



## MARCADORES MOLECULARES MAPEADOS NO CROMOSSOMO Y BOVINO, COM O EMPREGO DO PAINEL DE CÉLULAS SOMÁTICAS HÍBRIDAS IRRADIADAS (WG-RH)<sup>1</sup>

MÔNICA REGINA VENDRAME AMARANTE<sup>2</sup>, JAMES E. WOMACK<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Apoio Financeiro: Programa de Apoio a Jovens Pesquisadores em Centros Emergentes – FAPESP, Processos N° 00/03917-2 e N° 01/07600-6.

<sup>2</sup> Professor Assistente Doutor, Faculdade de Zootecnia, UNESP- Unidade Diferenciada de Dracena, Rua Bahia, 332, Bairro Metrópole, Dracena – SP, Brasil, CEP17900-000, Email: [amarante\\_mrv@dracena.unesp.br](mailto:amarante_mrv@dracena.unesp.br)

<sup>3</sup> Department of Veterinary Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Texas A&M University, College Station, Texas, USA, TX 77843-4467.

**RESUMO** – Marcadores moleculares são seqüências de DNA que podem ser identificadas e mapeadas. Os mapas genômicos possibilitam a identificação de QTL de importância econômica. Marcadores moleculares também são utilizados na seleção por marcadores assistidos, contribuindo para o Melhoramento Genético Animal. O mapeamento genômico com o painel híbrido irradiado baseia-se na análise das quebras cromossômicas sofridas por cromossomos bovinos após a exposição a raios-X. Analisando-se a freqüência de quebras, estima-se a distância entre marcadores. Até o momento foram analisados: BM861, BRY.1, HEL26, INRA30, INRA189, MAF45, TGLA325, XBM24, XBM31, XBM451 e ZFY, visando a construção do mapa genômico do cromossomo Y bovino.

**PALAVRAS-CHAVE:** mapeamento genômico, cromossomo Y, bovinos

MAPPING MOLECULAR MARKERS ON BOVINE Y CHROMOSOME USING RADIATION HYBRID PANEL (WG-RH)

**ABSTRACT** – Molecular markers are DNA sequences that can be identified and mapped. Saturated genome maps provide QTL identification of economical important traits. Molecular markers are also used in marked assisted selection contributing to animal genetic improvement. Gene mapping using radiation hybrid panel is based on chromosome analysis after exposure to X-ray. It's possible to estimate the distance between markers analyzing frequencies of breakage. Until now, markers BM861, BRY.1, HEL26, INRA30, INRA189, MAF45, TGLA325, XBM24, XBM31, XBM451 and ZFY were analyzed to built a genome map of bovine Y chromosome.

**KEYWORDS:** gene mapping, Y chromosome, bovine

### INTRODUÇÃO

Marcadores moleculares são seqüências específicas de DNA que podem ser analisadas, identificadas e mapeadas. Esses marcadores permitiram o desenvolvimento de mapas genômicos que têm possibilitado a identificação de QTL (locos para características quantitativas) relacionados a características de importância econômica.

A análise genética de células somáticas é um método largamente empregado na construção de mapas sintênicos. O uso do painel de células somáticas (Somatic Cell, SC) possibilita determinar a localização de marcadores em cromossomos específicos. Mas a localização precisa dos marcadores em regiões cromossômicas, bem como sua ordenação só é possível com o emprego do painel de células somáticas híbridas irradiadas (Whole Genome-Radiation Hybrid Panel, WG-RH).

O painel WG-RH, empregado nesse estudo, é formado por fibroblastos de bovino que foram irradiados por 5000 rad e sofreram quebras. O centiray ( $cR_{5000rad}$ ) é a unidade de distância no mapa RH do presente estudo. O método RH é baseado na análise das quebras cromossômicas produzidas após exposição a raios-X. Assim, quanto maior a distância entre dois marcadores, maior será a probabilidade de que ocorra quebra entre eles. Ou seja, a distância entre marcadores é medida pela freqüência de quebras o que permite determinar sua ordem no cromossomo.

Este trabalho tem por objetivo a identificação e localização de marcadores moleculares no cromossomo Y bovino com o emprego de microssatélites e seqüências codificadoras, utilizando painéis SC e WG-RH.

### MATERIAL E MÉTODOS

Os painéis SC (Womack & Moll, 1986) e WG-RH (Womack *et al.*, 1997) foram construídos no Department of Veterinary Pathobiology, da Texas A&M University e gentilmente fornecidos pelo D. James Womack, colaborador neste projeto.

O DNA genômico empregado foi extraído a partir de fibroblastos (Blin & Stafford, 1976). Para a realização de PCR foram escolhidos 16 pares de primers com base em dados de literatura e também da pesquisa de seqüências homólogas entre as espécies humana e bovina. Quatro pares de "primers" foram desenhados a partir de seqüências do GenBank, com o emprego do "software" de análise de seqüência MAC VECTOR<sup>TM</sup>4.1.4 (International Biotechnologies, Inc., New Haven, Conn., USA) e Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000).

A amplificação é realizada numa reação com 10 µl, 10 mM Tris-HCl 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, pH 8,3, 100 mM de cada dNTP, 100 ng de DNA genômico e 0,5 unidades de *Taq* polimerase (Ampli Taq Gold, Perkin Elmer). A PCR compreende 40 ciclos, precedidos por 95°C durante 10 minutos. Cada ciclo é formado por 30 segundos a 95°C, 25 segundos para as temperaturas de anelamento (com temperaturas específica para cada "primer") e 30 segundos a 72°C. Os produtos da PCR foram submetidos a corrida eletroforética, feita em gel de agarose a 2%, contendo Brometo de Etídeo (Sambrook; Fritsh; Maniatis, 1989). Em seguida, o gel foi exposto à luz ultra-violeta e fotografado.

A análise de dados foi feita empregando-se o pacote estatístico RHMAP versão 3.0 (Boehne, 1992) e os programas RH2PT, RHMINBRK e RHMAXLIK (Lunetta *et al.*, 1996). O mapa WG-RH<sub>5000</sub> do cromossomo Y foi construído usando informações das análises feitas pelos programas RHMAXLIK (com probabilidade maior que 1000:1), RHMINBRK e do RHMAXLIK.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização das reações de PCR foi efetuada a análise estatística com o emprego do pacote estatístico RHMAP versão 3.0. Inicialmente, foi empregado o programa RH2PT para a descrição dos dados e para a análise de dois pontos. Então, os dados foram analisados pelos programas de análise multiponto RHMINBRK e RHMAXLIK (com probabilidade maior que 1000:1). O mapa WG-RH<sub>5000</sub> do cromossomo Y foi construído usando informações dessas análises.

Dos 16 pares de "primers" testados, 11 mostraram-se aptos para serem empregados no mapeamento genômico, são eles: BM861, BRY.1, HEL26, INRA30, INRA189, MAF45, TGLA325, XBM24, XBM31, XBM451 e ZFY. Mas destes, apenas nove foram mapeados no cromossomo Y bovino e são apresentados a seguir: HEL26, MAF45, INRA30, XBM451, TGLA325, BRY.1, ZFY, BM861 e INRA189. Kappes *et al.* (1997) localizaram XBM24 e XBM31 no cromossomo X, próximos à região pseudoautosômica. Por causa dessa proximidade, resolvemos mapeá-los usando o método RH. Esses marcadores não foram incluídos no grupo sintênico do cromossomo Y, corroborando os resultados obtidos por Kappes *et al.* (1997).

Analisando-se a ordenação dos marcadores no cromossomo Y, apresentada previamente por outros autores, foi observada uma discrepância envolvendo um grupo de marcadores. Kappes *et al.* (1997) e Sonstegard *et al.* (2001) ordenaram os marcadores assim: TGLA325, MAF45, INRA30 e XBM451. Já Liu *et al.* (2002) apresentaram a ordem: INRA30, XBM451, MAF45, TGLA325. Em nosso trabalho esses marcadores foram ordenados de um outro modo: MAF45, INRA30, XBM451 e TGLA325.

Embora 16 marcadores moleculares tenham sido testados, o grau de dificuldade para mapear as seqüências do cromossomo Y foi muito maior que o encontrado para a realização do mapeamento dos cromossomos bovinos 15 e 29 (Amarante *et al.*, 2000). Acredita-se que isso ocorreu, pois assim como na espécie humana, o cromossomo Y de bovinos estaria repleto de elementos repetitivos, incluindo seqüências palindrômicas (Willard, 2003). Desta maneira, o mapeamento das seqüências do cromossomo Y bovino com o emprego do método RH foi dificultado, uma vez que a mesma seqüência parecia estar presente em mais de uma região no cromossomo. Isto impossibilitou determinar sua localização precisa, o que é condição necessária para a montagem do mapa. No momento, estamos testando mais quatro seqüências adicionais que pretendemos incluir no mapa do cromossomo Y.

Com o intuito de corroborar os dados do mapeamento do cromossomo Y aqui apresentados e resolver a discrepância no tocante à ordenação dos marcadores MAF45, INRA30, XBM451 e TGLA325, pretendemos utilizar a técnica de mapeamento físico FISH (Fluorescent *in situ* hybridization), o que possibilitará a localização física dos mesmos no cromossomo Y.



### CONCLUSÕES

Dos 16 pares de “primers” testados, nove foram mapeados no cromossomo Y bovino, são eles: HEL26, MAF45, INRA30, XBM451, TGLA325, BRY.1, ZFY, BM861 e INRA189.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARANTE, M.R.V.; YANG, Y.; KATA, S.R. et al. RH maps of bovine chromosomes 15 and 29: conservation of human chromosomes 11 and 5. **Mammalian Genome**, New York, v.11, p.364-368, 2000.
- BLINN, N.; STAFFORD, D.W. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. **Nucleic Acids Research**, v.3, p.2303-8, 1976.
- BOEHNKE, M. Multipoint analysis for radiation hybrid mapping. **Annals of Medicine**, v.24, p.383-386, 1992.
- KAPPES, S. M.; KEELE, J. W.; STONE, R.T. et al. A second-generation linkage map of the bovine genome. **Genome Research**, v.7, p.235-249, 1997.
- LIU, W.S.; MARIANI, P.; BEATTIE, C.W. et al. A radiation hybrid map for the bovine Y chromosome. **Mammalian Genome**, v.13, p.320-326, 2002.
- LUNETTA, K. L.; BOEHNKE, M.; LANGE, K. et al. Selected locus and multiple panel models for radiation hybrid mapping. **American Journal of Human Genetics**, v.59, p.717-725, 1996.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: “Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology” (S. Krawetz, S. Misener Eds.) p.365-86, Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-86, 2000.
- SAMBROOK, J.; FRITSH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning. A laboratory manual**. 2nd ed., Cold Spring harbour Laboratory, NY, 1989.
- SONSTEGARD, T.S.; LOPEZ-CORRALES, N.L.; KAPPES, S.M. et al. An integrated genetic and physical map of the bovine X chromosome. **Mammalian Genome**, v.8, p.16-20, 1997.
- WILLARD, H.F. Tales of the Y chromosome. **Nature**, v.423, p.810-813, 2003.
- WOMACK, J.E.; MOLL, Y.D. A gene map of the cow: conservation of linkage with mouse and man. **Journal of Heredity**, v.77, p.2-7, 1986.
- WOMACK, J.E.; JOHNSON, J.S.; OWENS, E.K. et al. A whole-genome radiation hybrid panel for bovine gene mapping. **Mammalian Genome**, v.8, p.845-56, 1997.