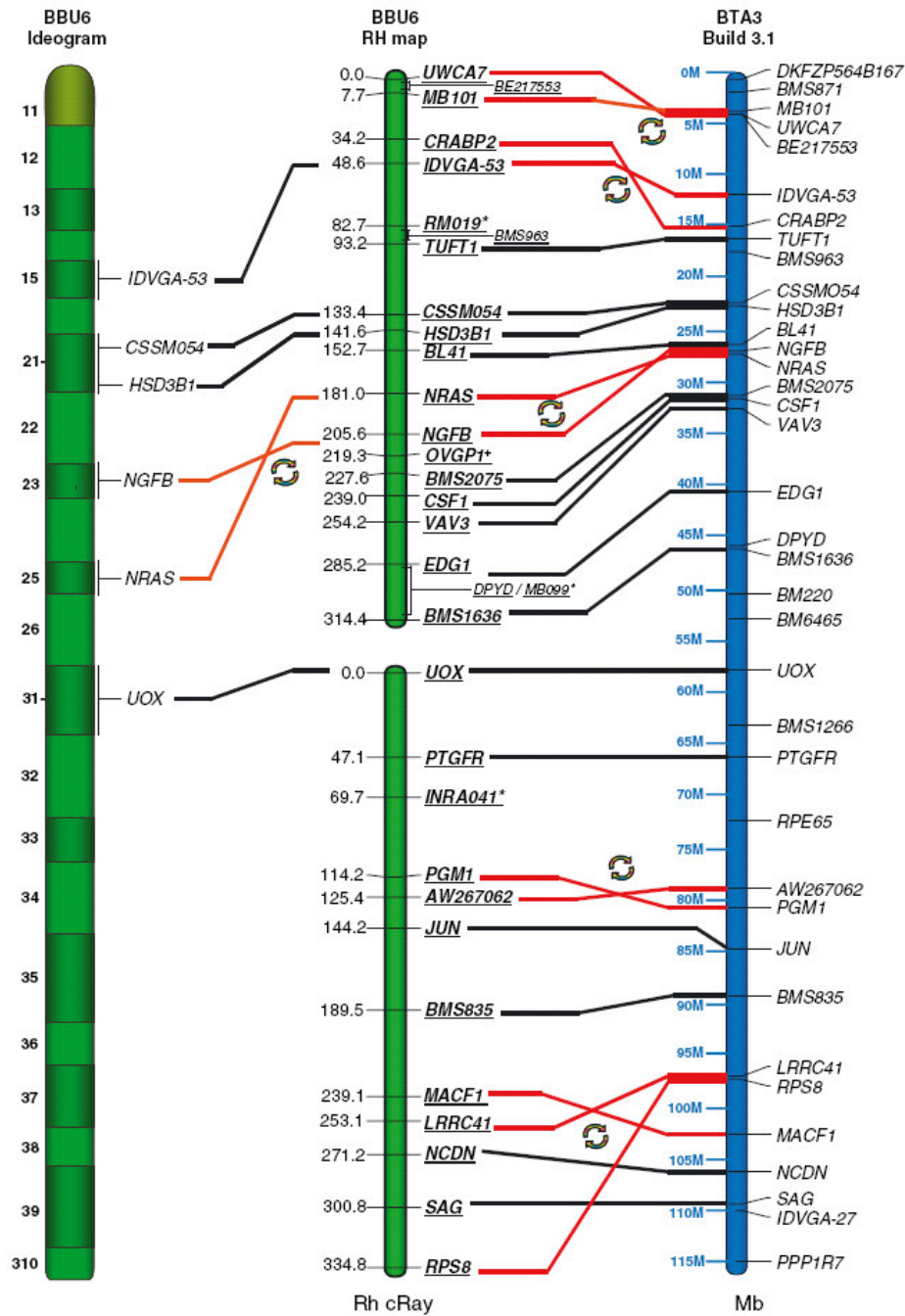


Figure 1 Comparison of the river buffalo chromosome 6 (BBU6) RH map (center) with the buffalo cytogenetic (left) and the bovine genome build 3.1 for BTA3 (right). Framework markers are bolded and have been placed at a position that was better than the next best alternative by at least 0.50 LOD. Markers 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<sub>5000</sub>, 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)	Tm (°C)	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	UniSTS ID	GenBank accession no. (cattle)
<b>LG1</b>								
UWCA <sup>1</sup>	MS	32.2	0.0	61	TGTAGTCCCTCGGAGGAA	GCAATACAACCAGTCTGGTG	250762	L14709
BE217553 <sup>2</sup>	EST	33.3	Placed	50	TCTGAATCTTAACCAAAAT	CAAGCTGAGACCCCTACAT	279334	BE217553
MB107 <sup>1</sup>	MS	32.2	7.7	65	AGGAATATCTGTATCAACCTCAGTC	CTGAGCTGGGGTGGAGCTATAAATA	250773	X63795
CRABP <sup>3</sup>	Gene	30.0	34.2	65	AAACAGGAGGGGGACACTTT	TGTTGGTCAGTCTCTGGT		NM_001008670
IDVGA-53 <sup>1,4</sup>	MS	25.5	48.6	65	CCAGGAGCCCTCGGTCAGTG	GAAGGGGAAGGGAAAGTGAAC	251461	X85070
RM079 <sup>1</sup>	MS	33.3	82.7	59	CCAGGTCTGATATCTGGAGG	TCAATGAACAAGATGGAGACTT	251183	U03049
BMS936 <sup>1</sup>	MS	32.2	Placed	50	GGAGGTAAGGAGTCTTTGG	AATTACACAGTCCACCCG	52014	G18761
TUFFT <sup>2</sup>	Gene	35.5	93.2	60	GTCTCTCTCGCGTGTGGGA	CCGGATAACAACCTGATGTGG	279227	M64924
CSSM054 <sup>1,4</sup>	MS	30.0	133.4	63	AAACACATGGAGATCAGACTCC	TTCACAAACCTGAGCAGCTCTG	250977	U03832
HSD3B1 <sup>4,5</sup>	Gene	30.0	141.6	63	AGCACATGAAGTGGCTGG	CAGATGCCGTGTTATCA	250736	NM_174343
BL41 <sup>1</sup>	MS	31.1	152.7	65	CCTCTGCCATCTTATCCG	MAGTCAACTTATCTCACAGTGG		CN000179.2
NRAS <sup>2,4</sup>	Gene	40.0	181.0	50	CTTTCATTTAGGCCCAAGGAGG	GAGGAGCTCAGTAAAGTTGTA	278846	AW267011
NGFP <sup>2,4</sup>	Gene	34.4	205.6	65	TTCCTGGTGGGACAGCAT	TCCCGGCACTGTCTCAA	278830	Y09566
OVGP <sup>2</sup>	Gene	32.2	219.3	60	GGGTTACTTTGGTCTTGAGACA	CTTGGATCTTATTCACAGC	278872	D16639
BMS2075 <sup>1</sup>	MS	28.9	227.6	57	TCCCATCTCGAGCTGATG	AGTCAATCCCTCTTGGG	66478	G18719
CSFP <sup>2</sup>	Gene	28.9	239.0	65	GCAGACTGAAGGAGGACA	CCGCAAGACACAGGATGAT	278247	NM_174026
VAV <sup>2</sup>	Gene	23.3	254.2	58	AAGGTCTCTTGGAGTGGGA	TGCTCTCTGGTAAACA GTTG	279251	Aw417792
EDG1 <sup>2</sup>	Gene	15.5	285.2	51	TGGCCCTCAGACCTGTTG	TGGCAGGAGACTGAACAGG	278327	NM_001013585
MB099 <sup>1</sup>	MS	15.5	Placed	65	CTGAGGTGTGAGCCCAATTA	CTAAGGTGGAAGGTGACTAGG	250771	X63794
DPYD <sup>2</sup>	Gene	21.1	Placed	58	AAGCCAGAGTGTTCAGTACC	GGCTTAAACAGAGTCCATCC	278317	U20981
BMS1636 <sup>1</sup>	MS	18.9	314.4	65	CATTAATCACTGCCCTTGGATG	GTGTTGAGTCTTCCAGCAGG	28634	G18681
<b>LG2</b>								
UOX <sup>4</sup>	Gene	17.8	0.0	56	CCTCAGTCATTCATCTG	ACATCTCCCTCGTGGTA	253506	NM_001075648.1
PTGFR <sup>5</sup>	Gene	23.3	47.1	65	CTGAAAATCAGCCCTCAC	AAGAAGCCCAATCAATCCC		NM_181025
INRA041 <sup>1</sup>	MS	18.9	69.7	50	TGCAAAATCTCTAGACTTTAA	ACATTTTATGAGTTAATTTGAAC	251127	X71559.1
PGMT <sup>2</sup>	Gene	18.9	114.2	62	AGAGGTGATGGAGAGAGGCA	ACTGGAAGATGGAGTTGAGCA	278900	AW289893
AW267062 <sup>2</sup>	EST	18.9	125.4	65	ACCTAECTCAGCCTTAAGCATC	CCAGAAGTACCTCTTACCAG	278033	AW267062
JUN <sup>2</sup>	Gene	21.1	144.2	65	GAAGCAGAGCATGCCCTGAAT	ATATGCCCTGTCGGACTGA	278588	AF069514
BMS835 <sup>1</sup>	MS	21.1	189.5	60	TCATGCGATGGGGTTG	ATCTCCCTACCTGGGCATC	66587	G18891
MACFP <sup>2</sup>	Gene	22.2	239.1	65	ATTACGGGTTACCAAGGCGCA	CCACCCCTCTCCACTTTGAA	27920	AW289874
LRRCA41 <sup>2</sup>	Gene	22.2	253.1	50	TTACATGTGAATGAGGCCA	AGTGTCTGTGTAACCCG	278799	AW461454
NCDW <sup>2</sup>	Gene	18.9	271.2	56	AGGCCCTTGACATTCAGTT	GAAGCTCACTGAAGGAGTT	278815	AW464751
SAG <sup>2</sup>	Gene	16.7	300.8	61	AAGAAAGAAAGACAGACCA	ACGTCACTAAAGGGCTAATC	279056	J02955
RPS8 <sup>2</sup>	Gene	14.4	334.8	55	ACAGAACAACGATCAAGAAA	TGAGCTAAGACAGGAGAGA	279402	BE217560

RF, retention frequency.

<sup>1</sup>Ihara et al. (2004).

<sup>2</sup>Everts-van der Wind et al. (2004).

<sup>3</sup>Newly designed.

<sup>4</sup>Markers with FISH assignment on buffalo chromosome 6.

<sup>5</sup>Nakata et al. (2005).

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](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 CH12, 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 C:** Artigo publicado na  
Revista *Cytogenetics and  
Genome Research* - ISSN 1424-  
8581 – Basel – Switzerland,  
2007.

## A radiation hybrid map of river buffalo (*Bubalus bubalis*) chromosome 7 and comparative mapping to the cattle and human genomes

T. Goldammer<sup>a</sup> R. Weikard<sup>a</sup> M.N. Miziara<sup>b</sup> R.M. Brunner<sup>a</sup> R. Agarwala<sup>c</sup>  
A.A. Schäffer<sup>c</sup> J.E. Womack<sup>d</sup> M.E.J. Amaral<sup>b,d</sup>

<sup>a</sup>Forschungsbereich Molekularbiologie, Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN), Dummerstorf (Germany); <sup>b</sup>Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE, UNESP, São José do Rio Preto, SP (Brasil); <sup>c</sup>National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Bethesda, MD (USA); <sup>d</sup>Department of Veterinary Pathobiology, Texas A&M University, College Station, TX (USA)

Accepted in revised form for publication by J. Smith, 26 October 2007.

**Abstract.** A preliminary radiation hybrid (RH) map containing 50 loci on chromosome 7 of the domestic river buffalo *Bubalus bubalis* (BBU; 2n = 50) was constructed based on a comparative mapping approach. The RH map of BBU7 includes thirty-seven gene markers and thirteen microsatellites. All loci have been previously assigned to *Bos taurus* (BTA) chromosome BTA6, which is known for its association with several economically important milk production traits in cattle. The map consists of two linkage groups spanning a total length of 627.9 cR<sub>5,000</sub>. Comparative analysis of the BBU7 RH<sub>5,000</sub> map with BTA6 in cattle gave new evidence for strong similarity between the two chromo-

somes over their entire length and exposed minor differences in locus order. Comparison of the BBU7 RH<sub>5,000</sub> map with the *Homo sapiens* (HSA) genome revealed similarity with a large chromosome segment of HSA4. Comparative analysis of loci in both species revealed more variability than previously known in gene order and several chromosome rearrangements including centromere relocation. The data obtained in our study define the evolutionarily conserved segment on BBU7 and HSA4 to be between 3.5 megabases (Mb) and 115.8 Mb in the HSA4 (genome build 36) DNA sequence.

Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

The economic importance of river buffalo as livestock species in many countries around the world is undisputed. More than 168 million domesticated river buffaloes (*Bubalus bubalis* (Linnaeus 1758) were counted worldwide, which is more than 11% of the Bovinae world livestock population

(Iannuzzi et al., 2003; FAO 2005, 2006, 2007). Construction of a high-resolution river buffalo gene map, linked with trait associated genome regions, will therefore be an important milestone for developing efficient breeding strategies and modern productive phenotypes. The map will be used as a tool for genome-wide analysis of functional diversity of trait associated candidate genes within the numerous described river buffalo breeds (e.g. FAO 2005, Kumar et al., 2007). Likewise, an elucidated genome of the river buffalo will contribute enormously to a better understanding of genome evolution in Ruminantia, specifically in domestic Bovidae. Various projects, including the definition of a river buffalo karyotype nomenclature (e.g. Iannuzzi, 1994; Popescu et al., 1996), and numerous synteny, fluorescence in situ hybridization (FISH), and Zoo-FISH mapping experiments (e.g. Iannuzzi et al., 1996, 1998, 2001, 2003; de Hondt et al., 1997;

Grant GO-896/6-2 from the Deutsche Forschungsgemeinschaft and the Intramural Research Program of the National Institutes of Health, NLM supported this comparative mapping study in ruminants.

Request reprints from Tom Goldammer  
Forschungsbereich Molekularbiologie  
Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN)  
Wilhelm-Stahl-Allee 2, D-18196 Dummerstorf (Germany)  
telephone: +49 38208 68708; fax: +49 38208 68702  
e-mail: tomgoldammer@fbn-dummerstorf.de

El Nahas et al., 2001; Di Meo et al., 2002) initiated the genome analysis in river buffalo and opened the gate for complex genome-wide studies such as RH mapping. A 5,000 rad whole genome radiation hybrid panel for river buffalo (BBURH<sub>5,000</sub>) was recently generated by this mapping approach. The potential of this panel for genotyping RH markers by PCR and subsequent RH linkage map construction has been already confirmed (Amaral et al., 2007; Miziara et al., 2007; Stafuzza et al., 2007).

This study focused on comparative analysis of BBU7 by interspecies-specific transfer of cattle and human genome data to the river buffalo genome. Previous physical mapping has comparatively anchored five bovine genes and two microsatellite markers on BBU7, which made it possible to estimate the size and determine the orientation and order of conserved chromosome fragments between BBU7, BTA6, and the human reference chromosome HSA4 (Di Meo et al., 2000; Iannuzzi et al., 2001, 2003). A higher map resolution is required for a more detailed chromosome description that will allow trait association studies, and subsequently, the identification of positional candidate genes for functional studies. BBU7 received early attention in our buffalo mapping project because the homologous chromosome BTA6 harbors several quantitative trait loci for economically important traits, including milk production traits in dairy cattle as well as growth and body composition traits in meat cattle (e.g. Khatkar et al., 2004, 2005; Schnabel et al., 2005; Weikard et al., 2005; Polineni et al., 2006).

This study develops a first-generation RH map of the second largest acrocentric chromosome in river buffalo, BBU7, identifies chromosome rearrangements, analyses the comparative loci order, and determines evolutionarily conserved segments between BBU7, BTA6, and HSA4.

## Material and methods

### *DNA sequences, primer design, genotyping by PCR, DNA sequencing*

Initially, genotyping experiments were performed with published primer sequences. Seventy-five DNA sequences (genes and microsatellite markers) for mapping were chosen from the BTA6 RH<sub>12,000</sub> map (Rexroad III et al., 2000; Weikard et al., 2006). When available bovine primer sequences did not generate any PCR product with river buffalo genomic DNA or displayed weak typing signals after PCR amplification within the RH panel, markers were completely excluded from further genotyping or new primer pairs were designed based on bovine and human reference DNA sequences by genome database search at the National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). The software program PRIMER3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) was used to design oligonucleotide primers for PCR (Rozen and Skaletsky, 2000). Genotyping by PCR of DNA sequences was performed in DNA from 90 selected RH cell lines of the BBURH<sub>5,000</sub> panel (Amaral et al., 2007). The scoring of genotyping signals indicates presence (1) or absence (0) of RH markers within cell lines. Double typing of all DNA sequences within the BBURH<sub>5,000</sub> panel increased the accuracy of retention data calculation for RH mapping; when the two typings gave discordant results, this was recorded as a 2 in the digitized input for map computation. PCR used in primer tests and hybrid cell lines followed a standard protocol (Goldammer et al., 2004). *Taq* cycle sequencing of bovine PCR products with the automated sequencer 310C (Applied Biosystems) identified corresponding

river buffalo DNA sequences. NCBI BLAST (Altschul et al., 1997) search with the river buffalo DNA sequences identified similarity with corresponding bovine and human genome data.

### *Construction of the BBU7 RH<sub>5,000</sub> map*

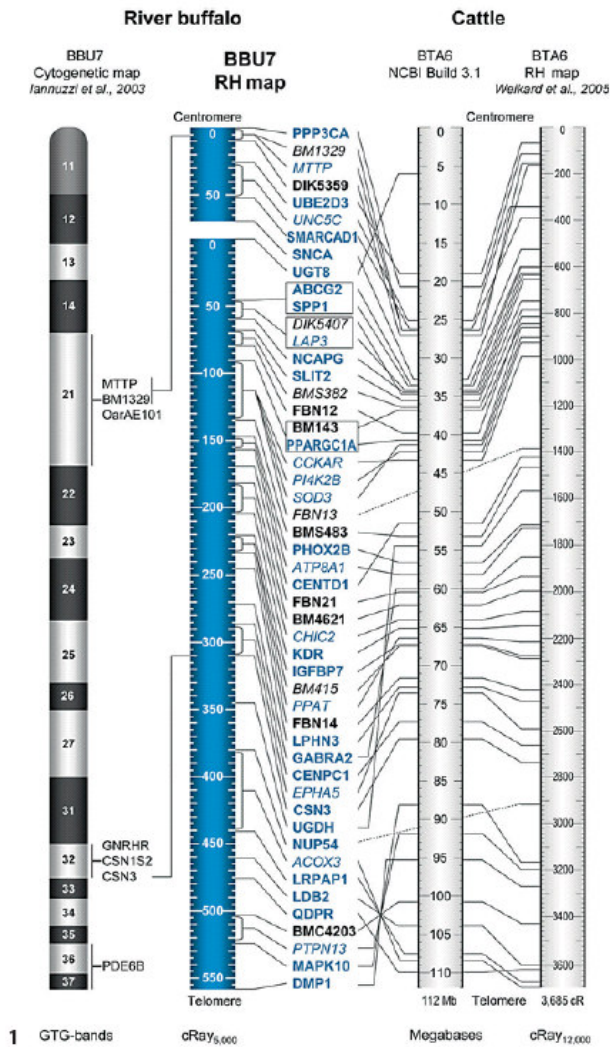
The software packages *rh\_tsp\_map* 3.0 (Agarwala et al., 2000; Schäffer et al., 2007) and CONCORDE (Applegate et al., 2006) were used for RH map construction, using the maximum likelihood (MLE) criterion. We followed the steps in the *rh\_tsp\_map* tutorial ([ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/agarwala/rhmapping/rh\\_tsp\\_map.tar.gz](ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/agarwala/rhmapping/rh_tsp_map.tar.gz)) through placement of markers with respect to framework maps, but we did not assign final cR positions to the placed markers. The same procedure was used for maps of BBU6 (Stafuzza et al., 2007) and BBU1 (Miziara et al., 2007), except that in this study, we increased the LOD score threshold for constructing linkage groups to 7.0 because the overall collection of markers has grown, so that higher inter-chromosomal LOD scores would be expected to occur by chance.

## Results

A total of 75 bovine genes and microsatellites were included in the RH mapping study. Fifty-seven of the available or newly designed bovine primer sets produced PCR products with river buffalo genomic DNA and reliable genotyping results within the BBURH<sub>5,000</sub> panel. DNA sequencing of PCR products confirmed sequence specificity of mapped RH markers. Seven markers were dropped because they could not be included in the framework maps and could not be reliably placed with respect to the framework maps. The RH maps include the remaining 50 RH markers (37 genes and 13 microsatellites) (Fig. 1). The first step of map construction resulted in the generation of two RH linkage groups. The map of the first group consists of eight RH markers (6 genes and 2 microsatellites) and has a length of 69.31 cR<sub>5,000</sub>. The map of the second linkage group contains the remaining 42 RH markers (31 genes and 11 microsatellites). The calculated length for this group is 558.55 cR<sub>5,000</sub>. The orientation of the large group was determined because several markers shown near the upper end have pairwise inter-group LOD score >5.0 with a marker in the small group, while markers near the lower end appear unlinked to the small group. The orientation of the small group was made consistent with BTA6 because inter-group scores do not strongly favor one possible orientation of the small group over the other. The cytogenetic anchor loci for *MTTP* and *BM1329* at position BBU7q21 and *CSN3* at BBU7q32 (Iannuzzi et al., 2003) enabled the chromosome orientation of the BBU7 RH<sub>5,000</sub> map as presented in Fig. 1.

The BBU7 RH<sub>5,000</sub> map is based on a framework map composed of 31 RH markers. Seventeen RH markers, which did not meet the statistical criteria for a frame marker were placed in the most likely framework interval on the map. The marker retention frequency averaged 27.8%, varying from 18.9% for *DMP1* to 51.1% for *NUP54* (Fig. 2). Table 1 presents additional information about RH markers, genotyping by PCR, and RH mapping results.

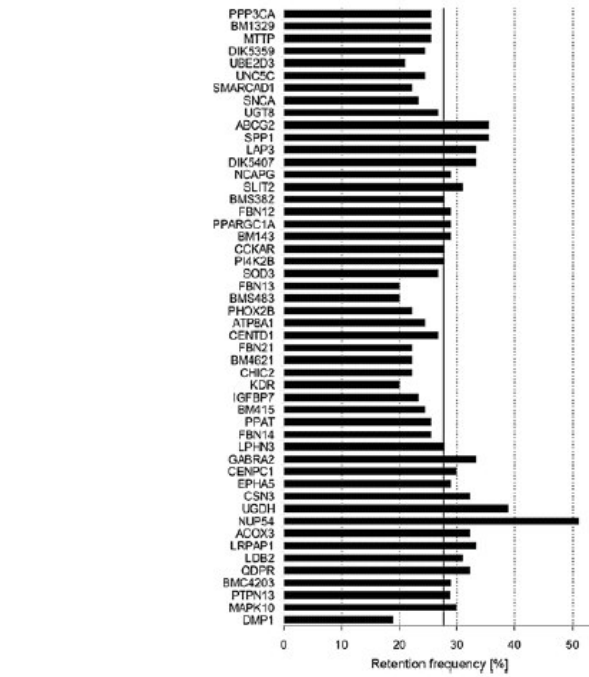
Comparison of the calculated locus order for BBU7 with the RH<sub>12,000</sub> reference map for cattle BTA6 (Weikard et al., 2006) and with the cattle genome sequence map for BTA6



1 GTG-bands cRays<sub>5,000</sub> Megabases cRays<sub>12,000</sub>

reveals complete synteny between analyzed chromosome segments and a similar locus order between both chromosomes. Contrary to the locus order on BTA6, mapping of *UGT8* on BBU7 resulted in a more distal locus position. Likewise, *GABRA2* and *UGDH* have assignments more distal in the presented map compared with cattle data. The telomere region of BBU7 displays the most conspicuous rearrangement in loci order compared with BTA6. Assignment of the chromosome segment harboring loci *PTPN13*, *MAPK10*, and *DMP1* to the telomere end of the BBU7 RH<sub>5,000</sub> map suggests a chromosome rearrangement on BBU7 compared with BTA6.

Comparison of loci from orthologous genes between the BBU7 RH<sub>5,000</sub> map and the human genome identified similarity of BBU7 exclusively with chromosome fragments of HSA4 build 36 (Fig. 3). The constructed comparative gene



2  
**Fig. 1.** BBU7 RH<sub>5,000</sub> map comparison to cytogenetic data of BBU7 (GTG-bands), cattle BTA6 RH<sub>12,000</sub> map, and BTA DNA sequence (NCBI *Bos taurus* build 3.1). The cattle maps show only those loci that correspond to BBU7 markers. Black lines connect corresponding loci between displayed maps. Blue and black colors identify genes and microsatellite markers, respectively. Boldface type indicates assigned frame markers and frame identical markers. Italic type identifies placed markers and brackets determine intervals of placement in the map. Loci are in a rectangle, if RH markers are at the same position in the BBU7 RH<sub>5,000</sub> map due to identical retention patterns.

**Fig. 2.** Retention frequencies of 50 RH markers on the BBU7 RH<sub>5,000</sub> map. A solid line indicates the average retention frequency of 27.8% for all RH markers. The Y axis displays names of every other RH marker.

map including 37 gene loci from BBU7 covers a syntenic region on HSA4 between 3.5 Mb for *LRPAP1* and 115.8 Mb for *UGT8*, which represents the chromosome fragment HSA4p16 to HSA4q26 at the cytogenetic level. According to newly apparent variations in gene order, we grouped comparative loci in five syntenic segments on BBU7, which correspond to five segments on HSA4. These segments identified several intrachromosomal breakpoints between BBU7 and HSA4. One major breakpoint on HSA4 is located between *DMP1* and *SPP1* (position 89 Mb). Whereas *DMP1* represents the telomere side of BBU7, *SPP1* is at the edge of the most proximal segment on BBU7. Another breakpoint was detected at the p-arm of HSA4. The telomere side of it corresponds to another distal segment on BBU7 harboring the genes *ACOX3*, *LRPAP1*, *LDB2*, and *QDPR*.

**Table 1.** Summarized information about BBU7 RH<sub>5,000</sub> markers, PCR, and relevant RH<sub>5,000</sub> mapping data based on the rh\_tsp\_map 3.0 analysis

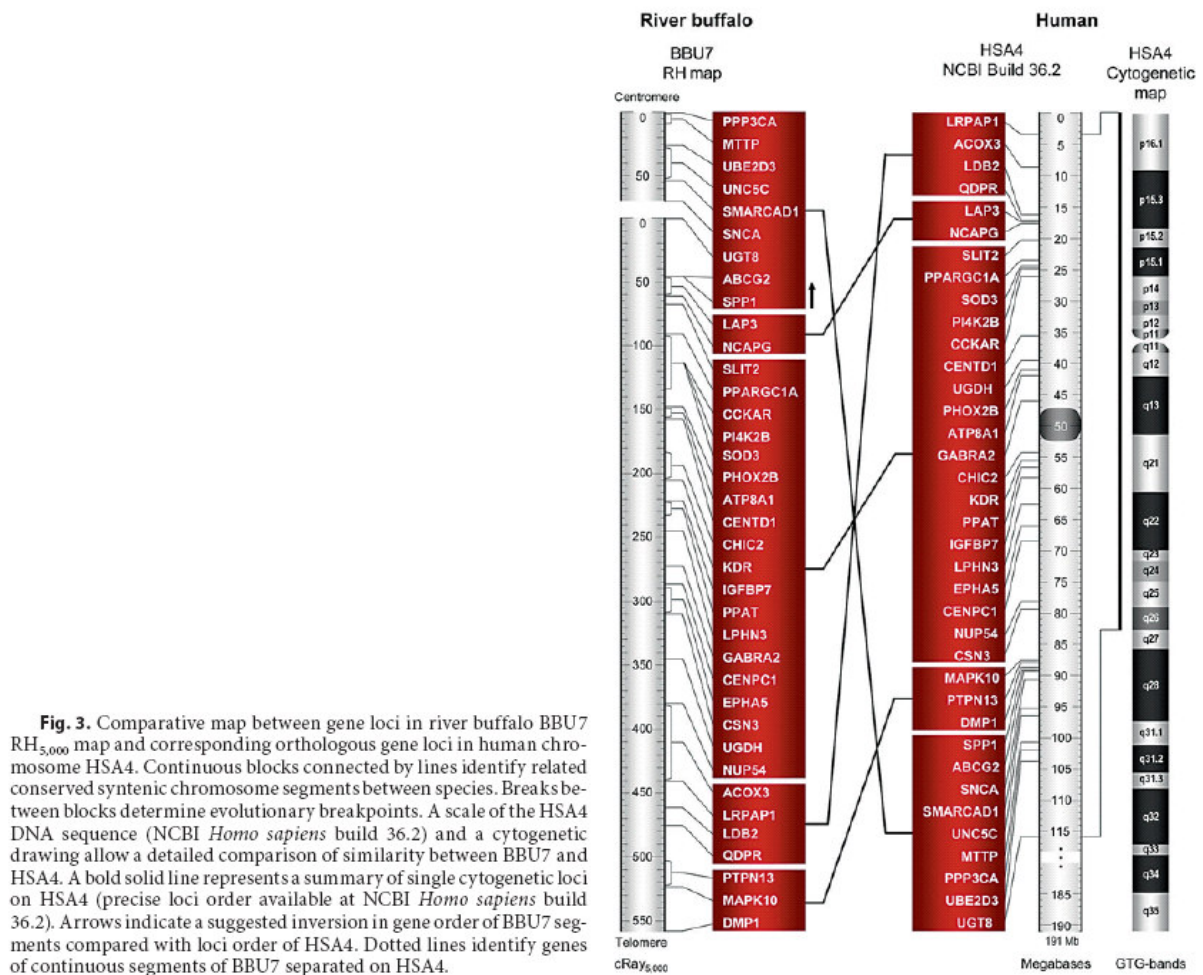
RH marker				PCR <sup>a</sup>			RH <sub>5,000</sub> mapping data <sup>b</sup>			
<i>HGNC locus symbol</i>	Alternate cattle locus symbol	Locus type	Cattle reference acc. number	Primer sequences (5'-3') or primer source reference	AT °C	L bp	Position of RH marker cR <sub>5,000</sub>		MP	
							accum.	next		
<b>RH-LG 1</b>										
<i>PPP3CA</i>		gene	NM_174787	GAACCACCTGCTTATGGACCT ACACCCCTGACTGTGTGT	58	111	0.0	6.0	F	
	BM1329	MS	G18422	Bishop et al., 1994	58	119	6.0	0.0	P	
<i>MTP</i>	MTP	gene	XM_592505	TTGGGAGGACTTAAAAAGC AGGGACATCATATCTCTGGAGTG	58	171	6.0	3.4	P	
	DIK5359	MS	AB166346	Ihara et al., 2004	60	129	9.4	17.1	F	
<i>UBE2D3</i>		gene	NM_001075135	Weikard et al., 2006	55	124	26.5	18.4	F	
<i>UNC5C</i>	LOC533256	gene	XM_612601	Weikard et al., 2006	55	220	44.9	7.3	P	
<i>SMARCAD1</i>	LOC530506	gene	XM_608980	Weikard et al., 2006	60	153	52.2	17.1	F	
<i>SNCA</i>		gene	NM_001034041	Weikard et al., 2006	60	171	69.3		F	
<b>RH-LG 2</b>										
<i>UGT8</i>		gene	NM_001083635	Weikard et al., 2006	55	108	0.0	45.5	F	
<i>ABCG2</i>		gene	NM_001037478	GGAACCTCAGTTTATCCGTGGTG CAGGAGCAAAGGACAGCAT	60	150	45.5	0.0	F	
<i>SPP1</i>		gene	NM_174187	GACCTAGATCATAAGAGTGAAGAAGAC GTATTTTCTCCTTTCAATTGACCTC	58	135	45.5	6.0	Fi	
	DIK5407	MS	AB166386	Ihara et al., 2004	60	186	51.5	0.0	P	
<i>LAP3</i>	LOC781648	gene	BC105385	TACAGCTGCAGCATTCTGA TCTTGACTGAACCGAAACAGG	60	196	51.5	8.0	P	
<i>NCAPG</i>	LOC531234	gene	XM_609721	Weikard et al., 2006	60	117	59.5	8.4	F	
<i>SLIT2</i>		gene	XM_613831	Weikard et al., 2006	58	161	67.9	8.0	F	
	BMS382	MS	G18842	Stone et al., 1995	55	150	75.9	3.3	P	
	FBN12	MS	Z83209	Weikard et al., 2006	58	164	79.2	11.4	F	
<i>PPARGC1A</i>		gene	NM_177945	Weikard et al., 2006	58	244	90.6	0.0	F	
	BM143	MS	G18387	Bishop et al., 1994	60	90	90.6	12.6	Fi	
<i>CCKAR</i>	LOC506207	gene	XM_582625	Weikard et al., 2006	58	223	103.2	0.0	P	
<i>PI4K2B</i>	LOC521790	gene	XM_600059	Weikard et al., 2006	58	128	103.2	2.3	P	
<i>SOD3</i>	ECSOD	gene	XM_611006	Weikard et al., 2006	60	244	105.5	22.0	P	
	FBN13	MS	Z83210	Weikard et al., 1997	58	151	127.5	6.6	P	
	BMS483	MS	G18848	Stone et al., 1995	58	109	134.1	13.5	F	
<i>PHOX2B</i>	LOC783703	gene	XM_001252230	Weikard et al., 2006	55	206	147.6	2.4	F	
<i>ATP8A1</i>		gene	NM_174838	Weikard et al., 2006	55	114	150.0	6.9	P	
<i>CENTD1</i>	LOC512010	gene	XM_589445	TCCTCAGCTAGTGAAGTGAATGTT TATTCCAACTTTGAGGAGCACA	55	150	156.9	12.5	F	
	FBN21	MS	AJ416566	Weikard et al., 2002	55	223	169.4	13.4	F	
	BM4621	MS	G18529	Bishop et al., 1994	55	137	182.8	13.5	F	
<i>CHIC2</i>	LOC781477	gene	NM_001078048	Weikard et al., 2006	55	156	196.3	8.0	P	
<i>KDR</i>	FLK-1	gene	XM_611785	Weikard et al., 2002	55	225	204.3	16.9	F	
<i>IGFBP7</i>	LOC616368	gene	XM_868373	Weikard et al., 2006	55	114	221.2	3.6	F	
	BM415	MS	G18413	Bishop et al., 1994	62	141	224.8	1.4	P	
<i>PPAT</i>	MGC148403	gene	XM_586663	Weikard et al., 2006	55	106	226.2	7.4	P	
	FBN14	MS	Z83211	AGATCCCTTGGAGGAGGAAA GAATTTGCATCACTGTTCTCCA	55	221	233.6	11.9	F	
<i>LPHN3</i>		gene	NM_181033	GGTGCCAAACACAGTGAGC CGTGCTGCTGAAGGAGATGT	60	106	245.5	27.1	F	
<i>GABRA2</i>		gene	NM_174541	TTGGACATACAATGCCGTCTGA AATTGTCTCCTTCCAATTGAT	55	146	272.6	13.9	F	
<i>CENPC1</i>		gene	NM_001045881	AGGCCACGAGATACATACCAA TGCTGCTTTCCCTTTCTTG	58	128	286.5	7.3	F	
<i>EPHA5</i>	LOC784561	gene	XM_001252832	GGGAAGAGATTGGTGAAGTTG CCGCAGAGTAAATTTGAGTTCTATG	58	158	293.8	16.2	P	
<i>CSN3</i>	CSN10	gene	NM_174294	CGCTGTGAGAAAAGATGAAAGATT TTGGGCAGGTGACCTAACT	55	190	310.0	35.1	F	
<i>UGDH</i>		gene	NM_174211	Weikard et al., 2006	55	86	345.1	34.8	F	
<i>NUP54</i>	LOC513286	gene	NM_001075285	Weikard et al., 2002	55	127	379.9	48.9	F	
<i>ACOX3</i>	LOC510065	gene	XR_028866	TGCGCTGTAAGAGGGTCTTC CATGCAGGAAGAAGCTTGACG	55	135	428.8	12.7	P	
<i>LRPAP1</i>	LOC504957	gene	NM_001080225	GAGGAGCTCAAGCACTTTGAA AGCTCCTTGGTCTCTCTCTC	55	167	441.5	20.3	F	
<i>LDB2</i>		gene	NM_001046611	Weikard et al., 2006	62	140	461.8	14.2	F	

**Table 1** (continued)

RH marker				PCR <sup>a</sup>			RH <sub>5,000</sub> mapping data <sup>b</sup>		
<i>HGNC locus symbol</i>	Alternate cattle locus symbol	Locus type	Cattle reference acc. number	Primer sequences (5'-3') or primer source reference	AT °C	L bp	Position of RH marker cR <sub>5,000</sub>	MP	
							accum.	next	
QDPR	LOC509926	gene	NM_001076492	Weikard et al., 2006	60	146	476.0	27.0	F
	BMC4203	MS	G19110	GGCCCGAGGTGTAGTGTA GGTGGCTACAGTCCATAGG	55	152	503.0	16.6	F
PTPN13		gene	NM_174590	CAGTGCTGCAACCTGTGATA GCGGATGTATAGCATGATGGAG	52	400	519.6	4.2	P
MAPK10	LOC509652	gene	XM_878132	CCAAGCCAGAGACTTGCTGT CAGCAGGGTCATACCAGACA	55	110	523.8	34.8	F
DMP1		gene	NM_174038	GACGATGATGAAGACGAGAGC CCTTGTGGGGTGCTGTCT	55	180	558.6		F

<sup>a</sup> AT: annealing temperature; L: length of PCR product.

<sup>b</sup> F: framework marker; Fi: marker with identical locus as framework marker; HGNC: HUGO Gene Nomenclature Committee; MP: marker placement; P: placed markers (CentiRay positions of placed markers were estimated by interpolation).



**Fig. 3.** Comparative map between gene loci in river buffalo BBU7 RH<sub>5,000</sub> map and corresponding orthologous gene loci in human chromosome HSA4. Continuous blocks connected by lines identify related conserved syntenic chromosome segments between species. Breaks between blocks determine evolutionary breakpoints. A scale of the HSA4 DNA sequence (NCBI *Homo sapiens* build 36.2) and a cytogenetic drawing allow a detailed comparison of similarity between BBU7 and HSA4. A bold solid line represents a summary of single cytogenetic loci on HSA4 (precise loci order available at NCBI *Homo sapiens* build 36.2). Arrows indicate a suggested inversion in gene order of BBU7 segments compared with loci order of HSA4. Dotted lines identify genes of continuous segments of BBU7 separated on HSA4.

## Discussion

We used a comparative mapping approach, based on available human and cattle genome data to construct an RH map for river buffalo chromosome BBU7. The RH<sub>5,000</sub> map provides sufficient information for identification of syntenic blocks between related chromosomes of the three species and uncovers evolutionary breakpoint regions. Additionally, the map contributes new physical anchors, which enable improved *in silico* gene assignment to BBU7.

We mapped 50 of the 57 typed markers on river buffalo chromosome BBU7. Surprisingly, only 36 (48%) of the initially tested 75 cattle primer sequences from the RH<sub>12,000</sub> map of BTA6 (Weikard et al., 2006) amplified corresponding DNA sequences in river buffalo genomic DNA. Another twenty-one were developed by designing new sets of primers primarily in genome regions conserved between cattle and human. However, the drop out of numerous RH markers decreased density in some regions of the map. Thirty-seven gene loci allowed a comparative analysis with the human genome, and 13 nearly uniformly distributed microsatellite markers represent putative informative markers potentially useful in quantitative trait studies in river buffalo. Except for a few discrepancies and small rearrangements, we found that the BBU7 RH<sub>5,000</sub> map has a similar marker order to BTA6. We found a locus for *NUP54* on BBU7; *NUP54* has been assigned by RH mapping on BTA6 (Weikard et al., 2006) and likewise on HSA4 (NCBI *Homo sapiens* build 36.2), but is not identified on the annotated *Bos taurus* genome build 3.1.

The most interesting loci in our map are *UGT8* and *NUP54*. In cattle, *UGT8* is located in a very proximal position of 6.1 Mb on BTA6, which is about 13 Mb away from *UBE2D3*, the next distal locus with a comparative placement in the BBU7 RH<sub>5,000</sub> map (NCBI *Bos taurus* build 3.1; Fig. 1). According to our data, *UGT8* represents the distal boundary of conserved segments on HSA4 compared with BBU7. Although no corresponding position for *UGT8* was identified in the BTA6 RH<sub>12,000</sub> map (Weikard et al., 2006) and *UGT8* shows only weak linkage with *SNCA* (RH linkage group 1) and is furthermore located in a relative high distance of 45.5 cR<sub>5,000</sub> to its next marker *ABCG2* in RH linkage group 2, we calculated its locus as proximal frame marker of RH linkage group 2 on BBU7. Mapping of more RH markers and some cytogenetic anchors in this chromosome region is required to define the exact position of *UGT8* and to form a single linkage group with the remaining markers of the first linkage group. The high retention frequency of 51% for *NUP54*, differs substantially from mean value of the other mapped RH markers and caused distances of 34.8 cR<sub>5,000</sub> and 61.6 cR<sub>5,000</sub> to its neighboring frame markers *UGDH* and *LRPAP1*, respectively. Perhaps the cattle primers for *NUP54* amplified sequences of other genes in the *NUP* multigene family in some cell lines of the BBURH<sub>5,000</sub> panel. Nevertheless, loci for *NUP54* in BTA6 and HSA4 are consistent with its relative position on BBU7. Further mapping of region-specific markers should clarify these findings.

A first view at the telomere of BBU7 would suggest an inversion of eight loci in this area compared with BTA6. However, the region illustrates inconsistency in the locus order, which makes it crucial to assign more markers in this region. The BBU7 RH<sub>5,000</sub> map is cytogenetically linked by *MTP* and *BM1329* to BBU7q21 and by *CSN3* to BBU7q32 (Iannuzzi et al., 2003). No other cytogenetic anchors link the BBU7 RH<sub>5,000</sub> map to the chromosome yet. Therefore, we suggest that some of the new markers on the RH map be mapped cytogenetically. This is a useful approach in comparative mapping studies for ordering complex RH linkage groups, as illustrated in the recent construction of an RH<sub>5,000</sub> map for sheep chromosome 23 (Tetens et al., 2007).

As expected, the evolutionary conservation of chromosome segments between BBU7 and HSA4 follows principally the known comparative order of segments between BTA6 and HSA4 (Weikard et al., 2006, 2007). Small discrepancies in locus order within conserved segments might indicate small chromosome rearrangements, but could also be due to the insufficient resolution of the BBU7 RH<sub>5,000</sub> map in specific regions of the chromosome. Segments in the middle part of BBU7 correspond with HSA4 p-arm and q-arm fragments covering the HSA4 centromere. This suggests that a centromere translocation in Bovidae or in Hominidae occurred during evolution. The suggestion of rearrangements between the two segments in the telomere region of BBU7 and HSA4 q-arm and p-arm are based on seven loci. The findings indicate noticeable rearrangements, which need further evaluation with more markers. The proximal syntenic block on BBU7, composed of nine loci, was located at the q-arm of HSA4, which indicates another chromosome rearrangement between BBU7 and HSA4. Based on the identified gene order, we suggest an inversion of loci between both chromosomes. However, on BBU7 this block includes genes of two distinct RH linkage groups. Consequently, a more precise characterization of this region on BBU7 is necessary.

In sum, the constructed RH<sub>5,000</sub> map for BBU7 allows the description of variation and similarity between corresponding chromosomes of different species as cattle and human. The future assignment of numerous orthologous loci to the new identified breakpoints and to the start and end points of the BBU7 RH<sub>5,000</sub> map will improve the presented map and contribute to the generation of a high-resolution gene map for the river buffalo genome.

## Acknowledgements

We gratefully thank Elaine Owens, Christie Fickey, and Janice Elliott for providing the RH panel DNA and Janine Vogt for excellent technical assistance.

## 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).
- Altschul SE, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al: Gapped BLAST and PSI-BLAST – A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402 (1997).
- Amaral MEJ, Owens KE, Elliott JS, Fickey C, Schäffer AA, 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* 38:311–314 (2007).
- Applegate D, Bixby R, Chvátal V, Cook W: *The Traveling Salesman Problem: A Computational Study* (Princeton University Press, Princeton, NJ, USA 2006).
- Bishop MD, Kappes SM, Keele JW, Stone RT, Sundén SLF, et al: A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136:619–639 (1994).
- De Hondt, Gallagher D, Oraby H, Othman OE, Bosma AA, et al: Gene mapping in the river buffalo (*Bubalus bubalis* L.): five syntenic groups. *J Anim Breed Genet* 114:79–85 (1997).
- Di Meo GP, Perucatti A, Schibler L, Incarnato D, Ferrara L, et al: Thirteen type I loci from HSA4q, HSA6p, HSA7q and HSA12q were comparatively FISH-mapped in four river buffalo and sheep chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 90:102–105 (2000).
- Di Meo GP, Perucatti A, Incarnato D, Ferretti L, Di Berardino D, et al: Comparative mapping of twenty-eight bovine loci in sheep (*Ovis aries*, 2n = 54) and river buffalo (*Bubalus bubalis*, 2n = 50) by FISH. *Cytogenet Genome Res* 98:262–264 (2002).
- 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).
- FAO: Buffalo Production and Research. Borghese A (ed), Rome, Italy: 321 p (2005).
- FAO: Livestock's Long Shadow: Environmental Issues and Options. Steinfeld H, Gerber P, Wassenaar T, Castel V, Rosales M, de Haan C (eds), Rome, Italy: 390 p (2006).
- FAO: The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Rischkowsky B, Pilling D (eds) Rome, Italy: 523 p (2007).
- Goldammer T, Kata SR, Brunner RM, Kuhn C, Weikard R, Womack JE, Schwerin M: 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).
- 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. *Cytogenet Cell Genet* 67:102–113 (1994).
- Iannuzzi L, Gallagher DS, Womack JE, Meo GP, Shelling CP, et al: FISH mapping of the alpha-S2 casein gene on river buffalo and cattle chromosomes identifies a nomenclature discrepancy in the bovine karyotype. *Chromosome Res* 4:159–162 (1996).
- Iannuzzi L, Di Meo GP, Perucatti A, Bardaro T: ZOO-FISH and R-banding reveal extensive conservation of human chromosome regions in euchromatic regions of river buffalo chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 82:210–214 (1998).
- Iannuzzi L, Di Meo GP, Hayes H, Perucatti A, Incarnato D, et al: FISH-mapping of 31 type I loci (Texas markers) to river buffalo chromosomes. *Chromosome Res* 9:339–342 (2001).
- 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).
- Khatkar MS, Thomson PC, Tammen I, Raadsma HW: Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. *Genet Sel Evol* 36:163–190 (2004).
- Khatkar MS, Thomson PC, Tammen I, Costa F, Raadsma HW: Combined QTL map of dairy cattle traits. [http://www.vetsci.usyd.edu.au/reprogen/QTL\\_Map](http://www.vetsci.usyd.edu.au/reprogen/QTL_Map) (2005).
- Kumar S, Nagarajan M, Sandhu JS, Kumar N, Behl V, Nishanth G: Mitochondrial DNA analyses of Indian water buffalo support a distinct genetic origin of river and swamp buffalo. *Anim Genet* 38:227–232 (2007).
- Miziara MN, Goldammer T, Stafuzza NB, Agarwala R, Schäffer AA, et al: Generation of a radiation hybrid map of river buffalo (*Bubalus bubalis*) chromosome one (BBU1). *Cytogenet Genome Res* 119:100–104 (2007).
- NCBI *Bos taurus* (cow) build 3.1, [www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map\\_search.cgi?taxid=9913](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=9913).
- NCBI *Homo sapiens* (human) build 36.2, [www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map\\_search.cgi?taxid=9606](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=9606).
- NCBI – National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- 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).
- Popescu CP, Long S, Riggs P, Womack J, Schmutz S, Fries R, Gallagher D, eds: Texas nomenclature, 1996 – Standardization of cattle karyotype nomenclature: report of the committee for the standardization of the cattle karyotype. *Cytogenet Cell Genet* 74:259–261 (1996).
- Rexroad CE III, Owens EK, Johnson JS, Womack JE: A 12,000 rad whole genome radiation hybrid panel for high resolution mapping in cattle: characterization of the centromeric end of chromosome 1. *Anim Genet* 31:262–265 (2000).
- Rozen S, Skaletsky H: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365–386 (2000).
- 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).
- Schnabel RD, Kim J-J, Ashwell MS, Sonstegard TS, Van Tassel CP, et al: Fine-mapping milk production quantitative trait loci on BTA6: analysis of the bovine osteopontin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:6896–6901 (2005).
- Stafuzza NB, Ianella P, Miziara MN, Agarwala R, Schäffer AA: Preliminary radiation hybrid map for river buffalo chromosome 6 and comparison to bovine chromosome 3. *Anim Genet* 38:406–409 (2007).
- Stone RT, Pulido JC, Duyk GM, Kappes SM, Keele JW, Beattie CW: A small-insert bovine genomic library highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Mamm Genome* 6:714–724 (1995).
- Tetens J, Goldammer T, Maddox JF, Cockett NE, Leeb T, Drögemüller C: A radiation hybrid map of sheep chromosome 23 based on ovine BAC-end sequences. *Anim Genet* 38:132–140 (2007).
- Weikard R, Goldammer T, Kühn C, Barendse W, Schwerin M: Targeted development of microsatellite markers from the defined region of bovine chromosome 6q21–31. *Mamm Genome* 8:836–840 (1997).
- Weikard R, Kühn C, Goldammer T, Laurent P, Womack JE, Schwerin M: Targeted construction of a high-resolution, integrated, comprehensive, and comparative map for a region specific to bovine chromosome 6 based on radiation hybrid mapping. *Genomics* 79:768–776 (2002).
- Weikard R, Kühn C, Goldammer T, Freyer G, Schwerin M: The bovine *PPARGCIA* gene: molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. *Physiol Genomics* 21:1–13 (2005).
- Weikard R, Goldammer T, Laurent P, Womack JE, Kuehn C: A gene-based high-resolution comparative radiation hybrid map as a framework for genome sequence assembly of a bovine chromosome 6 region associated with QTL for growth, body composition, and milk performance traits. *BMC Genomics* 7:53 (2006).
- Weikard R, Goldammer T, Womack JE, Kuehn C: Forward to a detailed sequence map of bovine chromosome 6. *Cytogenet Genome Res* 116:72–79 (2007).

**Anexo D:** Artigo publicado na  
Revista *Animal Genetics* – ISSN  
eletrônico 1365-2052 – Oxford –  
England, 2007.

---

---

## 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<sup>†</sup>, A. A. Schäffer<sup>†</sup>, P. K. Riggs<sup>‡</sup>, J. E. Womack<sup>§</sup> and M. E. J. Amaral<sup>\*,§</sup>

\*Dept. Biologia, IBILCE, UNESP – São Paulo State University, São Jose Rio Preto, SP 15054-000, Brazil. <sup>†</sup>National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Bethesda, MD 20894, USA. <sup>‡</sup>Department of Animal Science, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA. <sup>§</sup>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 (BBURH<sub>5000</sub>). 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), *BLI098* 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

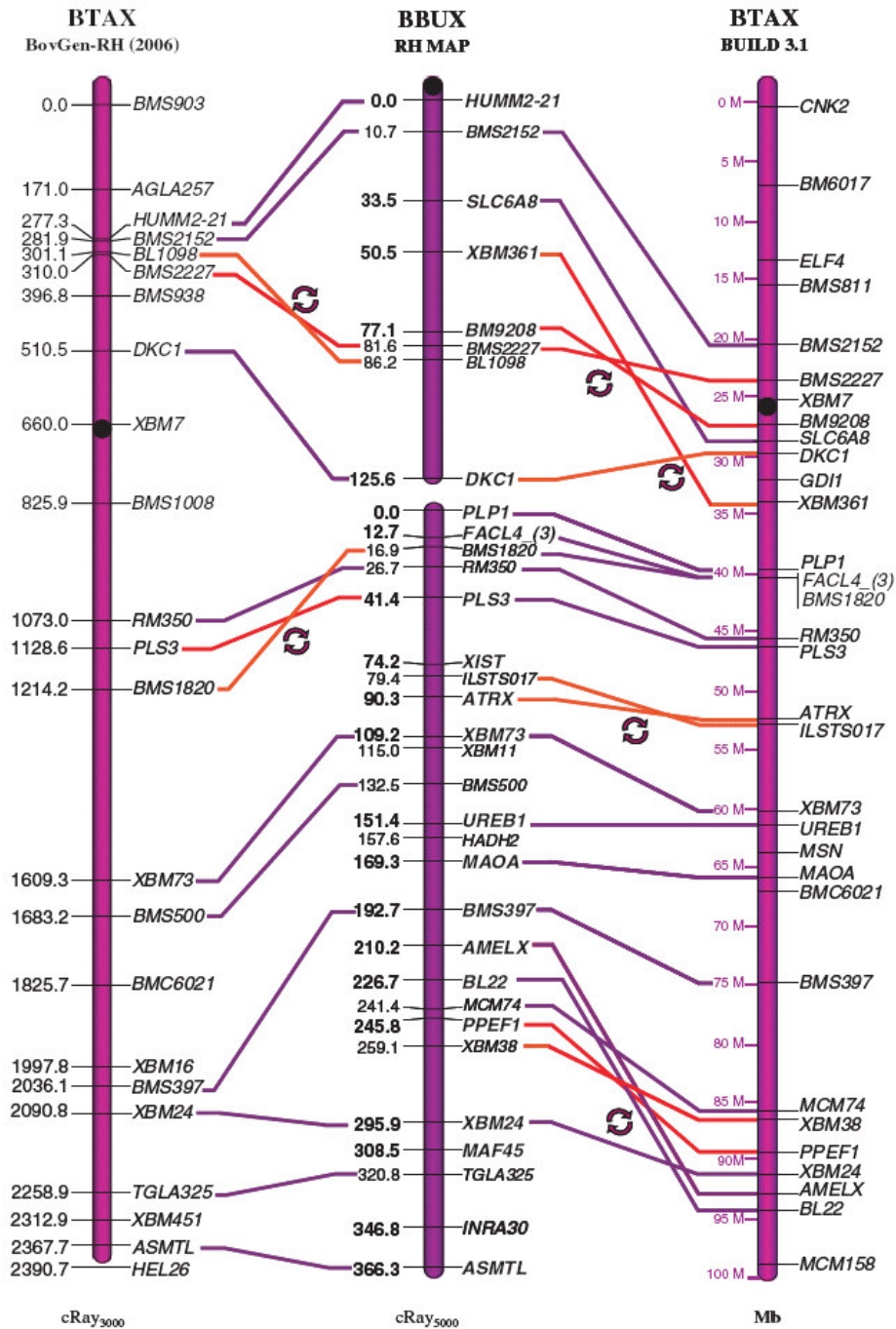


Figure 1 Comparison of the BBUX RH map (centre) with the BTAX RH map (BovGen RH map) (left), and the bovine genome BUILD 3.1 for BTAX (right). All framework markers are shown in bold letters because for each framework marker, its position is better than the next best alternative by at least 0.50 LOD 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 cR<sub>5000</sub>, while positions in the BTAX RH map are in cR<sub>3000</sub> 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 BBUPH<sub>5000</sub> panel.

Marker	Type	RF (%)	Location (cR)	T <sub>m</sub> (°C)	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	UniSTS	GenBank accession no. (cattle)
LG1								
HUMM2-21 <sup>1</sup>	MS	12.2	0.0	65	ACCAAGTTGAGAAATGGTGG	TCCATAGACAGAGAAGCCTGG	250835	M97201
BMS2152 <sup>2</sup>	MS	12.2	10.7	61	AGTGGCTTAAGCAATATGAA	TGTATTCACACCTCTGTCTGA	16531	G18928
SLC6A8 <sup>3</sup>	Gene	12.4	33.5	65	AGCAAGGTGGTGGTGGAAA	GGGTGTGCACCACTGGTGTAT	279111	AF027197
XBMS361 <sup>2</sup>	MS	12.2	50.5	56	ACACACTGAGAATTAACACTACAAAACC	ACACAACCTGAGCCACTTAAAGC	251341	AAFC03123691
BMS9208 <sup>3</sup>	MS	15.6	77.1	50	TCCAGCATCACAGCTTACC	TCTGGCAGCATCTTCTTG	71474	G18398
BL109 <sup>4</sup>	MS	15.7	81.6	65	CCAAACTTCCAGAAAGCCTC	CAGAAACCACCCAAACTAACCC	251324	AC173646
BMS2222 <sup>2</sup>	MS	14.6	86.2	60	AAATTTGCTATTTCTTAGACATGAT	ATGGTATTTTTCATAATCAGAGGTATG	2305	G18963
DKC1 <sup>3</sup>	EST	13.3	125.6	58	AGAGACACACTTACCCTCGGAA	TCGACGTACTCTTGCATCCA	278284	AW481424
LG2								
PLPT <sup>3</sup>	Gene	17.8	0.0	65	ACAGTCTGCGTCTCCATGTT	TGCCCTCTCTCTACCTGA	278921	X03098
FCL4(β) <sup>3</sup>	EST	16.7	12.7	60	ACGAACTTTTGGCCAAAC	GTAGGCTCAATAAAGGCAGTGC	278365	AW461447
BMS1820 <sup>3</sup>	MS	15.6	16.9	56	CACAAGAAATCAGACATGATGG	ACTGTGTAAGTGGAGTGGAAAGG	23799	G18604
RM350 <sup>1</sup>	MS	12.5	26.7	65	TGTCCAGATGTTGGTCTAG	AGTTCAATGATTTGCGACACC	75313	G29109
PLS3 <sup>3</sup>	Gene	15.6	41.4	62	CCTGAATGTGCCATAGTC	TCTAAGCAAGTCCCAAGAGG	278922	AW462747
X5T4	Gene	10	74.2	60	AATTTGTATCATAGAGTGG	GTCAGCCATAATTGCTCGAAGC	- <sup>5</sup>	NC_007331
IL5T017 <sup>3</sup>	Gene	12.2	79.4	54	GTCCTAAATCGAAATGCC	GCATCTATAAACCCTGTC	250806	L23491
ATRX <sup>3</sup>	Gene	10	90.3	65	GGAAGCATAGAAAGCCAGTGA	GGATGACGTTGTGGTGTATAGC	278012	AW289378
XBMS73 <sup>2</sup>	MS	8.9	109.2	61	CGATGCAGCAACAAATCCC	TTGGTGTGCTTCTGTCTGTG	251004	AAFC03053159
XBMS11 <sup>3</sup>	MS	10	115.0	60	TACTGATGGAGGTTTCTGAGA	CCCAGAGTCTTGTGTCAAGG	251008	AC168904
BMS500 <sup>2</sup>	MS	11.1	132.5	63	GAAAGTATAGAAAAGGGGG	CAGTAACAGAGATGTTGTACC	54301	G18723
UREBT <sup>2</sup>	Gene	7.8	151.4	65	ATTTGGCTGTGCTGGTCTTAG	AAGAGCGGAGGATATGGACT	279246	AW428599
HADH2 <sup>3</sup>	Gene	8.9	157.6	65	GGAAGGAGAGAGAAACAAGGT	ATTAGGCACAGGGTGAAGTGA	278513	AB002156
MAOA <sup>6</sup>	Gene	11.1	169.3	63	GGAAGTTGTAGTGGATCTGG	GGGATGGCACTAATGACATACC	New designed <sup>6</sup>	X15609
BMS397 <sup>3</sup>	MS	11.1	192.7	58	GCCACAATACCACCCG	AAATAAGCAATTTGACAGAGACTG	48316	G18564
AMELX <sup>1</sup>	Gene	10	210.2	64	GTTCTCTATTCCTCTCATCATCC	GACCCCAACTCTTCCACTATTG	- <sup>5</sup>	M86932
BL22 <sup>2</sup>	MS	13.5	226.7	56	CTGTCCCTGACTGCCC	TTTCTCTTATCTGTTCAAGTGG	251054	AAFC03110331
MCM74 <sup>2</sup>	MS	15.7	241.4	62	CAATATCTGTCCCAATCCCTGTTCC	AGATTTGGTTCATCAGCTCTATCAAG	251439	L34286
PPEF1 <sup>3</sup>	EST	15.6	245.8	60	AAGCCTAGTGTGGTCTTGG	GCTGTACTTCTCTGGTGTTC	278935	AW314533
XBMS38 <sup>3</sup>	MS	16.9	259.1	65	TGGACAACTGAGAGACTCA	TGAACATGCTGGAATCATG	250997	AAFC03011672
XBMS24 <sup>2</sup>	MS	27.0	295.9	59	TTACCACTGAGCCACCTGG	ATGATGCTTCTGCAAGAGGTT	251009	AAFC03012250
MAF45 <sup>2</sup>	MS	28.9	308.4	58	ATTGACACTAGTAAGTTAAACATGG	CAGACAACTGAGCAACTAGCCG	250702	M67436
TGLA325 <sup>4</sup>	MS	28.9	320.8	59	GGGCACTTACTCTCTGAACAAATC	GCTCACAGTCTATTCCAGAAAGTA	250950	AAFC03128020
INRA30 <sup>2</sup>	MS	28.9	346.8	59	ATGCAAACTGCTACATCACCTAT	CCCAACTCTCACATCCAGAT	250757	X67822
ASMTL <sup>3</sup>	EST	26.7	366.3	58	CCAAAGATGGTCAAGCTGACAC	TCCACAGCACTCTCTCTGACA	278001	AW656774

<sup>1</sup>USDA MARC database: <http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html>; <sup>2</sup>Ihara et al. 2004; <sup>3</sup>Everts-van der Wind et al. 2002; <sup>4</sup>Amarel et al. 2002; <sup>5</sup>No UniSTS assignment; <sup>6</sup>New designed primers from known cattle ESTs; <sup>7</sup>Vaiman 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 *QSOFT* (<http://www2.isye.gatech.edu/~wcook/qsoft/>). We followed instructions in the *rh\_tsp\_map* tutorial ([ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/agarwala/rhmapping/rh\\_tsp\\_map.tar.gz](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 BBURH<sub>5000</sub> 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 BBURH<sub>5000</sub> 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 homocologous 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 cosmids 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.

Autorizo a reprodução deste trabalho  
São José do Rio Preto, 29/08/2008

---

Melissa Nunes Miziara

