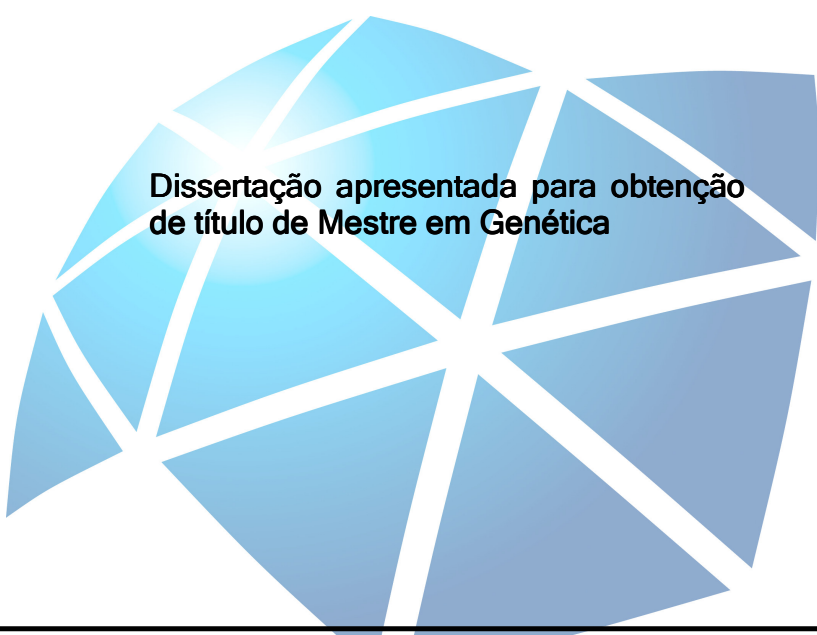


LARISSA PAOLA RODRIGUES VENANCIO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICROSSATÉLITES EM BÚFALO DE RIO
(*Bubalus bubalis*) A PARTIR DA CONSTRUÇÃO
DE BIBLIOTECAS GENÔMICAS PARCIAIS
COM HIBRIDIZAÇÃO SELETIVA**



Dissertação apresentada para obtenção
de título de Mestre em Genética

São José do Rio Preto - SP
2008

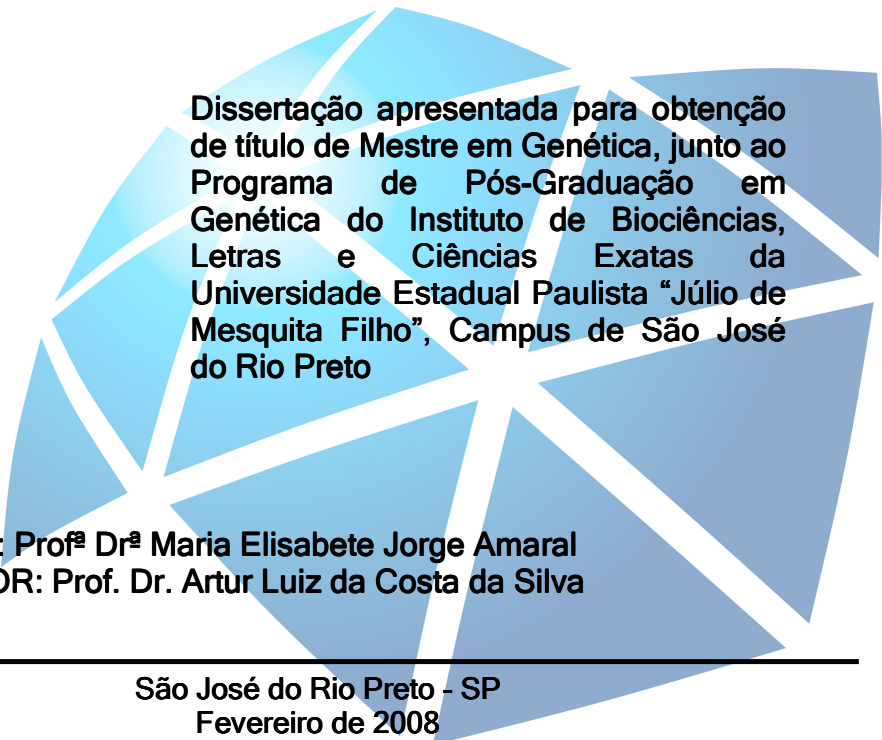
Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LARISSA PAOLA RODRIGUES VENANCIO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICROSSATÉLITES EM BÚFALO DE RIO
(*Bubalus bubalis*) A PARTIR DA CONSTRUÇÃO
DE BIBLIOTECAS GENÔMICAS PARCIAIS
COM HIBRIDIZAÇÃO SELETIVA**



Dissertação apresentada para obtenção
de título de Mestre 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

**ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Maria Elisabete Jorge Amaral
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Artur Luiz da Costa da Silva**

São José do Rio Preto - SP
Fevereiro de 2008

LARISSA PAOLA RODRIGUES VENANCIO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROSSATÉLITES EM BÚFALO DE RIO (*Bubalus bubalis*) A PARTIR DA CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS GENÔMICAS PARCIAIS COM HIBRIDIZAÇÃO SELETIVA

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM GENÉTICA

Presidente e Co-orientador: Prof. Dr. Artur Luiz da Costa da Silva

2º Examinador: Profª Drª Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima

3º Examinador: Drª Sandra Regina de Carvalho Marchesin

São José do Rio Preto, 29 de Fevereiro 2008.

Venancio, Larissa Paola Rodrigues.

Isolamento e caracterização de Microssatélites em Búfalo de Rio (*Bubalus bubalis*) a partir da construção de bibliotecas genômicas parciais com hibridização seletiva / Larissa Paola Rodrigues Venancio. - São José do Rio Preto : [s.n], 2008.

85 f. : il ; 30 cm.

Orientador: Maria Elisabete Jorge Amaral

Co-orientador : Artur Luiz da Costa da Silva

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

1. Genética animal. 2. Marcadores moleculares - Microssatélites. 3. Microssatélites – Isolamento e caracterização. 4. Búfalo de Rio – Genética molecular. I. Amaral, Maria Elisabete Jorge. II. Silva, Artur Luiz da Costa da. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 575.17

*“Aos meus pais
Orlando e Teresa
e irmãs
Bruna e Beatris”*

- Meu refúgio -

AGRADECIMENTOS

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei nos ombros de gigantes”
Isaac Newton

Ao término desses dois anos de trabalho, é impossível não relembrar dos momentos bons e também dos momentos difíceis. Vida em laboratório não é fácil! É impossível não pensar naquelas pessoas que ajudaram, deram uma palavra de apoio e incentivo, torceram e comemoraram cada conquista. A todos, meu mais profundo carinho e agradecimento. Mas, existem aqueles que não poderia deixar de mencionar. Em especial agradeço:

Aos meus amados pais Orlando e Teresa e minhas queridas “maninhas” Bruna e Beatris, pela força, pelo amor e apoio incondicional (mesmo sabendo que por causa do meu trabalho eu teria que ficar longe dois anos consecutivos durante o Natal...). Vocês são o meu conforto, o meu refúgio, a minha fortaleza, o meu exemplo de amor. Ensinarão-me e continuam me ensinando a viver. Amo muito vocês! Agradeço a Deus todos os dias por suas vidas e por poder pertencer a essa família. Todo meu esforço foi por vocês.

À minha orientadora Elisabete Amaral, pelo entusiasmo e dedicação à Ciência e pelo amor contagiante à pesquisa. Obrigada pela confiança em mim e no meu trabalho, no apoio em todas as horas e até nos “puxões de orelha” que foram imprescindíveis para a minha formação. Obrigada por me mostrar e me ensinar a trilhar o caminho árduo, porém fascinante que é a Ciência. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, por ter me acolhido durante os quatro anos de graduação e os dois anos de Mestrado.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio financeiro concedido durante o primeiro ano de Mestrado e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) também pelo auxílio financeiro concedido durante o segundo ano do Mestrado.

Aos meus companheiros de laboratório Melissa, Nedenia, Larissa, Vanderlei, Edson e especialmente à minha querida amiga e confidente Patricia (Paty, você mora no meu coração para sempre!). Obrigada pela amizade e principalmente por me aturarem no laboratório!

Aos amigos do Laboratório de Citogenética Humana e Biologia Molecular da Unesp de São José do Rio Preto pelo companheirismo e por fazerem do convívio no laboratório algo muito prazeroso. Um abraço a todos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Artur Silva e Prof^a Dr^a Maria Paula Schneider, por terem me recebido de forma tão carinhosa em seu laboratório na Universidade Federal do Pará (Campus de Belém), me dando ampla autonomia e condições de trabalho. Obrigada pela oportunidade e pela possibilidade de aprender um pouco com vocês.

À toda equipe do Laboratório de Polimorfismo de DNA (LPDNA – UFPA) por me receberem de braços abertos. Agradeço especialmente “às meninas”: Silvanira (Nira), Soraya (Lady), Samara e Agatha, não somente pelo apoio técnico (como aprendi com vocês!), mas pela amizade, pelos bate-papos, risadas, compras no shopping e passeios culturais e gastronômicos. Vocês moram no meu coração!

À família Oliveira Alves (Seu Sérgio, Dona Graça, Marlus, Sérgio e Diana), minha família paraense, por terem recebido uma desconhecida em sua casa com tanto carinho a ponto de hoje ser tratada como filha e irmã. Em especial ao “Serginho”, um grandalhão com um coração que não cabe no corpo... Se você não tivesse me “socorrido”, dificilmente esse trabalho teria sido realizado. Obrigada pelo amor, carinho e por cuidar de mim como se eu fosse um “Tesouro”.

Aos meus queridos amigos de faculdade Aline, Cadu, Daniele, Fernanda, Gabriela, Karla, Paula, Thiago, Viviani e Zé! Como faz falta as horas de conversa na cantina! Mesmo estando longe (até em outro continente, não é Cadu?), vocês se fazem presentes na minha vida. Vocês são muito importantes para mim! Amo vocês!

À minha querida amiga-irmã Roberta F. Donini por fazer parte da minha vida “há séculos” e me apoiar em todos os momentos. Amiga, obrigada por sua amizade e pelo companheirismo.

À Deus. Durante toda a minha vida eu vi tua mão me dirigindo, me auxiliando, abençoando, ouvindo meus pedidos e confortando meu coração nos momentos mais difíceis. Só tenho o que agradecer. “O Senhor é a minha força e o meu escudo; nele confiou o meu coração, e fui socorrido: pelo que meu coração salta de prazer e com o meu canto o louvarei (Salmo 28:7)”.

“Em relação a todos os atos de iniciativa e de criação, existe uma verdade elementar: no momento em que nos comprometemos, a Providência Divina também se põe em movimento. Todo um fluir de acontecimentos surge a nosso favor. Como resultado da decisão, seguem todas as formas imprevistas de coincidências, encontros e ajudas que nenhum homem jamais poderia ter sonhado encontrar. Qualquer coisa que você possa fazer ou sonhar, você pode começar. A coragem contém em si mesma o poder, o gênio e as magias”.

*Johann Wolfgang von Goethe
Escritor Alemão (1749-1832)*

“In research, you really have to love and be committed to your work, because things have more of chance of going wrong than right. But when things go right, there is nothing more exciting”

Michael Smith
Prêmio Nobel de Química em 1993

Resumo



Iconografia Suméria. Homens e búfalos - Brasão de Sharkalisharii, Sudeste da Mesopotâmia (1.500 anos antes de Cristo).

VENANCIO, L.P.R. Isolamento e caracterização de microssatélites em búfalo de rio (*Bubalus bubalis*) a partir da construção de bibliotecas genômicas parciais com hibridização seletiva. São José do Rio Preto, 2008, 85p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Genética – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

O Brasil é o país com o maior rebanho de búfalo de rio, *Bubalus bubalis*, no continente americano e também o maior produtor deste animal fora do continente asiático. A produção de leite e derivados vem aumentando devido à potencialidade dessa espécie em produzir leite com baixos custos e elevado rendimento industrial. Apesar das características economicamente importantes inerentes ao búfalo, as pesquisas científicas são limitadas em muitos países onde o búfalo é economicamente importante e como consequência a pesquisa genômica encontra-se defasada quando comparado com outras espécies de interesse econômico. Marcadores moleculares são essenciais para avaliar informações qualitativas e quantitativas da diversidade molecular com o objetivo de aperfeiçoar a utilização e conservação da variabilidade genética e o relacionamento entre vários rebanhos. Microssatélites diferem dos outros tipos de seqüências de DNA por seu extenso polimorfismo dentro e entre populações, sendo considerados excelentes tipos de marcadores moleculares. O presente estudo teve como objetivos construir bibliotecas genômicas parciais enriquecidas com microssatélites, isolar e caracterizar os microssatélites obtidos, além de determinar as condições de amplificação por PCR para alguns dos locos isolados da biblioteca. Foram desenvolvidas 6 bibliotecas genômicas parciais – (CA)₁₅, (CT)₁₅, (AGG)₈, (GATA)₈, (GAAA)₈, (AAAAC)₈. O processo de clonagem gerou um total de 1.824 clones recombinantes, sendo que 954 foram seqüenciados para identificação de microssatélites. Cento e treze microssatélites foram encontrados. Desses, foram identificados 96 com unidade de repetição dinucleotídica (84,95%), 10 repetições trinucleotídicas (8,85%), 6 repetições tetranucleotídicas (5,3%) e 1 repetição pentanucleotídica (0,89%). As seqüências de microssatélites obtidas foram categorizadas estruturalmente em repetições puras (90 seqüências-79,64%), repetições puras interrompidas (21 seqüências-18,59%) e repetições compostas interrompidas (2 seqüências-1,77%). Com relação ao tamanho dos microssatélites, 85,84% foram caracterizados com o arranjo curto, ou seja, apresentando cerca de 10 repetições. Destes, 10 foram selecionados para desenho dos pares de *primers* para PCR e quatro tiveram as condições das reações de PCR otimizadas para utilização em estudos populacionais e de mapeamento genético.

Palavras-chave: Bibliotecas genômicas parciais. Isolamento de microssatélites. Búfalo de rio.

Abstract



VENANCIO, L.P.R. Isolation and characterization of microsatellites in river buffalo (*Bubalus bubalis*) by construction of partial genomic libraries with selective hybridization. São José do Rio Preto, 2008, 85p. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Brazil is the largest river buffalo (*Bubalus bubalis*) breeding center outside the Asian continent, the origin of the domestic buffalo. All buffalo breeds have a strong milk/meat attributes. Their extensive use in agriculture world wide, and especially in developing countries, begs for genetic resources to evaluate and improve traits important to local and regional economies. Among the different types of DNA markers, microsatellites are useful for studying genetic variability within and between populations due its high heterozygosity. The goal of this study was to construct partial genomic libraries enriched with repeated sequences to isolate and characterize microsatellites for river buffalo. The cloning process generated a total of 1824 recombinant clones, from which 954 were sequenced for the microsatellites search. One hundred and thirteen new microsatellites were isolated, containing the following type of repeats: dinucleotide repeats (96 sequences - 84.95%), trinucleotide repeats (10 sequences - 8.85%), tetranucleotide repeats (6 sequences – 5.3%) and pentanucleotide repeats (1 sequence - 0.89%). The new microsatellites were structurally categorized into 3 categories: pure repeats (90 sequences - 79.64%), pure interrupted (21 sequences - 18.59%) and compound interrupted repeats (2 sequence – 1.77%). PCR primer pairs were designed for ten microsatellites, from which four had the PCR conditions optimized. The microsatellites isolated in this study will be used to evaluate the genetic variability of Brazilian populations of river buffalo and to the gene mapping program established for this specie.

Key-words: Partial genomic libraries. Microsatellite isolation. River buffalo.

SUMÁRIO

1 Introdução	10
1.1 <i>Bubalus bubalis</i> : histórico e importância	10
1.2 Importância da caracterização genética em <i>Bubalus bubalis</i>	13
1.3 Marcadores moleculares do tipo microsatélite	14
1.3.1 <i>Origem e evolução de microsatélites</i>	15
1.3.2 <i>Distribuição dos microsatélites no genoma</i>	22
1.4 Desenvolvimento de bibliotecas genômicas parciais para isolamento de microsatélites	24
2 Objetivos	28
3 Material e Métodos	29
3.1 Construção das bibliotecas genômicas parciais	29
3.1.1 <i>Digestão do DNA genômico</i>	29
3.1.2 <i>Ligação dos fragmentos digeridos à adaptadores</i>	30
3.1.3 <i>Reação de PCR para enriquecimento dos fragmentos de DNA</i>	31
3.1.4 <i>Preparação das esferas magnéticas e formação do complexo "Biotina/Estreptoavidina"</i>	32
3.1.5 <i>Captura das seqüências de microsatélite</i>	35
3.1.6 <i>Amplificação dos fragmentos de DNA hibridizados para o processo de clonagem</i>	37
3.2 Clonagem e seqüenciamento dos microsatélites	37
3.3 Desenho dos pares de <i>primers</i> e otimização das condições de PCR para amplificação dos microsatélites selecionados	39
4 Resultados e Discussão	41
4.1 Construção das bibliotecas genômicas parciais enriquecidas com microsatélites	41
4.2 Caracterização estrutural dos 113 microsatélites identificados	46
4.2.1 <i>Desenho dos pares de primers para PCR de 10 microsatélites selecionados</i>	55
4.2.2 <i>Otimização das condições de PCR (concentrações de MgCl₂ e temperatura de anelamento)</i>	65
5 Conclusões	67
6 Referências Bibliográficas	68
7 Apêndice	78

Introdução



1.1 *Bubalus bubalis*: histórico e importância

Os mamíferos da família Bovidae representam uma grande variedade de ungulados distribuídos globalmente. Esta família tem guarnecido a humanidade com muitos animais de importância econômica. Em particular, a tribo Bovini tem realizado um papel extremamente importante durante a história da humanidade exercendo muitas funções na agricultura, economia, cultura e religião. Dentro da tribo Bovini destacam-se as espécies *Bos taurus* (gado doméstico) e *Bubalus bubalis* (búfalo de rio e de pântano) (RITZ et al., 2000).

A espécie *Bubalus bubalis* apresenta duas grandes linhagens diferenciadas com base no cariótipo, comportamento e morfologia dos animais: Búfalo de Pântano (*swamp type* – *Bubalus bubalis carabanesis*) com $2n=48$ e o Búfalo de Rio (*river type* – *Bubalus bubalis bubalis*) com $2n=50$ (IANNUZZI et al., 1994; SENA et al., 2003; KUMAR et al., 2006). Análise de variação em DNA mitocondrial também fornece forte evidência para duas origens independentes do búfalo de rio e de pântano, reforçando a classificação em duas subespécies (KUMAR et al., 2007). Acredita-se que a espécie tenha sido domesticada na Índia (COCKRILL, 1981), visto que o subcontinente Indiano apresenta-se como um *hotspot* de diversidade bubalina (GEORGE et al., 1988). Desde então, a espécie tem sido introduzida com sucesso em todos os outros continentes, sendo atualmente considerada de importância agrícola mundial. Segundo dados da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), a população mundial de búfalos é cerca de 172 milhões de animais distribuídos por 40 países em cinco continentes (ZHANG et al., 2007) e vem crescendo cerca de 1,3% anualmente (FAO, 2000).

A história do búfalo no Brasil teve origem aproximadamente em 1895 na Ilha do Marajó, Estado do Pará (SILVA et al., 2003), quando foram introduzidos 50 animais da raça Mediterrâneo vindos da Itália, além de um pequeno lote da Guiana Francesa. Em 1962, foi realizada oficialmente a última importação de búfalos da Índia para os Estados de São Paulo e Paraná, com a introdução de um lote de 20 animais das raças Murrah e Jafarabadi. Em 1989, foi feita oficialmente a última importação de animais da raça Mediterrâneo, da Itália para os estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Bahia (MARQUES et al., 2003; ALBUQUERQUE et al., 2006). No Brasil, o búfalo encontrou condições ideais de sobrevivência, tornando-o o país com o maior rebanho do continente americano e o maior produtor deste animal fora do continente asiático (SENA et al., 2003; SENO et al., 2006). Conforme divulgado pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – “Pesquisa Pecuária Municipal”, PPM-IBGE), o efetivo de rebanhos bubalinos no Brasil em 2006 era de mais de 1,1 milhões de cabeças. Entretanto, Silva e colaboradores (2003) afirmam que a taxa anual de crescimento da população de búfalos no Brasil está em torno de 10%, cerca de quatro vezes mais que a taxa de crescimento de bovinos no país. Sessenta e quatro por cento do rebanho nacional encontra-se na região Norte e 13% na região Sul-Sudeste, a qual possui a segunda maior população de búfalos do Brasil. A região Sudeste, onde a produção leiteira é mais relevante, apresenta cerca de 9% de cabeças (ANUALPEC, 2005; SENO et al., 2006).

A produção de carne foi durante muito tempo a principal atividade da bubalinocultura na Amazônia. Entretanto, atualmente, a exploração leiteira começou a ocupar espaço semelhante à região Sudeste, devido a potencialidade dessa espécie em produzir leite com baixos custos e elevado rendimento industrial, bem como o aumento da demanda da população por seus derivados como o queijo do

tipo Mozzarella (CPATU-EMBRAPA, 2005). O búfalo, portanto, tem se estabelecido como uma importante fonte alternativa de produção de carne e leite, suprindo as demandas de países considerados em desenvolvimento como o Brasil (SILVA et al., 2003).

O búfalo é um animal de extrema versatilidade e adaptabilidade podendo produzir carne, leite e trabalho em várias condições geográficas e climáticas (SILVA et al., 2003). É um animal extremamente dócil, com vida útil de até 15 anos (cinco anos a mais que o gado doméstico), alta taxa de produtividade em leite e carne, taxa de natalidade superior a 80% e de mortalidade de 3% ao ano. Além disso, devido ao hábito de viver em ambiente alagadiço, são menos suscetíveis a ectoparasitoses (MOREIRA et al., 1994; FAO, 2000).

Apesar das características economicamente importantes inerentes ao búfalo, estudos com enfoque na estrutura genômica desta espécie encontram-se defasados quando comparado a outras espécies de interesse econômico, como o boi, porco e cavalo. Não somente no Brasil, mas no mundo todo, a pesquisa científica é limitada especialmente em muitos países onde o búfalo é um animal economicamente importante (KIERSTEIN et al., 2004; WOMACK, 2005). Até 2003, só existiam como fonte de estudos genômicos em búfalo mapas genômicos rudimentares desenvolvidos a partir das tecnologias de células somáticas (EL NAHAS et al., 1999) e citogenética (IANNUZZI et al., 2003). Amaral e colaboradores (2007) construíram o primeiro painel de células somáticas híbridas irradiadas para búfalo de rio, iniciando a construção de mapas genômicos de alta resolução, marcando assim o início do mapeamento em larga escala do genoma desta espécie.

1.2 Importância da caracterização genética em *Bubalus bubalis*

A adaptação em diferentes condições ambientais e seleção fenotípica pelo homem têm criado uma grande diversidade de raças bubalinas, como por exemplo, as três raças de búfalo de rio existentes no Brasil (Murrah, Jafarabadi e Mediterrâneo) e as raças existentes na Índia e Ásia (Nili-Ravi, Mehsana, Nagpuri e outras). Como a diversidade genética é rapidamente afetada pelas condições ambientais e seleção fenotípica, surge então a necessidade de manter a diversidade, bem como estabelecer programas de conservação da variabilidade (OLLIVIER et al., 2001). Através da obtenção de dados sobre a variação genética e a aplicação de modelos de genética de populações, é possível fazer associações entre os padrões ou níveis de variação genética e outros fatores e assim fazer inferências sobre a biologia dos organismos (SUNNUCKS, 2001; HEDRICK, 2005).

Para avaliar informações qualitativas e quantitativas da diversidade molecular, marcadores moleculares são essenciais para um monitoramento da variabilidade entre as espécies, cujos resultados podem ser empregados em diferentes áreas básicas e aplicadas como biologia evolutiva, taxonomia, melhoramento genético e programas de conservação de espécies (KARP & EDWARDS, 1997). No que se refere a estudos de diversidade molecular em criações de animais domésticos de interesse econômico como o búfalo, é preciso criar estratégias racionais para otimizar o melhoramento genético e a conservação da variabilidade genética nesses animais. Para tanto, é essencial o entendimento da sua arquitetura genética e a relação entre os rebanhos (KIERSTEIN et al., 2004; KUMAR et al., 2006).

No documento *Secondary Guidelines for Development of National Farm Animal Genetic Resources Management* (1998), a FAO propõe um programa integrado de manejo global de fontes genéticas de rebanhos usando marcadores moleculares do tipo microssatélite. Estudos de relação genética entre os rebanhos usando microssatélites geram informações importantes para compreender a evolução dos mesmos e magnitude da diferenciação genética (MATEUS et al., 2004).

O uso de marcadores altamente polimórficos como microssatélites é de extrema importância para investigar o *status* genético, ou seja, o conhecimento das diferenças e/ou demonstrações de exclusividade genética de um táxon, para efetivar o manejo adequado de populações naturais ou artificiais desse táxon (BARKER et al., 1997; BARATTI et al., 2001). Mais particularmente, eles são importantes para acessar diversidade intra-racial, níveis de inter cruzamento, diferenciação entre raças, introgressão e mistura de raças (FREEMAN et al., 2005).

Além disso, a disponibilidade de marcadores genéticos informativos como os microssatélites são essenciais para construção de mapas genéticos de alta densidade, assim como em estudos de diversidade genética e conservação de espécies para fins de seleção de características de interesse econômico e manutenção máxima da diversidade genética de rebanhos domesticados e naturais.

1.3 Marcadores moleculares do tipo microssatélite

Seqüências de DNA do tipo “microssatélite”, “curtas repetições em tandem” (*short tandem repeats – STRs*) ou “seqüências de repetições simples” (*simple*

sequence repeats – SSRs) são termos utilizados para descrever repetições em tandem de mono-, di-, tri-, tetra-, penta- e hexanucleotídeo, amplamente distribuídas no genoma eucarioto e procarioto (KANDPAL et al., 1994; TÓTH et al., 2000; ZANE et al., 2002; ELLEGREN, 2004).

Os microssatélites diferem de muitos outros tipos de seqüências de DNA por seu extenso polimorfismo, o que os torna extensivamente utilizados como marcadores moleculares. Microssatélites estão entre os mais versáteis marcadores moleculares, sendo usados em um expressivo número de aplicações biológicas, como por exemplo, mapeamento genético, estudos de população, caracterização genômica e dissecação genética de traços complexos. São ferramentas moleculares para o entendimento do relacionamento entre segmentos cromossômicos, provendo informações entre espécies e gêneros (DIB et al., 1996; KASHI et al., 1997; SUBRAMANIAN et al., 2003a, BUSCHIAZZO & GEMMELL, 2006). A versatilidade de aplicações desse tipo de marcador é devida a sua natureza altamente polimórfica, modo codominante de herança, fácil identificação, abundante distribuição no genoma e fácil utilização em experimentos envolvendo reações em cadeia da polimerase - PCR (BARKER et al., 1997; NAVANI et al., 2001; KIM et al., 2004).

1.3.1 Origem e evolução dos microssatélites

Como outras classes de DNA repetitivo, os microssatélites apresentam alta taxa de mutação (10^{-2} a 10^{-6}) (SCHLÖTTERER, 2000). A hipervariabilidade no tamanho das repetições ocorre geralmente pelo “deslizamento” (*slippage*) durante o processo de replicação, ou seja, desemparelhamento das fitas de DNA (*strand mispairing*) que estão sofrendo replicação, seguida de reassociação desalinhada (*misaligned reassociation*) (LEVINSON & GUTMAN, 1987; ELLEGREN, 2004). Assim, quando a nova fita realinha fora de ordem, a continuação da replicação produz uma fita de tamanho diferente da fita molde, com a inserção ou a deleção de unidades de repetição relativas à fita molde. Muitas destas alterações são corrigidas pelo sistema de reparo (*mismatch-repair system*) e somente uma pequena fração que não foi reparada termina como um evento de mutação de microssatélite (LI et al., 2002; ELLEGREN, 2004). A figura 1 mostra em forma de esquema, o evento de deslizamento durante a replicação da molécula de DNA.

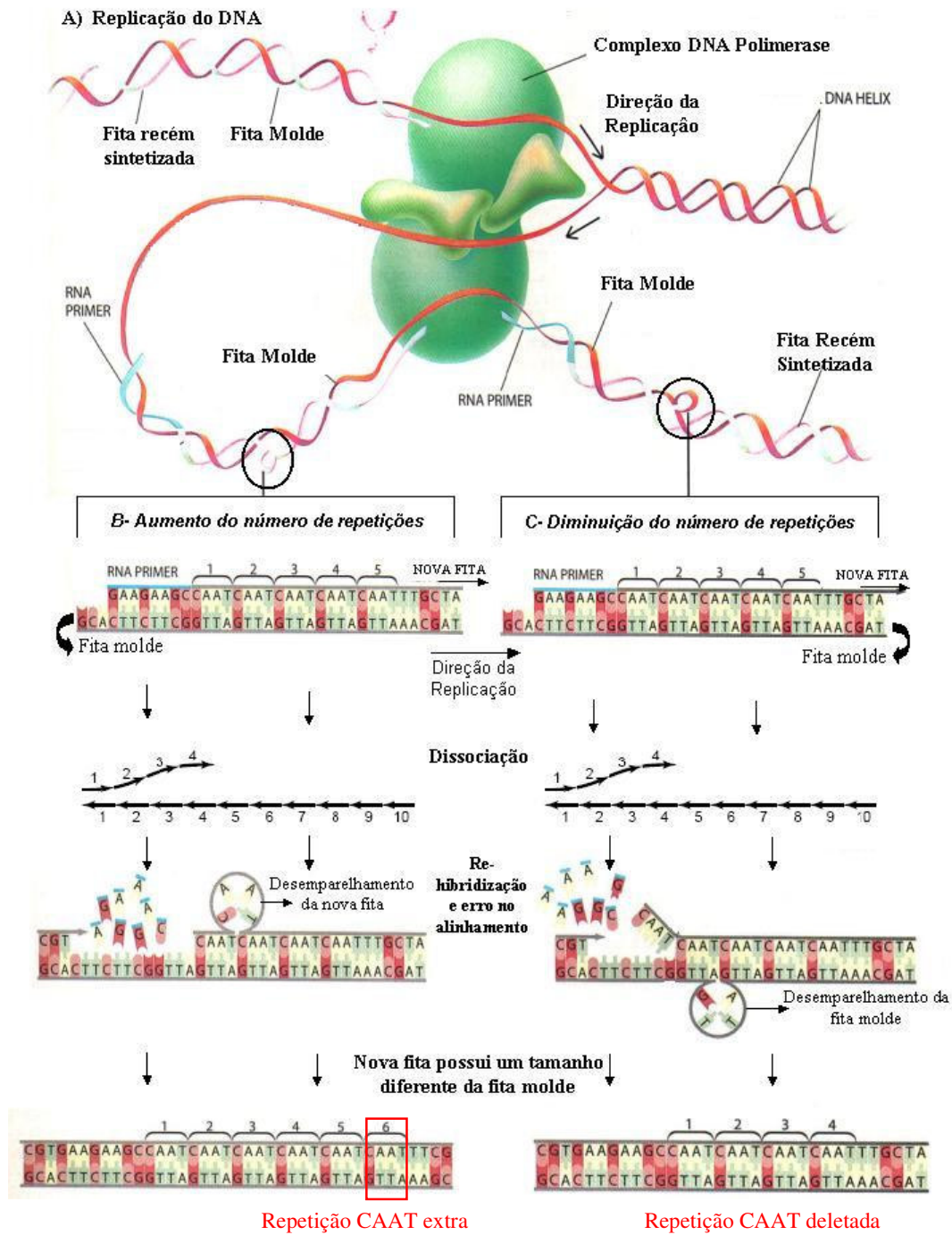


Figura1. Representação do processo de deslizamento durante a replicação da molécula de DNA. **A. Replicação do DNA:** O complexo DNA polimerase abre a dupla-hélice do DNA parental e copia ambas as fitas. **B. Aumento do número de repetições de microssatélite:** desemparelhamento da fita de DNA que está sendo sintetizada (com relação a fita molde) resultando na formação de um *loop*. A DNA polimerase então adiciona uma repetição extra na nova fita que resulta no aumento do tamanho da repetição. **C. Diminuição do número de repetições:** desemparelhamento da fita molde com relação à fita que está sendo sintetizada. As unidades de repetições estão representadas por bases nitrogenadas e por setas. Os números referem-se as unidades de repetição de cada fita (Adaptado de MOXON & WILLIS, 1999 e ELLEGREN, 2000).

O evento de desemparelhamento das fitas explica como ocorre o aumento ou a diminuição do tamanho de um microsatélite, mas não evidencia claramente a origem de repetições em locais do genoma sem nenhum microsatélite. Rose e Falush (1998) inferiram que é necessário um número mínimo de repetições já existentes no genoma para desenvolvimento de um microsatélite, ou seja, a existência de um “proto-microsatélite” resultante de mutações de ponto, como substituições ou inserções, para que a partir do desemparelhamento das fitas durante o processo de replicação essa pequena repetição torne-se um microsatélite verdadeiro (LEVINSON & GUTMAN, 1987; ROSE & FALUSH, 1998; ZHU et al., 2000). A figura 2 ilustra um possível evento de mutação aleatória que origina um “proto-microsatélite”.

a) Seqüência Original Hipotética:

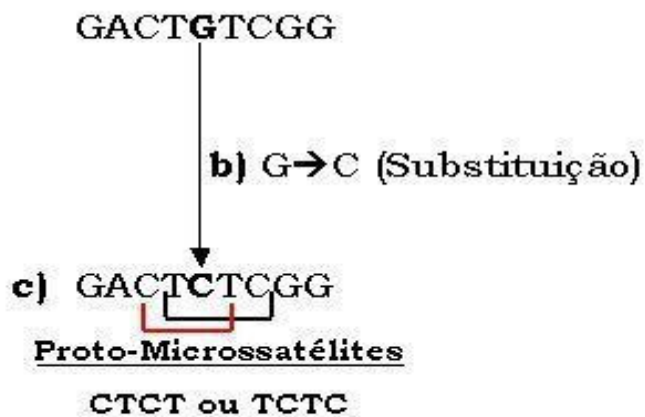


Figura 2. Representação esquemática que exemplifica um possível evento capaz de gerar um “proto-microsatélite”. **a) Seqüência hipotética:** Essa seqüência apresenta uma base em destaque – G: guanina. Por um evento de mutação de ponto, por exemplo, uma substituição de base **(b)** a guanina é substituída por uma citosina (C). **c) Seqüência resultante após a substituição G→C:** após o evento de substituição a seqüência passa a apresentar duas repetições CT em tandem, caracterizando a origem de um proto-microsatélite passível de sofrer expansão por *slippage strand mispairing*. (Modificado de ZHU et al., 2000).

Sabe-se que as taxas de mutação de microssatélites diferem entre os locos (HARR et al., 1998). Para uma variedade de organismos estudados a variabilidade de microssatélites é positivamente correlacionada com o número de repetições (JIN et al., 1996; SCHLÖTTERER et al., 1998), ou seja, locos maiores sofrem mais mutações do que os menores, tornando-os assim mais variáveis. Essa constatação implica que há uma correlação diretamente proporcional com a taxa de polimorfismo dos locos (locos de maior tamanho são mais polimórficos do que os menores) (ELLEGREN, 2000).

Verifica-se também que microssatélites extremamente longos (>50 unidades de repetição) são raramente observados (GOLDSTEIN et al., 1997). Incorporando mutação de ponto nos modelos de evolução de microssatélites pode-se explicar porque o crescimento infinito não ocorre (TAYLOR et al., 1999).

Kruglyak e colaboradores (2000) mostraram que o equilíbrio na distribuição do tamanho de repetições em microssatélites pode ser explicado por um balanço entre eventos de deslizamento e mutações de ponto. De acordo com essa visão, a evolução de microssatélites é um processo onde o deslizamento na replicação dirige alguns alelos para o crescimento em tamanho, até o surgimento de uma mutação pontual no meio da repetição, interrompendo o microssatélite em duas repetições mais curtas. Esse acontecimento pode ser o primeiro passo para a descaracterização de um microssatélite num dado genoma, seguido por mutações pontuais adicionais nessa região, convertendo o antigo local de repetição em uma mistura de seqüências únicas e repetições muito curtas. Esse modelo pode explicar a diferente distribuição no tamanho dos microssatélites entre vários organismos e diferentes tipos de repetições. A figura 3 ilustra um possível evento de descaracterização de microssatélites.

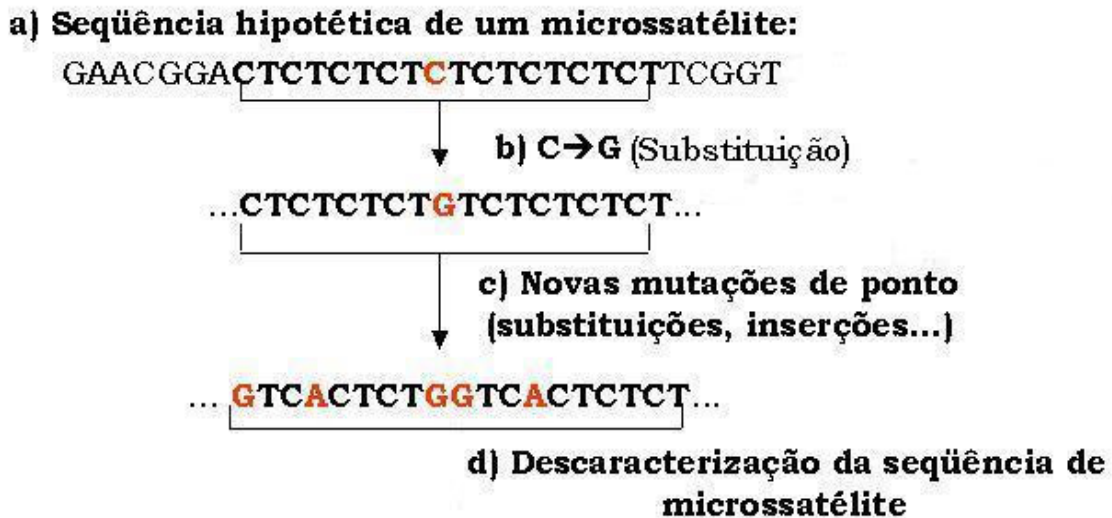


Figura 3. Representação esquemática de um possível evento de descaracterização de um microssatélites. **a) Seqüência hipotética de um microssatélite:** apresenta-se aqui uma seqüência de repetição em tandem (CT)₉, caracterizando um exemplo de microssatélite. No entanto, por uma mutação pontual (por exemplo, uma substituição), **b)** uma das citosinas da seqüência repetitiva é trocada por uma guanina (seqüência interrompida por uma guanina). Após a ocorrência de novas mutações pontuais (novas substituições ou inserções), **c)** a antiga região de microssatélite é descaracterizada.

Amos (1999) foi o primeiro a propor um padrão de ciclo de vida para evolução de microssatélites; Taylor e colaboradores (1999) observaram a degeneração ou “morte” de um microssatélite e Chamber e McAvoy (2000) completaram o ciclo de vida sugerindo que um loco de microssatélite degenerado pode potencialmente “ressucitar” se existir a possibilidade de surgimento de um novo proto-microssatélite e possibilidade de nova expansão, iniciando assim um novo ciclo. A figura 4 exemplifica o ciclo de vida sugerido para uma seqüência do tipo microssatélite.

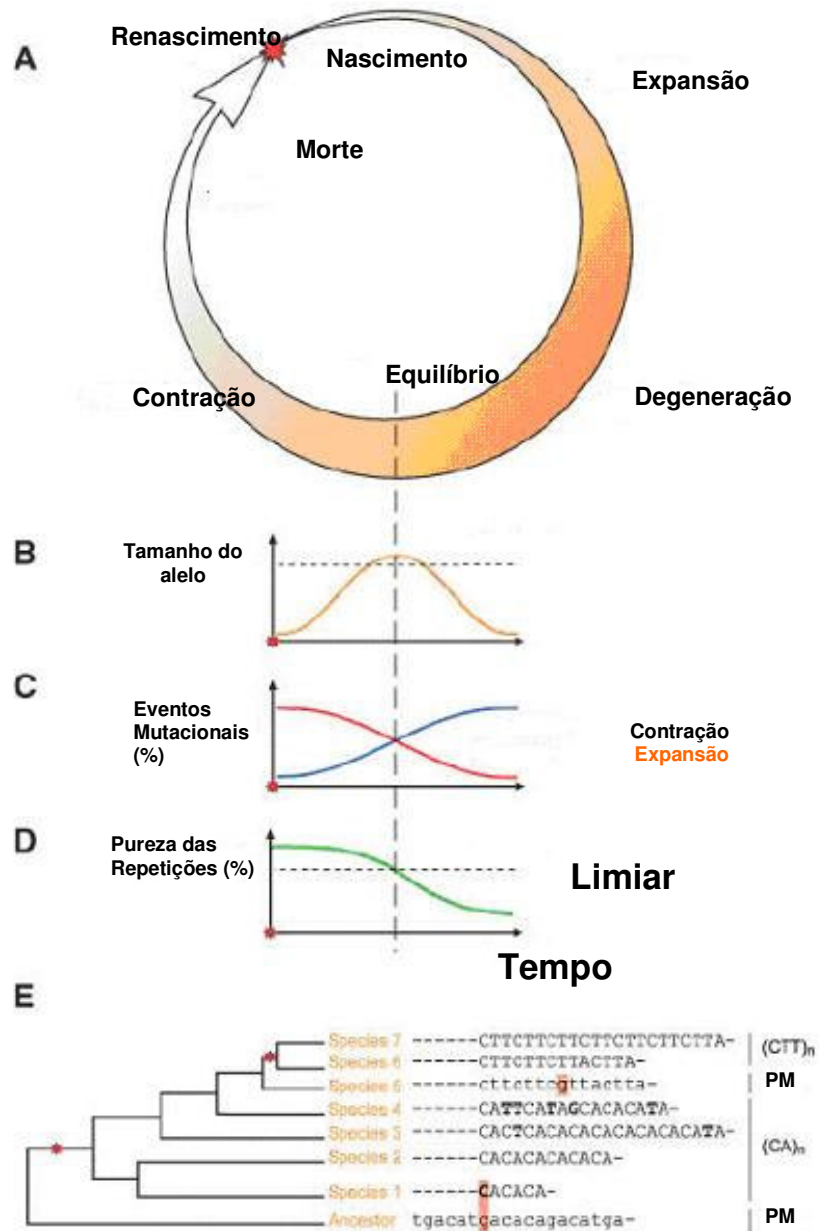


Figura 4. Hipótese do ciclo de vida de um microsatélite. **A)** Esquema do ciclo de vida (B-D) e suas variações ao longo do tempo. **B)** média de tamanho dos alelos; **C)** ocorrência de eventos de expansão e contração das unidades de repetição e **D)** Pureza das repetições, ou seja, proporção de repetições perfeitas na seqüência do microsatélite. **E)** Filogenia hipotética que permite observar diretamente o ciclo de vida de um loco (PM: proto-microsatélite). Depois da iniciação, um proto-microsatélite se expande e, com o aumento do tamanho, interrupções por mutações de ponto podem ocorrer e afetar a taxa de mutação para expansão. O tamanho do microsatélite aumenta até as mutações de expansão e contração entrarem em equilíbrio. O acúmulo de mutações pode diminuir a taxa de *slippage*. Esses eventos podem levar o microsatélite a “morte”, porém, um outro loco pode surgir da seqüência única remanescente. A escala de tempo, o limite do tamanho do alelo, a dinâmica de eventos de mutação que influenciam a expansão e contração e o limiar de “pureza” são quantitativamente desconhecidos e provavelmente variável entre os locos (Adaptado de BUSCHIAZZO & GEMMELL, 2006).

No entanto, esse padrão de ciclos de vida para evolução de microssatélites jamais poderá ser observado em estudos com populações comerciais, não comprometendo assim a utilização desse marcador com estudos de associação com características econômicas importantes.

1.3.2 Distribuição dos microssatélites no genoma

Repetições do tipo microssatélite são encontradas de maneira abundante – 50.000 a 100.000 cópias por genoma haplóide – e com espaçamento regular de aproximadamente 10Kb ao longo do genoma de mamífero e estão presentes em regiões codificantes e não-codificantes (SUN & KIRKPATRICH, 1996; TAUTZ, 1998; ZOU et al., 2005). Estima-se que cerca de 3% do genoma humano seja ocupado por microssatélites (SUBRAMANIAN et al., 2003b).

A abundância de certos tipos de repetições varia com a região genômica e sua distribuição também é característica do grupo taxonômico examinado. Microssatélites apresentam-se mais abundantes em regiões não-codificantes do que em regiões codificantes. No entanto, não há diferença em densidade entre regiões intergênicas e introns. Ocorrem diferenças também na densidade e/ou distribuição de microssatélites entre os cromossomos sexuais e autossomos em várias espécies (TÓTH et al., 2000; ELLEGREN, 2004), sendo mais abundantes em autossomos.

Em geral, repetições de mononucleotídeos poli (A/T) são os mais abundantes em todos os táxons, principalmente em primatas. Em repetições de dinucleotídeos,

as diferenças características entre os táxons podem somente ser observadas em regiões intergênicas e introns por causa da raridade desse tipo de repetição em exons. Em todos os vertebrados e artrópodes a repetição do tipo $(CA)_n$, onde n refere-se ao número de repetições, são os mais freqüentes (TÓTH et al., 2000).

Unidades de repetição trinucleotídicas são o tipo mais comum em qualquer região genômica. Entretanto, a freqüência de distribuição deste tipo de repetição apresenta diferenças em várias regiões genômicas e entre táxons; por exemplo, em vertebrados, repetições de trinucleotídeos ricas em (G+C) são abundantes em exons e menos pronunciadas em outras regiões do genoma.

No que diz respeito a repetições de tetranucleotídeo, a ocorrência desse tipo de repetição em exons é muito rara. No entanto, em vertebrados, a abundância destas repetições em regiões intergênicas e introns excede a de trinucleotídeos. No que diz respeito a repetições pentanucleotídicas, esses tipos de repetição são tão abundantes em táxons de mamíferos quanto as repetições de trinucleotídeos em introns e regiões intergênicas.

Repetições de hexanucleotídeos constituem o segundo tipo mais comum depois de repetições de trinucleotídeos em exons. Em introns e regiões intergênicas de táxons de invertebrados, repetições de hexanucleotídeos são mais abundantes do que os tetranucleotídeos (TÓTH et al., 2000).

A densidade de microssatélites tende a ser positivamente correlacionada com o tamanho do genoma. Entre todos os genomas eucariotos seqüenciados, a densidade de microssatélites é maior em mamíferos. Entretanto, em plantas, a freqüência de microssatélites é negativamente correlacionada com o tamanho do genoma (ELLEGRÉN, 2004). Buscas em bancos de dados indicam que microssatélites são cinco vezes menos abundantes no genoma de plantas do que no

de mamíferos. Uma outra característica peculiar do genoma de plantas é a presença de repetições $(AT)_n$, como a mais comum entre os dinucleotídeos (LAGERCRANTZ et al., 1993).

Essa distribuição contrastante de microssatélites em genomas de grupos taxonômicos diferentes indica fortemente que essa distribuição não é um mero reflexo da composição de bases do genoma, mas que há uma variação interespecífica no mecanismo de mutação ou de reparo de repetições específicas (ELLEGREN, 2004; OLIVEIRA et al., 2006). Enzimas e outras proteínas envolvidas em vários aspectos do processamento de DNA podem ser responsáveis pela variação entre os táxons. Isso pode enfatizar que não somente os níveis de repetições diferem entre os genomas, mas também a prevalência de um tipo de microssatélite. Esse contraste pode indicar que os microssatélites apresentam um papel importante na evolução de genomas, considerando que o processo responsável pela geração de um microssatélite e sua fixação também tem sofrido alterações durante a evolução (HANCOCK, 1996; TÓTH et al., 2000).

1.4 Desenvolvimento de bibliotecas genômicas parciais para isolamento de microssatélites

Estudos de genômica comparativa têm mostrado que seqüências de pares de *primers* de microssatélites podem apresentar-se conservadas entre espécies relacionadas (NAVANI et al., 2001). O uso de microssatélites entre espécies depende da conservação dos sítios de anelamento de *primers* dentro da região

flanqueadora para possibilitar a amplificação e a manutenção do tamanho das repetições (WEBER, 1990). A presença de regiões flanqueadoras altamente conservadas foi demonstrada para alguns microssatélites em cetáceos (SCHLÖTTERER et al., 1991) e tartarugas (FITZSIMMONS et al., 1995). Esses estudos permitiram confirmar a possibilidade de amplificação de microssatélites utilizando pares de *primers* para PCR de espécies que divergiram cerca de 470 milhões de anos atrás.

Existem na literatura dados sobre a utilização de marcadores do tipo microssatélite de boi no mapeamento do genoma de búfalo (AMARAL et al., 2007; STAFUZZA et al., 2007; MIZIARA et al., 2007, GOLDAMMER et al., 2007; IANELLA et al., *in press*), estudos de diversidade, conservação e manejo em animais como ovelha (MOORE et al., 1991), cervo (SLATE et al., 1998) e búfalo (BARKER et al., 1997; VAN HOOFT et al., 1999; NAVANI et al., 2001; KUMAR et al., 2006).

No entanto, o alto nível de polimorfismo observado em um microssatélite de uma espécie pode não garantir que polimorfismo similar será encontrado em espécies relacionadas especialmente quando a distância evolutiva entre essas espécies aumenta (RUBINSZTEIN et al., 1995). Trabalhos com amplificação de microssatélites de pássaros (PRIMMER et al., 1996) e boi (MOORE et al., 1991) sugerem uma taxa de somente 50% de sucesso em amplificação e polimorfismo entre espécies que divergiram entre 10 e 20 milhões de anos. Navani e colaboradores (2001) utilizaram 108 pares de *primers* de marcadores microssatélites de boi para análise genômica de búfalo de rio. Em 75% dos pares de *primers* (81 pares) houve produto de amplificação discreta e, desse grupo, 61 pares (56%) foram polimórficos. Essa porcentagem é relativamente baixa considerando que o tempo de

divergência entre o gênero *Bos* (gado doméstico) e *Bubalus* (búfalo) é cerca de 4 milhões de anos (RITZ et al., 2000).

Tomando como base o fato de que existem restrições na utilização de pares de *primers* de microssatélites entre espécies diferentes, surge a necessidade de isolar microssatélites originais da espécie em estudo. Tradicionalmente, microssatélites são isolados de bibliotecas genômicas parciais e milhares de clones são selecionados através de hibridização dos mesmos com sondas contendo repetições (RASSMANN et al., 1991). A taxa de clones positivos obtidos a partir do método tradicional está entre 0,13% e 4,5% com média de 1,65% em mamíferos (ZANE et al., 2002). Várias outras estratégias para isolar microssatélites foram criadas a fim de diminuir o tempo investido e aumentar a eficiência de obtenção de clones positivos.

Uma dessas estratégias de isolamento de microssatélites consiste na construção de bibliotecas genômicas parciais enriquecidas com microssatélites a partir de hibridização seletiva (*selective hybridization*), baseada na utilização de esferas magnéticas (*beads*) (KANDPAL et al., 1994; KIJAS et al., 1994). Esta estratégia é relativamente simples e eficaz quando comparada com outros métodos de isolamento de microssatélites (ZANE et al., 2002) e tem sido amplamente aplicada para identificação de novos microssatélites em animais de interesse econômico como, por exemplo, *Bos taurus* (boi) (CHUNG et al., 2006), *Gallus domesticus* (galinha) (GIBBS et al., 1997) e *Equus caballus* (cavalo) (TOZAKI et al., 2004), mostrando grande eficiência na obtenção de clones possuindo fragmentos com microssatélite (entre 16% a 72% de eficiência). No entanto, para búfalo de rio, uma espécie com crescente importância econômica, nenhum estudo sistemático foi empreendido para desenvolvimento de microssatélites específicos para a espécie

(NAVANI et al., 2001) refletindo na ausência de microssatélites bubalinos descritos na literatura.

O conhecimento da distribuição e composição de microssatélites em búfalo de rio é imprescindível para auxiliar em questões evolutivas da espécie e de bovídeos em geral. A ausência de marcadores moleculares do tipo microssatélites búfalo-específicos aliados ao pobre conhecimento sobre a característica genética de populações de búfalo de rio brasileiras e a crescente importância da espécie para a economia do país, reforça a necessidade de novas investigações sobre o tema visando a preservação de fontes genéticas da espécie *Bubalus bubalis*.

Objetivos



Baseando-se nas observações de que repetições do tipo microsatélite são os marcadores de escolha para estudos de mapeamento e para estudos de população aliados à inexistência de marcadores isolados e caracterizados em búfalo de rio, o presente trabalho teve como objetivos:

- ✓ Construir bibliotecas genômicas parciais enriquecidas com seqüências repetitivas do tipo microsatélite para búfalo de rio (*Bubalus bubalis*) por meio da estratégia de hibridização seletiva;
- ✓ Isolar e caracterizar um conjunto de microsatélite a partir de sequenciamento dos clones gerados nas bibliotecas;
- ✓ Desenhar *primers* para PCR e determinar as condições ótimas das reações de amplificação para um conjunto de microsatélites isolados.

Material e Métodos



O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Genômica Comparativa (Unesp/IBILCE) e no Laboratório de Polimorfismo de DNA da Universidade Federal do Pará (LPDNA-UFPA), cujo grupo de pesquisa apresenta grande experiência na construção de bibliotecas genômicas parciais enriquecidas com microssatélites para diferentes espécies.

3.1 Construção das Bibliotecas Genômicas Parciais

Para construção das bibliotecas, foram utilizados protocolos modificados por Guillemaud et al. (2000) e Santos et al. (2005), com as etapas descritas a seguir:

3.1.1 Digestão do DNA genômico

O DNA genômico de um animal macho da raça Murrah representante da espécie *Bubalus bubalis*, foi digerido com a enzima de restrição Sau3AI (Amersham Bioscience) a 37°C *overnight*, em uma reação utilizando 3U da enzima para cada 10µg de DNA genômico. Os fragmentos resultantes da digestão foram separados em gel de agarose 1,5% (*low melting point*). Em um transiluminador, a porção do gel com fragmentos de DNA com tamanhos de 300 a 1000 bp foi cortada e

aconditionada em micro tubo (1,5mL) e purificado com kit “*GFX PCR DNA and Gel Band Purification*” (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. Os fragmentos menores de 300 bp e maiores que 1000 bp não foram considerados por não apresentarem tamanho suficiente para estudo da região flanqueadora do microssatélite e pela necessidade de subclonagem, respectivamente.

3.1.2 Ligação dos fragmentos digeridos à adaptadores

Os fragmentos de DNA purificados no passo anterior foram ligados em adaptadores denominados Sau3AI, que se constituem em dois oligonucleotídeos de seqüências complementares que quando hibridizados formam uma dupla hélice com extremidades adesivas aos fragmentos gerados pela digestão com a enzima de restrição Sau3AI. As seqüências dos adaptadores *forward* (sense) (AdapF) e *reverse* (anti-sense) (AdapR) são as seguintes:

AdapF: 5'- CTCTTGCTTACGCGTGGACTC -3'

AdapR: 5'- GATCGAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA -3'

A reação de ligação foi realizada em um volume final de 50µL: 4µL de AdapF+AdapR 10µM, 2µg do DNA digerido, 5µL 1X *One-phor-all Buffer* , 5µL de

ATP a 10mM, 2U/ μ L de T4 DNA ligase e água para completar o volume total da reação. Seguiu-se incubação *overnight* à 16°C. Após a reação de ligação, realizou-se uma reação de PCR teste utilizando 1,5 μ L de oligonucleotídeo AdapF como *primer* a 10mM, 2 μ L 10X PCR *buffer*, 2 μ L de dNTPs a 5mM, 1,5 μ L de MgCl₂ a 50mM, 0,5 μ L de *Platinum Taq* Polimerase (Invitrogen) (5U/ μ L), 14,1 μ L do DNA resultante da reação de ligação com os adaptadores e água para completar o volume de 21,5 μ L de reação. As condições de ciclagem da reação de PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos seguidos de 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C e 45 segundos a 72°C.

3.1.3 Reação de PCR para enriquecimento dos fragmentos de DNA

Esta etapa consiste na realização de 60 reações de PCR para aumentar o número de cópias dos fragmentos presentes na reação de ligação com os adaptadores. O volume total de cada uma das 60 reações de PCR foi de 20,4 μ L. Cada reação foi feita utilizando como *primer* 1,5 μ L de AdapF 10mM, 0,84 μ L de dNTPs 5mM, 2 μ L de 10X PCR *buffer*, 1,2 μ L de MgCl₂ 50mM, 0,16 μ L de *Platinum Taq* polimerase (5U/ μ L), 0,4 μ L da reação de ligação e 14,33 μ L de água. As condições de ciclagem foram as mesmas utilizadas na reação de PCR teste, descrita no experimento de ligação, porém com somente 17 ciclos. O produto de PCR foi purificado com kit GFX e eluídos em 100 μ L de TE.

3.1.4 Preparação das esferas magnéticas e formação do complexo "Biotina/Estreptoavidina"

As esferas magnéticas (*beads*) (*Dynabeads® M-280 Streptavidin*, Dnal Biotech-Invitrogen) são fornecidas pelo fabricante em solução de preservação (NaN_3 0,02%), a qual foi removida para realização dos passos subseqüentes. Para remoção da solução de preservação, 200 μL da solução+esferas foram transferidas para um micro tubo (1,5mL). Com auxílio de um concentrador magnético (Promega) foi possível retirar a solução de preservação mantendo no tubo apenas as esferas.

Em seguida, iniciaram-se os passos de lavagem das esferas com soluções de PBS, pH 7,4: 0,1% BSA e B&W (*Binding & Washing Buffer* – tampão de ligação e lavagem– 10mM Tris-HCl, pH 7,5; 1mM EDTA; 2M NaCl), sempre utilizando o concentrador magnético para a troca de soluções.

Para a formação do complexo “Biotina/Estreptoavidina” foram utilizadas sondas (oligonucleotídeos simples) com repetição dinucleotídica, $(\text{CA})_{15}$, $(\text{CT})_{15}$; trinucleotídica, $(\text{AGG})_8$; tetranucleotídica, $(\text{GATA})_8$, (GAAA) e pentanucleotídica, $(\text{AAAAC})_8$, as quais foram previamente marcadas com biotina. A solução estoque de cada sonda foi diluída para uma concentração final de 6pmol/ μL em volume final de 100 μL . Na solução de 100 μL de cada sonda, foram adicionadas 100 μL da solução de esferas magnéticas, as quais apresentam-se revestidas com estreptoavidina. As etapas de preparação das esferas magnéticas e formação do complexo biotina/estreptoavidina estão esquematicamente representadas na figura 5. As soluções com o complexo biotina/estreptoavidina foram mantidas em repouso à temperatura ambiente por duas horas e em seguida acondicionadas em geladeira até o processo de captura dos microssatélites.

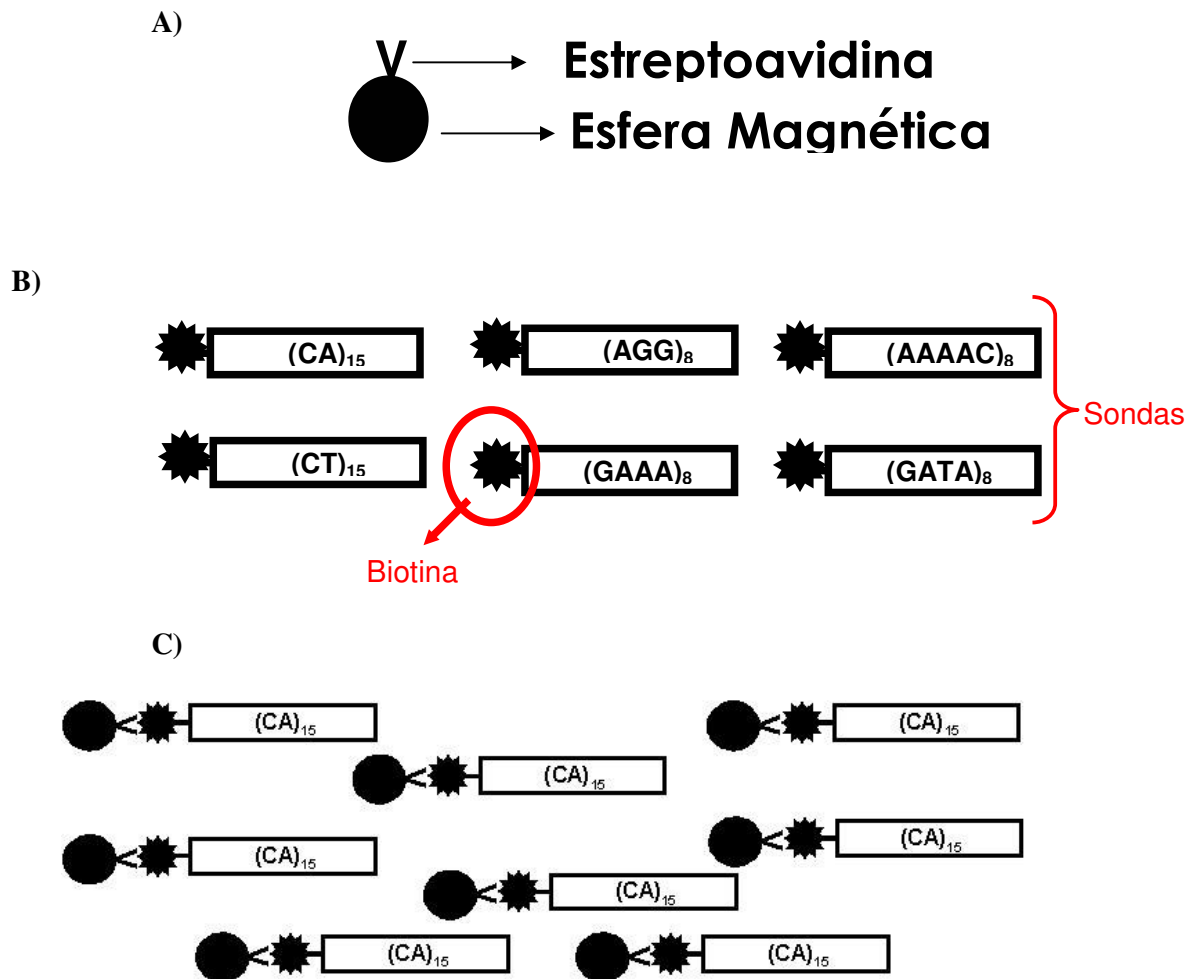


Figura 5. Representação esquemática da preparação das etapas de preparação das esferas magnéticas e formação do complexo biotina/estreptoavidina **A)** Esfera magnética revestida com estreptoavidina. **B)** Sondas para microsatélite marcadas com Biotina. Nesse trabalho foram utilizadas 6 tipos de sondas para construção de 6 bibliotecas genômicas parciais diferentes para búfalo de rio. **C)** Formação do complexo “biotina/estreptoavidina”. Esse complexo permite a ligação da esfera magnética à sonda utilizada. A parte C ilustra somente a formação com complexo utilizando sondas $(CA)_{15}$.

3.1.5 Captura das seqüências de microssatélite

Com auxílio do concentrador magnético, a solução de [B&W]+sonda foi retirada de cada tubo contendo as esferas. Realizaram-se, então, lavagens adicionais para retirada dos restos de reagentes não utilizados na formação do complexo esfera magnética revestida com estreptoavidina + sonda marcada com biotina.

O complexo sonda+esfera foi lavado duas vezes com 200µL de solução de tampão de ligação e lavagem (B&W) e uma vez com 200µL de SSC 5X+SDS 0,1% à temperatura ambiente. A solução de SSC 5X foi retirada e foram adicionados ao complexo 150µL de SSC 10X+SDS 0,2% pré-aquecido na temperatura de hibridização de cada sonda, descritas na tabela 1.

Tabela 1: Lista dos tipos das sondas marcadas com biotina utilizadas para captura das seqüências de DNA microssatélites e suas respectivas temperaturas de hibridização.

TIPO DE SONDA	TEMPERATURA DE HIBRIDIZAÇÃO
(CA) ₁₅	55°C
(CT) ₁₅	55°C
(AGG) ₈	60°C
(GAAA) ₈	65°C
(GATA) ₈	65°C
(AAAAC) ₈	70°C

Em um termociclador, 100µL da solução com fragmentos de DNA enriquecidos conforme descrito no item 3.1.3, foram desnaturados a 95°C por 5

minutos e imediatamente acondicionada em gelo. A seguir, os fragmentos de DNA foram adicionados aos tubos contendo o complexo sonda+esfera, seguindo-se a hibridização em forno sob agitação durante 5 horas em temperatura de hibridização específica para cada sonda.

Após a incubação, os tubos foram novamente colocados em concentrador magnético para separação do sobrenadante. As esferas foram lavadas duas vezes com 200 μ L de solução de SSC 2X+SDS 0,1% a temperatura ambiente. Para cada lavagem, a solução com as esferas foram homogeneizadas agitando-se o tubo por 5 minutos.

Em seguida, as esferas foram novamente lavadas com 200 μ L de solução de SSC 2X+SDS 0,1%, porém a solução foi previamente aquecida à temperatura de hibridização de cada sonda e os tubos foram mantidos em forno de hibridização por 10 minutos na mesma temperatura.

A solução de SSC 2X+SDS 0,1% foi retirada e, em seguida, as esferas foram lavadas com 200 μ L de TE/NaCl (990 μ L de TE 1M e 10 μ L de NaCl 5M). O sobrenadante foi extraído e por fim as esferas foram ressuspensas em 100 μ L de TE.

Para teste de eficiência da hibridização das sondas com os fragmentos de DNA foram realizadas reações de PCR utilizando 1 μ L do sobrenadante da solução final esferas+TE, seguindo as mesmas concentrações descritas para a reação de PCR realizada no teste de eficiência de ligação dos adaptadores, com exceção da ciclagem que foi a seguinte: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C e 45 segundos a 72°C e extensão final de 2 minutos a 72°C. Em seguida, o produto de PCR foi visualizado em gel de agarose a 1%.

3.1.6 Amplificação dos fragmentos de DNA hibridizados para o processo de clonagem

Para cada tipo de sonda foram realizadas quatro reações de PCR com um volume total de reação de 40 μ L, utilizando-se 4 μ L de 10X PCR *buffer* a 10mM, 2 μ L de dNTPs a 5mM, 2,4 μ L de MgCl₂ a 50mM, 2,0 μ L de AdapF a 10mM, 2 U/ μ L de *Platinum Taq* polimerase, 2,0 μ L do DNA resultante da captura dos microssatélites (item 3.1.5) e 27,2 μ L de água. A ciclagem do PCR foi a mesma dos experimentos de teste de ligação, porém com 15 ciclos. O produto de PCR foi purificado com kit GFX e eluído em 25 μ L de TE.

3.2 Clonagem e Seqüenciamento dos microssatélites capturados

Utilizando-se o produto de PCR purificado no passo anterior foram realizadas reações de ligação com o vetor pCR2.1, utilizando o kit TA cloning® (Invitrogen). As reações de ligação com o vetor foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante e incubadas em banho-maria a 14°C *overnight*. Após, seguiu-se com a precipitação para a retirada do excesso de sal da reação.

Bactérias eletrocompetentes (*Escherichia coli* DH5 α - Invitrogen) foram transformadas com os plasmídeos contendo o inserto, utilizando-se eletroporador. As bactérias transformadas foram semeadas em placas de petri contendo meio LB e ampicilina suplementado com X-Gal e mantidas em estufa de CO₂ a 37°C *overnight*.

As colônias brancas foram transferidas para 100 µL de meio líquido Circle Grow® (Q Biogene) contendo ampicilina, e distribuídas em placas de cultura com 96 poços. As placas foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C durante 5 horas para crescimento. Em seguida, foram adicionados 50µL de glicerol 10% a cada poço e as placas de cultura foram estocadas em freezer à -20°C, concluindo assim a construção das bibliotecas.

As colônias armazenadas foram utilizadas como molde direto para reações de PCR utilizando os *primers* sense e anti-sense M13 que flanqueiam a região do inserto. Os produtos de PCR foram seqüenciados utilizando o protocolo padrão do *DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit* (GE Healthcare). O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático do tipo capilar *MegaBACE™ 1000 DNA Analysis System* (GE Healthcare), e as seqüências foram editadas e alinhadas utilizando-se o software BioEdit© (HALL, 1999).

3.3 Desenho dos pares de *primers* e otimização das condições de PCR para amplificação dos microssatélites selecionado

Foram desenhados pares de *primers* para PCR de 10 microssatélites isolados no estudo. Os oligonucleotídeos foram desenhados utilizando o programa *Primer Express® v2.0* (Applied Biosystems), baseando-se nas seqüências geradas e posteriormente alinhadas.

No entanto, somente pares de *primers* de 4 microssatélites isolados foram testados para padronização das reações de PCR e identificação de temperaturas de

anelamento utilizando como molde DNA de um macho *Bubalus bubalis* da raça Murrah.

Os locos de microsatélite foram amplificados com as seguintes condições: 1µL de dNTP a 5mM; 0,25µL de cada primer (sense e anti-sense) a 5pMoles; 1X PCR buffer (20mM Tris-HCl (pH 8.4), 50mM HCl), MgCl₂ dependendo das exigências de cada par de *primer*; 0,15 Unidades/µL de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 2µL de DNA a 25ng/µL e água para completar o volume total de reação. O volume total de reação foi de 10µL. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Mastercycler® Gradient (Eppendorf) utilizando gradiente de temperatura de 60°C a 75°C. O termociclador foi programado para seguir a seguinte ciclagem: 95°C a 5 minutos; 35 ciclos de 95°C a 30 segundos, 60°C a 75°C (gradiente) por 30 segundos; 72°C a 30 segundos e extensão final de 72°C a 6 minutos.

As reações de PCR foram visualizadas em gel de agarose a 2% para confirmação de amplificação dos quatro marcadores isolados a partir das bibliotecas construídas.

Resultados e Discussão



4.1 Construção das Bibliotecas Genômicas Parciais Enriquecidas com Microssatélites

A partir da confirmação da hibridização por meio de experimentos de PCR com cada uma das sondas utilizadas, $(CA)_{15}$, $(CT)_{15}$, $(AGG)_8$, $(GAAA)_8$, $(GATA)_8$ e $(AAAAC)_8$; seguiu-se o processo de clonagem gerando um total de 1824 clones recombinantes. Na tabela 2 encontra-se descrito o número de clones gerados em cada biblioteca enriquecida com microssatélites.

Tabela 2. Número de clones gerados em cada biblioteca enriquecida com microssatélites.

Nome da biblioteca	Total de clones recombinantes
$(CA)_{15}$	288
$(CT)_{15}$	288
$(AGG)_8$	288
$(GAAA)_8$	288
$(GATA)_8$	288
$(AAAAC)_8$	384
Total de clones recombinantes gerados	1.824

Na figura 6 está representado o experimento de confirmação de hibridização por PCR com as sondas tetranucleotídicas $(GAAA)_8$ e $(GATA)_8$. Como observado, a discrepância no tamanho do rastro deve-se a diferença de comportamento de cada sonda. Neste caso, a sonda $(GATA)_8$ hibridizou em fragmentos de menor tamanho do que em $(GAAA)_8$.

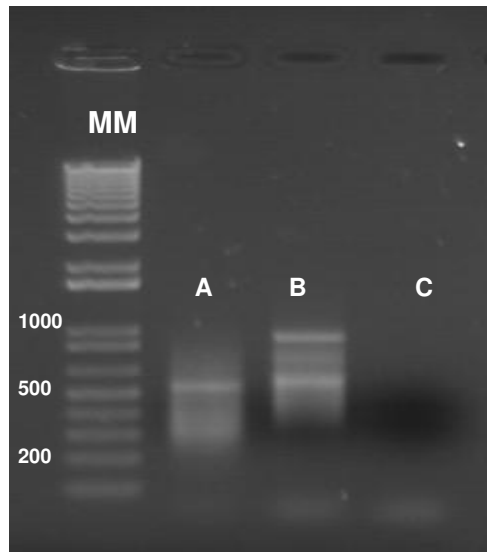


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose a 1%. A foto representa o resultado da reação de PCR teste de eficiência para a hibridização das sondas $(GATA)_8$ e $(GAAA)_8$. (tetranucleotídicas). **A:** Teste de eficiência de hibridização dos fragmentos de DNA com a sonda $(GATA)_8$. **B:** Teste de eficiência de hibridização dos fragmentos de DNA com a sonda $(GAAA)_8$. **C:** Controle negativo das reações de PCR (branco). **MM:** marcador de peso molecular 1Kb.

A figura 7 mostra os resultados das reações de PCR com 12 dos 384 clones gerados na biblioteca pentanucleotídica $(AAAAC)_8$. Como pode ser observado, os produtos de PCR apresentaram tamanhos diferentes confirmando que os clones possuem vetores com insertos de diferentes tamanhos.

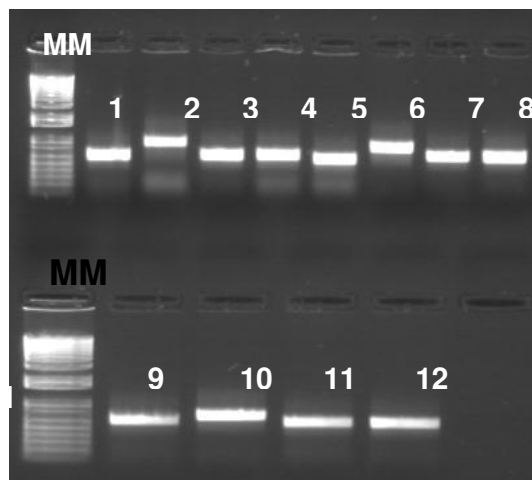


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 1%. Reações de PCR para seqüenciamento da colônia utilizando *primers* para PCR M13. **1-12:** Bandas referentes a reações de PCR com 12 colônias aleatórias entre 384 colônias geradas com a sonda (AAAAC)_n. **MM:** marcador molecular 1Kb.

Dos 1.824 clones gerados, 954 foram seqüenciados (52,3%) para a identificação dos insertos com microssatélites. Do conjunto de clones seqüenciados foi possível identificar 113 com microssatélites, considerando a presença de no mínimo 4 unidades de repetição (11,84%). Os outros 841 clones seqüenciados não apresentaram insertos com seqüências repetitivas ou possuíam seqüências com menos de 4 unidades de repetição e, portanto, não foram selecionados no estudo. Os clones que não foram seqüenciados foram armazenados para futuro seqüenciamento e posterior identificação de outros microssatélites para búfalo de rio.

Em relação à eficiência da estratégia utilizada para construção das bibliotecas genômicas parciais, algumas observações mostram-se importantes. Como mencionado anteriormente, as bibliotecas geradas neste trabalho apresentaram 11,84% de eficiência no isolamento de microssatélites para búfalo de rio, ou seja, 113 microssatélites identificados. Este dado foi semelhante à eficiência de isolamento de bibliotecas genômicas parciais utilizando o método de hibridização

seletiva construídas para o peixe bodião-de-pinta (*Symphodus ocellatus*), que apresentaram 11,73% de eficiência (ARIGONI & LARGIÀDER, 2000); jacaré-do-papo-amarelo (*Caiman latirostris*), com cerca de 10,41% de eficiência no isolamento de microssatélites para a referida espécie (ZUCOLOTO et al., 2002) e tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), cuja biblioteca genômica parcial apresentou 19,5% de clones com insertos positivos para a presença de microssatélites (GARCIA et al., 2005).

A metodologia mostrou-se eficiente quando comparada com o método tradicional de construção de bibliotecas genômicas parciais para isolamento de microssatélites, que caracteriza-se pela identificação de clones positivos utilizando sondas radioativas (^{32}P , ^{33}P) e não radioativas (digoxigenina). A diferença na eficiência entre a estratégia tradicional e hibridização seletiva pode ser observada na baixa porcentagem de microssatélites isolados através do método tradicional, como mostram os trabalhos desenvolvidos por Carmichael e colaboradores (2000), quando construíram uma biblioteca genômica parcial para lince (*Lynx canadensis*) com eficiência de 1,57% de clones positivos, e também as bibliotecas construídas para isolamento de microssatélites do genoma do elefante africano (*Loxodonta africana*), cuja eficiência foi de 1,6% (EGGERT et al., 2000).

Apesar da relativa alta eficiência no isolamento de microssatélites das bibliotecas desenvolvidas neste estudo em relação à estratégia tradicional, a eficiência foi baixa em relação a alguns trabalhos utilizando a mesma técnica. Um exemplo são as bibliotecas desenvolvidas por Chung e colaboradores (2006) para bovino (*Bos taurus*), que apresentaram 72% de eficiência no isolamento de microssatélites para a espécie.

Observa-se na literatura que a eficiência das bibliotecas está diretamente correlacionada com o tipo de unidade de repetições e a espécie que está sendo avaliada. Sabe-se que microssatélites com unidades de repetição dinucleotídica são os mais comuns em eucariotos superiores. Em genomas mamíferos, a frequência média de ocorrência é de um microssatélite em 30 a 60 Kb (STALLING et al., 1991). A alta eficiência no isolamento de microssatélites com unidades de repetição do tipo (CA)_n pode ser verificada nos trabalhos descritos para cervo (*Moschus berezovskii*) (ZOU et al., 2005), com eficiência de 72% e para cavalo (*Equus caballus*) (TOZAKI et al., 2007), que mostrou 61% de eficiência.

As bibliotecas (CA)₁₅ construídas neste estudo apresentaram 22,2% de clones positivos, ou seja, 64 clones positivos em 288 clones recombinantes da biblioteca. As bibliotecas CA mostraram-se as mais eficientes para identificação de microssatélites em búfalo de rio, corroborando com as informações da literatura que afirmam que microssatélites com unidade de repetição CA são os mais comuns em eucariotos, e portanto, as bibliotecas CA são as mais eficientes.

A eficiência de captura de fragmentos de DNA com microssatélite também é extremamente influenciada pela etapa de “Captura das seqüências de microssatélite”, descrita no ítem 3.1.5 deste trabalho. Esta etapa deve ser realizada mantendo o complexo esfera/sonda *sempre* na temperatura de hibridização, pois desvios de temperatura prejudicam a hibridização, reduzindo drasticamente a eficiência no isolamento de microssatélites na espécie de interesse. Apesar da preocupação na manutenção da temperatura de hibridização para construção das bibliotecas genômicas parciais de búfalo de rio, pequenos desvios na temperatura foram inevitáveis, principalmente durante a transferência dos tubos contendo sonda/esfera e fragmentos de DNA do banho-maria para o forno de hibridização,

possivelmente influenciando na eficiência da captura dos microssatélites nas bibliotecas construídas neste estudo.

4.2 Caracterização estrutural dos 113 microssatélites identificados

De acordo com Chamber e McAvoy (2000), microssatélites são classificados em três grandes categorias: Puro, Composto e Complexo, sendo que cada categoria possui uma subdivisão: Puro Interrompido, Composto Interrompido e Complexo Interrompido. Esta classificação leva em consideração a forma e o número de unidades de repetição diferentes que formam o arranjo da repetição. Apesar dessa classificação, os autores admitem que ainda existe controvérsia entre estudos sobre a definição de um microssatélite, principalmente no que diz respeito ao estabelecimento de sua estrutura de repetição. A avaliação estrutural do arranjo do microssatélite é de grande importância para a compreensão de sua história evolutiva.

Microssatélites *Puros* são aqueles cuja seqüência não apresenta nenhum tipo de nucleotídeo diferente daquela da unidade de repetição, como exemplificado na figura 8a. Microssatélites *Puros interrompidos* são aqueles com um ou mais nucleotídeos diferentes daquele da unidade de repetição interrompendo uma ou várias vezes o microssatélite (Figura 8b).

Neste estudo não foi isolado nenhum microssatélite *Composto*, que caracteriza-se pela presença de unidades repetitivas diferentes justapostas, como por exemplo $(CA)_9(GAA)_7$. No entanto, foi possível identificar microssatélites da categoria *Composto interrompido* entre aqueles isolados, que possuem duas

unidades de repetição diferentes justapostas, porém interrompidas uma ou mais vezes por alguns nucleotídeos, como mostra a figura 8c.

Microsatélites *Complexos* e *Complexos interrompidos* também não foram identificados neste estudo. Microsatélites com estrutura complexa caracterizam-se pela presença de mais de duas unidades de repetição justapostas, como o exemplo $(CA)_9(GAA)_7(CTT)_{12}$. Microsatélites com estrutura complexa interrompida possuem alguns nucleotídeos interrompendo as unidades de repetição justapostas. Isso pode ser observado no exemplo a seguir: $(CA)_7TA(CA)_2(GAA)_7GC(CTT)_{12}$ (os nucleotídeos destacados em vermelho são aqueles que interrompem o conjunto de unidades de repetição justapostas).

Dos 113 microssatélites isolados, 90 apresentaram arranjo *puro* (79,64%); 21 apresentaram arranjo estrutural pertencente à categoria *puro interrompido* (18,59%) e somente dois foram identificadas como *compostos interrompidos* (1,77%). As porcentagens referentes às categorias de microssatélites identificados estão apresentadas no gráfico abaixo (Figura 9).

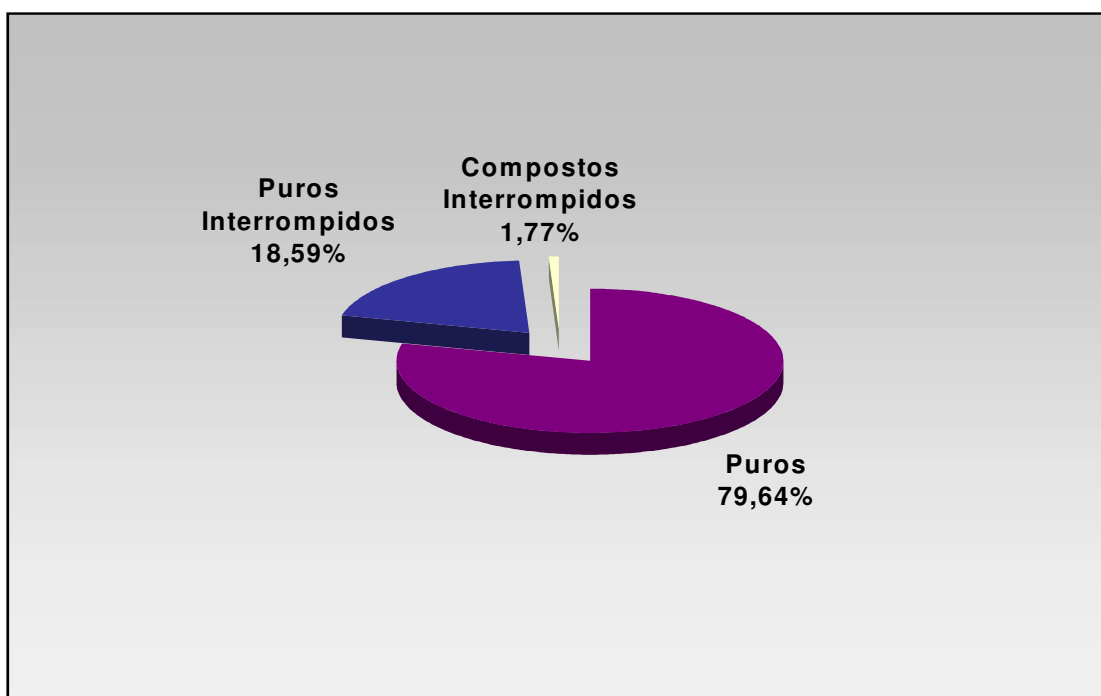


Figura 9. Gráfico com as porcentagens referentes às categorias de microssatélites encontrados neste trabalho (Puros: 79,64% - 90 seqüências; Puros Interrompidos: 18,59% -21 seqüências; Compostos Interrompidos: 1,77% - 2 seqüências).

A porcentagem obtida de microssatélites puros foi similar àquela observada em bibliotecas do genoma humano (64% - WEBER, 1990), de pato (60% - HUANG et al., 2005) e de gastrópodes marinhos (73,3% - QI & AKIHIRO, 2007). No entanto, o número de microssatélites compostos foi baixo em comparação com aqueles encontrados em humanos (12% - WEBER 1990), abelha (30% - ESTOUP et

al, 1993) e gastrópodes (13,4% - QI & AKIHIRO, 2007). Os microssatélites compostos interrompidos identificados no estudo apresentaram características incomuns entre as repetições compostas encontradas. Em outras espécies, geralmente, os microssatélites compostos são agrupamentos de seqüências CAs associadas a blocos de repetições dinucleotídicas como GA, TC ou AT (WEBER et al., 1990). Neste trabalho, um dos microssatélites compostos interrompidos apresenta agrupamento de repetições CA associadas à repetição TG.

O segundo microssatélite composto interrompido identificado em búfalo de rio apresenta agrupamento de nucleotídeos CA associado à um bloco de repetição tetranucleotídica TGCA (figura 8c). Apesar da raridade desse tipo de seqüência, há descrição na literatura da importância de repetições compostas incomuns. É o caso do microssatélite composto do genoma humano descrito por Greenberg e colaboradores (1997). Esses pesquisadores demonstraram a existência de uma repetição tetranucleotídica - $(TGCG)_n/(ACGC)_n$ - justaposta a uma repetição dinucleotídica - $(GT)_n/(CA)_n$ - no loco do fator de tumor de necrose/linfotóxina, que codifica proteínas envolvidas na regulação da inflamação e resposta imune. Essa região apresentou-se polimórfica e potencialmente interessante para explorar bases genéticas associadas a genes relacionados a doenças auto-imunes localizadas dentro dessa região descrita como pertencente ao complexo MHC de classe III.

O quadro 1 apresenta a lista dos microssatélites obtidos neste trabalho, categorizados quanto ao número de unidades de repetição dos microssatélites, número de microssatélites obtidos com cada tipo de repetição e categoria estrutural.

Quadro1. Caracterização dos microssatélites isolados quanto à seqüência da repetição, número de microssatélites obtidos para cada repetição e categoria do microssatélite.

Seqüência da Repetição do Microssatélite	Número de microssatélites obtidos	Categoria do Microssatélite (conforme Chamber & McAvoy, 2000)
(CA) ₄	25	PURO
(CA) ₅	8	PURO
(CT) ₄	13	PURO
(CT) ₅	6	PURO
(AT) ₄	3	PURO
(AT) ₅	2	PURO
(CG) ₄	1	PURO
(AGG) ₄	2	PURO
(AGG) ₅	1	PURO
(CAG) ₄	2	PURO
(CTG) ₄	1	PURO
(CCG) ₄	1	PURO
(AAGG) ₄	2	PURO
(AAAAC) ₄	1	PURO
(CA) ₁₂	1	PURO
(CA) ₂₁	1	PURO
(CA) ₁₇	1	PURO
(CT) ₁₆	1	PURO
(CT) ₉	1	PURO
(GCT) ₉	1	PURO
(CT) ₆	2	PURO
(CA) ₂₀	1	PURO
(CA) ₁₉	2	PURO
(CA) ₇	1	PURO
(CA) ₈	1	PURO
(CA) ₂₂	2	PURO
(CA) ₆	2	PURO
(GCCA) ₆	1	PURO
(CAAA) ₅	1	PURO
(CAAA) ₆	1	PURO
(CATT) ₆	1	PURO
(AGG) ₆	1	PURO
(CA) ₅ TA(CA) ₃	1	PURO INTERROMPIDO
(CA) ₃ CT(CA) ₄	1	PURO INTERROMPIDO
(AGG) ₂ CGATG(AGG) ₄ AAG(AGG) ₄	1	PURO INTERROMPIDO
(CA) ₁₈ TA(CA) ₃	1	PURO INTERROMPIDO
(CA) ₃ TA(CA) ₂	1	PURO INTERROMPIDO
(CA) ₃ GG(CA) ₃	1	PURO INTERROMPIDO
(CA) ₃ C(CA) ₄	1	PURO INTERROMPIDO
(CT) ₈ ACCTTTC(CT) ₂ TT(CT) ₆	1	PURO INTERROMPIDO
(CA) ₂ TT(CA) ₈ TT(CA) ₂	1	PURO INTERROMPIDO
(CA) ₇ GA(CA) ₂	1	PURO INTERROMPIDO
(CA) ₅ T(CA) ₂	1	PURO INTERROMPIDO
(CA) ₂ TA(CA) ₄ TA(CA) ₂	1	PURO INTERROMPIDO
(CT) ₇ TT(CT) ₂ TT(CT) ₄ TT(CT) ₇	1	PURO INTERROMPIDO
(CT) ₆ TT(CT) ₆ TT(CT) ₅ GT(CT) ₄ GT(CT) ₅ GT(CT) ₆	1	PURO INTERROMPIDO
(CA) ₇ AA(CA) ₃	1	PURO INTERROMPIDO
(CA) ₂ GA(CA) ₂	2	PURO INTERROMPIDO
(CA) ₂ CT(CA) ₂	1	PURO INTERROMPIDO
(CA) ₃ TAA(CA) ₂	1	PURO INTERROMPIDO
(CA) ₂ C(CA) ₃	1	PURO INTERROMPIDO
(CA) ₂ CT(CA) ₃	1	PURO INTERROMPIDO
(CA) ₅ CG(TG) ₂ CG(CA) ₉ CTCACT(CA) ₆	1	COMPOSTO INTERROMPIDO
(CA) ₇ (TGCA) ₂ TA(CA) ₅	1	COMPOSTO INTERROMPIDO

A unidade de repetição mais comum entre os microssatélites isolados foi dinucleotídica, com destaque para repetições do tipo CA, apresentando 64 seqüências (56,6%), com o número de repetições variando de 4 a 22.

A maior seqüência observada no conjunto de microssatélites isolados pertence a um microssatélite puro interrompido com unidade de repetição (CT)₃₂ – (CT)₆TT(CT)₆TT(CT)₅G(CT)₄GT(CT)₅GT(CT)₆. A unidade de repetição menos comum foi (AAAAC)₄, seguida de (CTG)₄ e (CCG)₄, todas apresentando somente uma seqüência. A repetição (AAAAC)₄ foi a única seqüência pentanucleotídica isolada.

Verificou-se, portanto, que o isolamento de repetições dinucleotídicas foi muito mais eficiente do que o isolamento de seqüências tetra- e pentanucleotídica. Ellegren (2000), observou em microssatélites humanos que contrações e expansões no número de unidades de repetição de microssatélites são igualmente comuns entre repetições tetranucleotídicas enquanto que a expansão é o evento mais comum entre as repetições dinucleotídicas. Isso oferece uma possível explicação para o fato de que repetições dinucleotídicas são geralmente mais longas e comuns do que repetições tetranucleotídicas. A partir dessas observações, pode-se inferir que existe um viés mutacional favorecendo expansão e promovendo gradual crescimento de repetições dinucleotídicas em detrimento das tetranucleotídicas.

O fator que promove essa diferença mutacional ainda não é conhecido, mas pensando em eventos de *slippage*, a formação de um *loop* para eliminação de uma unidade de repetição dinucleotídica na fita molde é menos provável do que um *loop* de quatro pares de base (tetranucleotídeo) por razões estruturais da dupla hélice. No genoma humano, por exemplo, estima-se que existam poucos milhares de locos com repetições pentanucleotídicas, enquanto que existem cerca de meio milhão de

locos de repetições mononucleotídicas (A e T principalmente) ocupando cerca de 10 Mb no total (BENNET, 2000). Assim, pode-se inferir que microssatélites com unidades de repetição tetra- e pentanucleotídica também sejam raros no genoma bubalino, dificultando assim seu isolamento.

A figura 10 apresenta a porcentagem geral de microssatélite com unidades de repetição di, tri-, tetra- e pentanucleotídicas isolados neste trabalho.

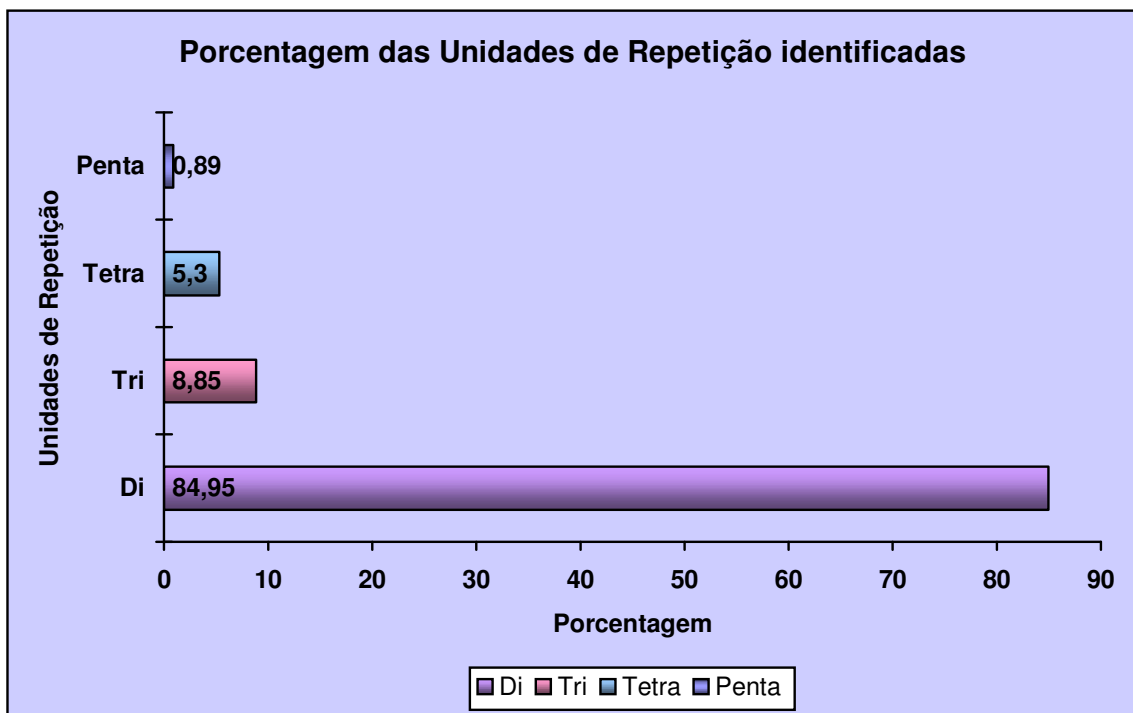


Figura 10. Gráfico apresentando as porcentagens das unidades de repetição identificadas. Noventa e seis seqüências apresentaram unidade de repetição dinucleotídica. Essa unidade de repetição mostrou-se a mais comum identificada nesse trabalho (84,95% das seqüências). Foram encontradas 10 seqüências com unidade de repetição trinucleotídica (8,85%), seis seqüências tetranucleotídicas (5,3%). A unidade de repetição menos comum foi a pentanucleotídica (0,89% - apenas uma seqüência isolada).

Repetições acima de 10 unidades foram menos abundantes do que aquelas com o número abaixo de 10. Dentre os 113 microssatélites isolados, somente 18

apresentaram tamanho maior que 10 unidades de repetição, caracterizando 15,92% do total de microsatélites isolados.

O número de repetições é um fator crucial na determinação da dinâmica evolutiva de um microsatélite (SCHLÖTTERER, 2000). Estudos indicam que microsatélites longos sofrem pressão de mutação que diminuem o número de unidades de repetição. Assim, microsatélites com tamanho maior que 50 unidades de repetição são raramente observados (GOLDSTEIN & POLLOCK, 1997). Xu e colaboradores (2000) explicam esse fenômeno utilizando três proposições: 1) a taxa mutacional para expansão de um microsatélite é constante para todos, independente do tamanho; 2) a taxa de mutação de contração de uma microsatélite aumenta exponencialmente e 3) as taxas de mutação de expansão e contração de um microsatélite são equivalentes.

Portanto, pode-se concluir que existe um tamanho crítico onde as taxas de mutação de expansão e contração são equivalentes. Microsatélites que apresentam quantidade de unidades de repetição abaixo do tamanho crítico sofrem expansão, enquanto mutações naqueles de maior tamanho favorecem sua contração. O crescimento infinito de um microsatélite é prevenido pela acumulação de substituições de bases que ocorrem ao longo da seqüência (KRUGLYAK et al., 1998). Essas observações evidenciam que a seleção está mantendo os microsatélites em um certo limiar de tamanho (NAUTA & WEISSING, 1996; SCHLÖTTERER et al., 2000).

A figura 11 apresenta a distribuição dos microsatélites por número de unidades de repetição (4 unidades a 32 unidades) identificados nas seis bibliotecas construídas.

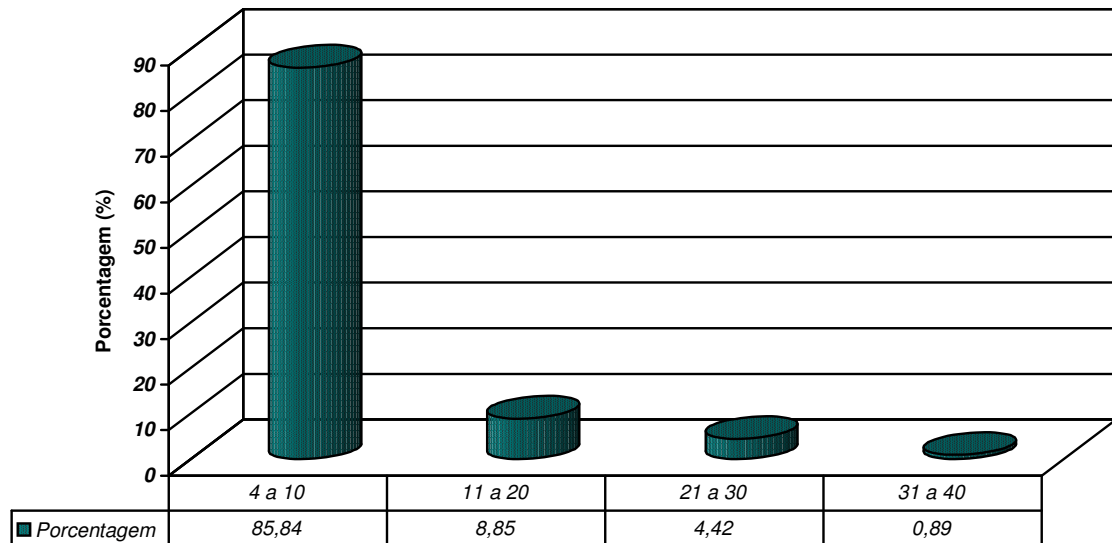


Figura 11. Distribuição dos microssatélites em relação ao número de unidades de repetição. Noventa e sete seqüências apresentaram de 4 a 10 unidades de repetição (85,84%); 10 seqüências apresentaram de 11 a 20 unidades de repetição (8,85%); 5 seqüências apresentaram 21 a 30 unidades de repetição (4,42%) e 1 seqüência apresentou 32 unidades de repetição (0,89%). Portanto, a maioria dos microssatélites isolados apresenta de 4 a 10 unidades de repetição, sendo as repetições de 11 a 20 unidades a segunda mais comum. Verifica-se a baixa freqüência de seqüências com mais de 15 de unidades de repetição (99 seqüências), confirmando a observação de que microssatélites são impedidos de crescer indefinidamente.

4.2.1 Desenho dos pares de *primers* para PCR de 10 microssatélites selecionados

Uma observação importante no estudo de microssatélites é o fato de que a taxa mutacional nessas regiões não diferem somente entre espécies, mas também dentro da espécie. O maior determinante desta variação é o tamanho de um microssatélite individual. Para muitas espécies estudadas a média do número de repetições de um loco é diretamente proporcional ao grau de polimorfismo, indicando que locos longos sofrem mais mutações do que locos curtos (WEBER, 1990; ELLEGREN, 2000). Observa-se na prática que locos com menos de 5 unidades de repetição são raramente polimórficos (WEBER, 1990; STRASSMANN et al., 1997;

SCHLÖTTERER & HARR, 2000; ZHU et al., 2000). Strassmann e colaboradores (1997) confirmaram esse padrão avaliando microssatélites com repetições trinucleotídicas com 3 e 4 unidades de repetição e indentificaram que somente uma dessas seqüências mostrou-se polimórfica.

Tomando como princípio que microssatélites pequenos são na maioria dos casos monomórficos, foi selecionado para desenho de *primers* para PCR, 42 microssatélites que apresentaram tamanho acima de 6 unidades de repetição.

Destes, 10 seqüências selecionadas foram posteriormente descartadas tendo em vista que a região do microssatélite propriamente dita encontravam-se na extremidade do inserto, não apresentando, portanto a região flanqueadora para desenho dos *primers*.

Os 32 microssatélites restantes foram nomeados seguindo as iniciais do nome da espécie (BBU – *Bubalus bubalis*), acrescido da designação “MS” para microssatélite e número com três dígitos em ordem crescente. O quadro 2 apresenta as 32 seqüências resultantes e em destaque, o microssatélite.

Quadro 2. Seqüências dos 32 microssatélites isolados em *Bubalus bubalis* que serão avaliados em população de búfalo de rio brasileira.

>BBUMS001

TTCTCTTGCTTACGCGTGGACTCCTGAGGGGGATTCTCAGAAAATGTCCAGAGTGACCACAGTTC
CTGGGCGAGACTGCTCCACAGGGCTCTGGAGGTGGGTGCCTGGGAACACACCATTGCACCCAT
CACACACACACACACACACACACACCGTTACCATGAAAGCTATGTGGGTGCACATGCATGTGTG
GTGTGCAGCCTTGTGCGTACTGTTACATGATGCGTGTGTTAGCTGAAACAGCAGAGGGTGTAGAG
GGGTCCAGTCATCTGCTCCTGAGACCAGTGGGAGCCCCGTCTCAGCCTCCTGCACCCCTGAG
CCCCACTCCCTGCTCCAGGAATGATCGATCGATGTCCACGCGTAAGCAGAGAAGCCGAATT

>BBUMS002

CCCGGAGTCGGAATGGCAACCCACTCCAGAATTCTTGCCTGGAAAAGTCCATGGACAAAGGA
GCCTGAAGGGCTACAGTCCATGGGGTCGCAAAGAGTCAGATAGGACTGAGCGCACATAACATAC
ACACACACACACACACACACACACACACACACATACACACACGCACACACAGCTCCCATCA
TCTCCAGTGTAGTCAAGGAAGGGAAACAGGGCTCCAGAATTCGCATCCTCTTGCTCAAGGAACA
ACTAAGGCTCAATTTCTTCAACGGGGAATGTGGACGTTGCAGAATCACAATCTATTTGTCAAGTAT
ACCGAATGAATAGGCTGTTATAATGGGGCATATAAAGCGCCTGGCTCCTAATGGGTACACTATAAA
ATGGAATTACTATTTTGAACAGACTCAAAATTGGATTCCAGCTCTCAGAAAATAATAATCATG
TGATTGATAGCTAACATTGAGTACACTCTATATGGCGCTGACTTTTCTAACATCTCTTTTAACTG
CACATAACTTGATCGAGTCCACGCGTAAGCAA

>BBUMS003

GGCTTCTCTGCTTACGCGTGGACTCGATCTGAAGACCCAGAACTGTCTCTCACCCCTATTGTTT
TTTCTCTCCTGCCTCTCCCATCTATGGCTCTCACAGAAGGGAGGGTGAAGGAAGCGGGGCTGGA
GAGATAAAGGCTGAGTGTCTGCAAGCCCTGAAGTGACAGGGACTGTCTGATGCAGAC**CACACACA**
CACACAGACACATACACGGACCCACCCCACTACCACCACGAAAACACAGACACACCTTCAG
GTGTGAGACACCACATAAATACATAGAAGTCCACACACGTGCAGAGTCCACGCGT

>BBUMS004

TTACGCGTGGACTCGATCTTCGCATTGCACTTTAAAGATGCTAAGCAGGAGGAGGATTACCATT
TTATTTCTTGGCCTTGTT**TCTCTCTCTCTC**AGGGAGGACTGCGCCGCTCCTCCCGGGGTGTTG
TGGGGGAGATGAATTAGCTAATATGGATAAAGAGCCTTTGATGATGACTGCTAAATGTGTGTACC
GTGTAATTGCCATTTTTCCCAAGAAAATGTTTCGTATTGTTACTAATTAGGCATTGTTGACGCACC
TCATGCCCATTTATTTACAGTTGTGCGTGCAATTAAGTGGCAGTGGGACCATTTCAAATGACATTT
ATTGCCAATTTCCCTGGTTTAAATTTTGGAAATTTATGGGAAGCCTGGGCATTGTTTCTTATTCAC
CGCAACTTAAATAATTAACAACGTAAATATGGCTTTGGGTAGTGAGATTGCAACACCCAGAGTTC
TTTAGAGATTTTAAATTAAGAACAGTGCAGCACATGAACTCCAGGGAAAATCTCATTATAGCAACCA
AGCAAGCCGAACGCTTCTTCTCTGTGAGTCTGTGGCTCCTTGTGCCTGAGTGCCTGTGCACGTG
TGTGTATGTGTTTACATGTGTGTGAGTCCAAGTGTGGCTTTGTGATCGAGTCCACGCGTA

>BBUMS005

ATGAACTCTTTATTGCCAACAGTTCAGACTTAAATTGCTCAAGGTAGCATCAGGAATTCCACAGAT
ATTCTGTGCTTTTACGTGACAGTCAAATTTAAAGAATCTG**ACACACACACTTACAC**AGGTAC
CAAACCTACACTGAGCCGTACCTTCAGGTACACACGTGGCTGCTTACACTCTCAGATGTCAGGTG
CATGCTGACATCGCACATCCACATGGTTACACTCATGGAGTCACACACAGAGACACCCATATATC
CTCACACAGCTACAGATGCAAACATAAATACTCACTGAGACACAACACACACATGCACACATA
TAGACAGGCATCAACCTGGAAGGAAACACAACCAAGACTTCTGCAGTGTATACCTGCCTTGGT
CTTGAGAACGAGCTTCTGAGGTGAGGTGCTGAGTACTATCCCTAATTTCTTCACTGCAATTTCCAA
TGCTACTTCTACACCCTGGATGCTTATTAAGTACGCTCCATTGCCAGATCAGGGGCTGATCGAG
TCCACGCGTAAG

Quadro 2 (continuação). Seqüências dos 32 microssatélites isolados em *Bubalus bubalis* que serão avaliados em uma população de búfalo de rio brasileira.

>**BBUMS017**

ATTCATAGGCACACACTCAGAATATATTCAACTCCCCTCTACATGCATCTAGATACATACACGTTT
ACACGATATACATATACTCACACGATACACATGTATTCTCCTGCGTTCTTATACAACATACACACC
CACATGTATGTTGCACACACACATGACTTCC**CACATTCACACACACACACACATTCACA**GATGT
GTACACAATTGCACACAATCACCCACATCCCTCCACATC

>**BBUMS018**

CACGCTATCACACACTCATCATTATATCTACATGTATGCACATT**CACACACACACACACA**AGCCT
GTTATGTCTGAAACACGTGAACAAAGTTCAAAGCTCTCGATGTTGCCAGACTTGTACGAACA
CCCCTGAGATTTTTCCATTACTTCTCAGGAAGCGAGGCACCTATGGCGGACCTGCCAGCTACG
TTCCCCTCCCTTCTTTCTCAGGAAGATGCTCCCCTCCAGAGAGCCATGGGAGAAGCCCAGGA
CATCTTGGGTGGGGAGCAGCCTTAATAGTTTCCCTAGGCCCTCACAAAGTTTAGATGGATGG
CATTTGATCGAGTCCACGCGTAAGCA

>**BBUMS019**

CTCGCTCTGAACAGATGAAACTCTAGAAGGAAAATAGACTCTCTCTAAT**CACACACACACACACA**
CACACACACACACACACACACACAAAACACCACCCAGGAATAAATAGTCCAGGACCAGAGT
GCTTCATTGGGAATTCTGGTAAGTATACAAAGAACTTGGCAACTATCTTTCTCGAACTATTCCAA
AAAAGTGAAGAAGAGAGAATACTCCCAAATTTATCCTATGGTACTACCATCACCCCTGATACAAAA
CTAGACAAAAGAACTACAAAAAAGAAAATGACAGTCCAGT

>**BBUMS020**

TTGCTTACGCGTGGACTCGATCCAAGATACAATTTATGAAAAGTGGGATTTCTGAGGAAGAAAC
TAAACTAATAGACAGTGGCAATAGTAAAGCAAAAATATGAGGAAATGTTCTTGAGGGAAGGTAG
TATGCACAA**ACACATACACACACATACAC**GTTTACACCTAAATAAATCCTGGAAGAAAAAGTCTA
GAAACAAAGGAGTAAAATCCACAAAATTCAGGGAGCCAAAATGGTATCAAGTTACATGTAAGA
TAAAATCAGCCTACCTTCACACTTGGCTTCAACAAACAAGATATATTT

>**BBUMS021**

GGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCTCTTGCTTA
CGCGTGGACTCTTTT**CTCTCTCTCTCTTTCTCTTTCTCTCTCTTTCTCTCTCTCTCTCT**CACTCT
CCTGCTATCTTCTAAATAAAATAGAGCTGTAACACTGATTTGCCTAAGAGCTGTAGCACAGTTTGT
CCAAGACCCAAGAGCTGTGACGTGCCGAGGGCTTTAATGTCCATCACTCCAAATCTTTGTTGTGA
CGAGACAAAGAACCAGGAACGTGCACTCGCGTGACATAAACAAGCAGCAAGTGAAAAGTGAAA
GTGAAGTTGCTCCATCGACTCCGACTGTAGTCCACCAGGCTCCTTTATCCATGGGATTTTACAGG
CAAGGGTACTGGAGTGAGTTGCCATTTCTTCTCCAGGG

>**BBUMS022**

GGCACACTGGGCTAGACCAGCCCTGACCTCACAGGAGGTACACTAACTCTCCCACACCTCCCCT
GCACTTCCGCATCTGCCTCCCTT**CTCTCTCTCTCTTTCTCTCTCTCTCTTTCTCTCTCTCTCTCT**
CTCTGTCTCTCTCTGTCTCTCTCTCTCTCTCGGTACAACAAGCTGAGGATGCTGTGTTCCATTTT
ACAGATAGCAAAGAAGGGCTCTGTATGATTAAGTGAAGTGAACCCGGTCACTTTGCTCTAAGTGGC
TGACCTAGCCTCTCTCTCTTTCCCAACCTAAGACAACCTGCACAGATGTCATTGCACTCCTGAAG
ATTCTGCATTCTTAGGCATACATGAAAAAATTCCTATCTCCACCCACCACCGCATCTATACAGGAG
AATTCTGGGGCTCTGGCACCCCTATGCGTGAATGCTATGCATGCTAAGTCACTTCAGTCATGTCT
GACTCTTTGCAACCCCATGGACTGCAGCCACCAGGGCTTTCTGTCCATAGGATTATCCAGGGA
AGAATACTGGAGTGGGTTGCTATGTCTCTCCTCCAGGGATTTCACCCAGGGACTGAACCCAA
GTCTTTAGGTCTCTCTGCACTGACAGGAGGTTCTTTACCCTAGCACCCACTTGAAGCCCTAAT
GCTCAGTAATTTCTCCCTTGTGTAATTGCTACATTTGCCCTT

Quadro 2 (continuação). Seqüências dos 32 microsátélites isolados em *Bubalus bubalis* que serão avaliados em uma população de búfalo de rio brasileira.

>**BBUMS023**

GGGAAGTGCAGGGACGGGGCAGAGTCATGACTGGCCAAGAGACGCTCTCGTCCATGAAAAGAA
TCCGGCTAGCCTTCTCAGGCACCTTAATCAGCCTGACATTCAGCTAAGAGCTTTATTTTTGCATCA
TATTCCTTCGACTATAACAGAAGCTATTAAGAAGTCATCGGCTCAGGTGACCCGAAGGCCAGG
GTTGGTCCCAAAGTGGCATGAACAGCCAAGTGGTGTCAATTGCG**CTCTCTGTCTCTTTCTCTCT**
CTGTCTCTGTTTCTCTTCTGTCCCTCAGTCTGCCTTTCTCTGTGTCTGTCACTCT

>**BBUMS024**

CCATCTCTGTCTCGTGTATATCACCTCTCTGAGTTTCTCTGTGTCTCTGCTT**CTCTCTCTCTCT**
CGTATGCTCAGAGGTATTTACGCTACATGGATGTTTGCACAGTGCTTTCACATCTGAGTTATCATC
TGGGATTTCTATCAGACTCCATCTGTTTCCAGAAGTGTGTGCAAACAGCTCAGAAAAGGGGGGAT
ATAAAGCATTTTAATTTGCTCTGACCTGAAAAACCGTAGGATCGAGTCCACGCGTAAGCAAAGA
AGCCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACT

>**BBUMS025**

CAGTCCTTGTGTTCATTGGAAGGACTGATGCTGAAGCTGAACTCCAATACTGTGGCCACCTC
AAGTGAAGAGTTGACTCACTGGAAAAGACCCTGATGCTGGGAGGGATTGGGGGCAGGAGGAGA
AGGGACAACAGAGGATAAGATGGCTGAATGGCATCACCGAATCGATGCACATGAGTTTGGGTGA
ACTCTGGGAGTTAGTGATGGACAGGGAGGCCTGGCGTGCTGCAATTCATGGGGTCACAAAGAGT
CAGACACGACTGAGCGACTGAACTGAACTGAATAGGAAATAGCATCCCTTAATAGGTAGTG**CAC**
ACACACACACAAACACACAAATTGGTTTCTAATATCTTAATAATTTGACTACATTCTTATGAAAA
AATGCTTTGCGATATTAGTAATGTGACAGTTCACCCAGAGAGAAAAACATATTGAGCTTTCTCAA
GACAGAAAGGAGGTCATAGCCACTCCAGAGAGTCAAAGATCGAGTCCACGC

>**BBUMS026**

AATCGGCTTCTCTTGCTTACGCGTGGACTCGATCGAAGCTGAGTCTCCTGCTTGGCAGGTGGAT
TCTTTATCACTGAGCCACCCGGGGTATTCTTGCCTGGAAAATCCCATGGACAGAGGAGCCTGAT
GTGCTGCAGTCCATGGGGTTGCAAAGAGTCAGACACAACCTTAGTGACTAAATAGTAATAACAATG
GCCTA**ACACACACACAC**CTATTTCTCCACAGACAACCTCTCACACAAACAAGCACACAATATAC
AAACTCGAAACACATACGTGCTGGTACTGCCAACCTCCAGAAAGGACCACCAGAACAGCTTGG
GCATCACACAGCCATGATCTTTCCCTGACCACAGTACAGACAACCTCCCCAGCCTGACCAACC
CCAGAAGTCTCAGAACGGGGAGACCAGGGCAGATACAAACATGGTTTTGGTGTCTGAGCTCAAT
TGGTTCAAGACTGAGCAGAGGGACTTCCCTGATGGTCCAGTGGCTAAGACTCTGCACTCCCAAC
GCAGGGGGCCTGGGTTCAACCCT

>**BBUMS027**

CATGATTATGAGAAACGTCCCGGGGATGTGGCGCTGCTGGGGGAATCGTCCCACT**GCCAGCC**
AGCCAGCCAGCCAGCCACCCTGTCTTCTGGTGGGGAAGTGTGGCCCGCTGCCAGGTGG
CAGTGGCTGGGATGGAGAGTCAGGCGG

>**BBUMS028**

ATACCAGACCTGAGGGGGTCTGGTCTGTGGAGGCAATATGCTGGATGGAAGGGCGCCACCATT
AGTCTAAACATGACTCAAGAAAACCCAAACACAGTTGAGCCCCTGAGGGTCTCGAGGCCCTG
GGGCAAGGAGCACCCACATTGGGTCAATTAAGTGTCTCCAAGAAAACCTCTACTAGTGGCTACTGG
GCTATAAGAGGCACACACCCCAATCTAGGTCACATTCAGATTTTAATTACACTAACCCACCTCC
CATCTAAATGGAGACATTCATCTAGTCAGGAGGGAGCTGGACTAGACTGGTAATGGAAGGAGTT
GTCACCCCTGTAGCATCCTTGGTGGCCTAGCACGAGAAGCAATTTATAAAGCCAAAGCTACTAA
AAAA**CAAAACAACAAACAACAAA**AAACGGCACTGGAACATTGGCCTGGGCACTAAAGAACC
CAGCTGTAACCTTAGAAATATGAAATCTTCACTGGGCCTCTGATCGAGTCCACGCGTAAGCAAAGA
GAAGCC

Quadro 2 (continuação). Seqüências dos 32 microssatélites isolados em *Bubalus bubalis* que serão avaliados em uma população de búfalo de rio brasileira.

>**BBUMS029**

TGTCTCCTAGAGTAATGGAAATAAAAAGCAAAAAGACACAAATGAGAGCTAATTAATGTAAAAGCT
TTTACACAACAAAAGAAACCATAAACAAAGCAAAAGACAATTTATGTAAGTGGGAGAAATTATTTGC
AAACAATGAAACTGACAAGGGAGTAATTTCCAAAATATACAAACAGCTCATAGAGCTCAGTTTTCAA
AA**CAAAACAACAAACAACAAACA**TAACCCAATCAAAAATGGGCAGAATACCTAAATAGAC
ATTTTTCCAAAGAGGAAATTCAGATGGCCAACAATCACACGAAAGGATGTTCAACATCTCTAAACA
TTAGGGAAATGGAAGTCAAAATCACAATGAGGGGCTTCCCTGGTGGTTAAGTGGTTAAGAATTGC
CTCAACGCAGAAACACTGGTCCGATCCCTAGCCTGGGAAGATTGAGTCCACGCGTAAGCAGAGA
AGCCGATTCCGACCTGCGCCGTAC

>**BBUMS030**

CGTGGACTCGCTCTTATCTCTGTGTGTCAGGACAGTCCCAGTGGCTTGCGTGTGCTGCTCCCAGGA
GGGGCCATGCCTTATTTATCTTCGTCTAGGGCGCTCACACTTCTGCAAGTTCGTGTGGCCTGGA
GTAAGT**CATTCAATTCATTCAATTCATTCAATTCATT**TCCAGACAGCTCATTGTTGGTGTGCGGGCACTGGACAT
GGTGTAGGGAGACAGTGAAGGGGCGAAACAGACAGAGAGTCCCGTCCAGGAAGCCCTCACAGC
ATCTGGTGAGACGGTCAGTGAGTTGCTGGAGCATCAAGTTCAGACACAGCCTCGCTGAGAAC
GCACACAACAGAGGACAGTGGATTGTGGCAGGGAGAGTGACAGAGCTTTGCTCAAGACGAAT
GGCCCCCTGAAGAAGGGTATTTGAGCAGTTTGGGGAGGTGGGGGTGTGAGGAAGCCCTTTCT
GTGTGGTCTTGAAGCATGTGGAGAATTTAGGCTACTGCCTTCCCTCTGTGAGCCAGCCGGCGT
CCAGGCGCCTGTGAGGTGCGCAGCAGCGCTCCTTTTGCACCAGGGGGCAGTGTTTTCCCTGC
AGGTCTGCACGTGTGCGTGCTAAGTCTCTTCAGCTGTGTCTGACTTTGTGAC

>**BBUMS031**

TAATCATGCTCGAGCGGCGCAGTGTGATTGGATATCTGCAGAATTCGGCTTCTCTTGCTTACGCG
TGACTCGATCAGGCCCCAGGAACGGCTGGGAGGCCTGAATGAGCTTCTGGGCACTAGATACGC
TGCAGGCGCTGGCCACCCCAAGTGGCCTGAGCTCTGAGCATGAGAAAAATCTGAAGGCCTATGT
TTCGTTTCATGTGCAACAGCCATCAGAGGAGGAAGCGTGACTTGGCTCAAATGAGTGCCATTATCC
AGGCATCTTGCTTCTGGACCAAAGTAGTAACCTTTCTGCTGCTCCTTGGGGTCTGCTGCTCCG
G**AGGAGGAGGAGGAGGAGG**TGCAGAGGCAGGAGCAGGAGGATGGGTTGGGACGAGGGCACA
GGATGGGTGCTGGTTGACCCAGAAGGAAGTGTGGTACTGGGCAACTGGCAGGCTCCAAAGGCA
CAGCTTAGTAAAGTCCAGGCAGGGGCACACCTGTGAGTGTACAGCCATGACTTTGTGTGTCTA
CTTCAGGCCTGGATCTAAGGAGGAGGAGCTCTGAAACCTCTAAGTCAGGAATGACCAGAGACAG
TACACCAGAGCAGTCTCGGGAGACAGTTATTGTTGTAATGT

>**BBUMS032**

CTGGGGACATGGGGTCTGAGGGGGACATTGGAGCAGGCGGTGGTGGTGGGGTCTCGGCAGC
CCCTGCGGCGCTCCATCTCCGGCAGCCGCTCCGAGAATGTCTTGAGCCGCTGTCTCTCACGG
CGGTGCCAACGGCTTCCATGAAGACGGACCCCTGGGCCACATGGGGATG**AGGAGGACGAT**
GAGGAGGAGGAGGAAGAGGAGGAGGAGGACACGGACAAGCTGCTGAACTCGGCCAGGTGAG
GCAGGGCCAGGCTGGGAGCCGAGAAAACCCAGAGGAGGCAAACGAGTCAGGATAAGCCAG
GGCCCGGAGTGAACGGCCCTCTGCACCCAGACCTCCCACCCCTGCCTGAGGTTCCATCCTGC
CCTTCCAGGTCTTCCAGCCTGGGTGGGGTCAAGGGGCTGATCGAGTCCACGCGTAA

Neste estudo, foram construídos pares de *primers* para os 10 primeiros microssatélites isolados, ou seja, para os microssatélites BBUMS001 a BBUMS010. Para o desenho dos *primers forward* e *reverse* foi utilizada a seqüência total do inserto. O *primer forward* foi desenhado a partir da seqüência da região

flanqueadora anterior ao microssatélite e o *primer reverse* a partir da seqüência da região flanqueadora posterior ao microssatélite.

Na tabela 3 encontram-se descritos os parâmetros utilizados para construção dos *primers* dos 10 microssatélites em relação à temperatura de *melting*, porcentagem de GC, tamanho de cada oligonucleotídeo, seqüência do *primer forward* e *reverse* e tamanho esperado do fragmento gerado pela amplificação com os *primers* desenhados.

Tabela 3. Dados referentes aos pares de *primers* para PCR desenhados para 10 microssatélites isolados neste estudo (seqüência dos *primers*, temperatura de *melting*, tamanho do oligonucleotídeo, porcentagem de GC e tamanho esperado do produto de PCR após amplificação).

Microssatélite	Seqüência dos pares de <i>primers</i> (5'→3')	Primer Forward			Primer Reverse			Tamanho esperado do produto de PCR (bp)
		Tamanho	T _m [#]	%GC	Tamanho	T _m [#]	%GC	
BBUMS001	F- ACCACAGTTCCTGGGCGAG R-CACAAGGCTGCACACCACAC	19	60°C	63%	20	60°C	60%	151bp
BBUMS002	F- CCTGAAGGGCTACAGTCCATG R- GCCCTGTTTCCCTTCCTTG	21	58°C	57%	19	58°C	58%	158bp
BBUMS003	F- CTGAGTGTCTGCAAGCCCTG R- TGGACTTCTATGTATTTATGTGGTGTCTC	20	58°C	60%	29	59°C	38%	151bp
BBUMS004	F- ACTCGATCTTGCATTGCACT R- GCAGTCATCATCAAAGGCTCTTT	21	59°C	48%	23	59°C	43%	171bp
BBUMS005	F- CGTGACAGTCAAACCTTATAAAGAATCTG R- TGAAGGTACGGCTCAGTGTAGGT	29	59°C	34%	23	59°C	52%	77bp
BBUMS006	F- GAACAAAACAGACCTGGTCTCATG R- TTTTATTCTCACCTTACCTTGCACTTAT	24	59°C	46%	28	58°C	32%	151bp
BBUMS007	F- GAAGCAAGCATGGCCACAG R- CAAAATGGAAACAACACATATAAAGCA	19	59°C	58%	27	59°C	30%	251bp
BBUMS008	F- AGTCCAGAGATGAGAACAAAATTTAATAAA R- CTTACGCGTGGACTCGATCA	30	58°C	27%	20	58°C	55%	301bp
BBUMS009	F- AACCCCGTCGACCCAATAT R- CCCAGGTCAGAGGTGAGTG	20	59°C	55%	20	59°C	65%	81bp
BBUMS010	F- GCCTGTGTGGTCTCTTGAT R- CGTGGACTCAAGCACACT	20	60°C	55%	20	60°C	55%	151bp

*F: seqüência forward;R:seqüência reverse

[#]T_m: temperatura de *melting*

4.2.2 Otimização das condições de PCR (concentrações de MgCl₂ e temperatura de anelamento)

Apesar de terem sido construídos pares de *primers* para 10 microssatélites isolados no trabalho, somente 4 tiveram suas condições de amplificação otimizadas (BBUMS001, BBUMS002, BBUMS003 e BBUMS004).

A figura 12 mostra o produto de PCR único obtido com o microssatélite BBUMS001. As reações foram realizadas nas seguintes condições de amplificação: temperatura de anelamento 70°C e concentração de MgCl₂ 1,5mM. As reações de PCR foram feitas em duplicatas para garantir a visualização do produto de PCR.

As reações de PCR foram visualizadas em gel de agarose a 2% para confirmação de amplificação dos microssatélites avaliados (Figura 12).

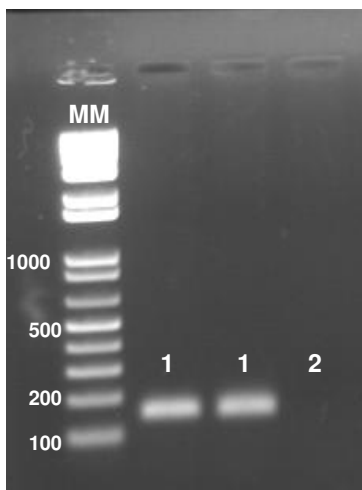


Figura 12. Reações de PCR para o microssatélite BBUMS001. Eletroforese em gel de agarose a 2% (brometo de etídio). **1:** Reações de PCR nas condições citadas a cima; **2:** controle da reação (branco); **MM:** marcador molecular 1Kb.

A tabela 4 apresenta as condições de PCR para os quatro microssatélites avaliados no trabalho.

Tabela 4. Padronização das reações de PCR para os quatro locos avaliados (concentração de MgCl₂ e respectivas temperaturas de anelamento).

NOME DO MICROSSATÉLITE	CONCENTRAÇÃO DE MgCl₂	TEMPERATURA DE ANELAMENTO
BBUMS001	1,5mM	70°C
BBUMS002	0,8mM	69°C
BBUMS003	1,5mM	69°C
BBUMS004	1,8mM	64°C

Os microssatélites isolados neste trabalho serão ferramentas importantes para auxiliar em investigações moleculares em búfalo de rio, uma vez que poderão ser utilizados em futuros estudos de mapeamento de ligação e na avaliação molecular de diversidade e variabilidade genética de rebanhos de *Bubalus bubalis* no Brasil, auxiliando na elaboração de estratégias de conservação e manejo de populações para preservação das fontes genéticas de búfalos existentes no Brasil.

Conclusões



A partir dos resultados obtidos neste trabalho, concluiu-se que:

- A metodologia de construção de bibliotecas genômicas parciais enriquecidas com microssatélites por meio da estratégia de hibridização seletiva para búfalo de rio mostrou uma eficiência de 11,84% no isolamento de microssatélites;
- Cento e treze microssatélites foram isolados e caracterizados estruturalmente para a espécie *Bubalus bubalis*;
- Os microssatélites mais abundantes isolados apresentaram unidades de repetição dinucleotídica (CA: 64 microssatélites e CT: 30 microssatélites);
- Dos 113 microssatélites isolados, 97 (85,84%) apresentaram menos de 10 unidades de repetição, confirmando a dificuldade de isolamento de microssatélites longos;
- Foram desenhados pares de *primers* para PCR de 10 microssatélites dos quais quatro tiveram as reações de PCR otimizadas quanto à temperatura de anelamento de concentração de MgCl₂.

Referências Bibliográficas



ALBUQUERQUE, M.S.M. et al. Conservação e caracterização de búfalos no Brasil: uma revisão da literatura. **Documentos Embrapa**, v.166, p.1-33, 2006.

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.

AMOS, W. A comparative approach to study the evolution of microsatellites. In: **Microsatellites – Evolution and Applications**. Oxford University Press, 1999, pp.60-79.

ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA (ANUALPEC). **INP**, 2005, 369p.

ARIGONI, S; LARGIADÈR, C.R. Isolation and characterization of microsatellite loci from the ocellated wrasse *Symphodus ocellatus* (Perciformes: Labridae) and their applicability to related taxa. **Molecular Ecology**, v.9, p.2166-2169, 2000.

BARATTI, M. et al. Polymorphic microsatellites developed by cross-species amplifications in common pheasant breeds. **Animal Genetics**, v.32, p.222-225, 2001.

BARKER, J.S.F. et al. Genetic diversity of asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): microsatellite variation and a comparison with protein-coding loci. **Animal Genetics**, v.28, p.103-115, 1997.

BENNET, P. Demystified... microsatellites. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology**, v.53, p.177-183, 2000.

BLOTT, S.C.; WILLIAMS, J.L.; HALEY,C.S. Genetic relationships among European cattle breeds. **Animal Genetics**, v.29, p. 273-282, 1998.

BULFIELD, G. Strategies for the Future. **Poultry Science**, v.76, p.1071-1074, 1997.

BUSCHIAZZO, E.; GEMMELL, N.J. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. **BioEssays**, v.28, p.1040-1050, 2006.

CARMICHAEL, L.E.; CLARK, W.; STROBECK, C. Development and characterization of microsatellite loci from lynx (*Lynx canadensis*), and their use in other felids. **Molecular Ecology**, v.9, p.2197-2198, 2000.

CHAMBER, G.K.; MCAVOY, E.S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B - Biochemistry & Molecular Biology**, v.126, p.455-476, 2000.

CHUNG, H.Y. et al. Isolation and characterization of the bovine microsatellite loci. **Biochemical Genetics**, v.44, p.527-541, 2006.

COCKRILL, W.R. The water buffalo: a review. **British Veterinary Journal**, v. 137, p.8-16, 1981

CPATU Embrapa: Rebanho Bubalino. Amazônia Oriental. Disponível em: <<http://www.cpatu.embrapa.br/Bufalo/bufalo.htm>>. Acesso em: 05 jun. 2007.

DIB, C. et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. **Nature**, v.380, p.149-152, 1996.

EGGERT, L.S. et al. Polymorphic microsatellite DNA markers in the African elephant (*Loxodonta africana*) and their use in the asian elephant (*Elephas maximus*). **Molecular Ecology**, v.9, p.2223-2225, 2000.

ELLEGREN, H. Microsatellite mutations in the germ line: implications for evolutionary inference. **Trends in Genetics**, v.16, n.12, 2000.

ELLEGREN, H. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. **Nature Genetics Reviews**, v.5, p.435-445, 2004.

EL NAHAS, S.M. et al. Assignment of new loci to river buffalo chromosomes confirms the nature of chromosomes 4 and 5. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.116, p.21-28, 1999.

ESTOUP, A. et al. Characterization of (GT)_n e (CT)_n microsatellite in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. **Nucleic Acids Research**, v.21, n.6, p.1427-1431. 1993.

FITZSIMMONS, N.N.; MORITZ,C.; MOORE, S.S. Conservation and dynamics of microsatellites loci over 300 million years of marine turtle evolution. **Molecular and Biology Evolution**, v.12, n.3, p.432-440, 1995.

FOOD AND AGRICULTURE OF THE UNITED NATIONS (FAO). In: Water buffalo: an asset undervalued. 2000. Disponível em: <http://aphca.org/publication/files/w_buffalo.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2007.

FREEMAN, A.R. et al. Combination of multiple microsatellite data sets to investigate genetic diversity and admixture of domestic cattle. **Animal Genetics**, v.37, p.1-9, 2005.

GARCIA, J.E. et al. Identification of microsatellites DNA markers for the giant anteater *Myrmecophaga tridactyla*. **Journal of Heredity**, v.96, n.5, p.600-602, 2005.

GEORGE, M. et al. Conservation and management of buffalo genetic resources of India. In: **Buffalo Production and Health**, ICAR, 1988, pp. 31-37.

GIBBS, M. et al. Chicken microsatellite markers isolated from libraries enriched for simple tandem repeats. **Animal Genetics**, v.28, n.6, p.401-417, 1997.

GIZAW, S. et al., Population structure, genetic variation and morphological diversity in indigenous sheep of Ethiopia. **Animal Genetics**, v.38, p.621-628, 2007.

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

GOLDSTEIN, D.B.; POLLOCK, D.D. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic interference. **Journal of Heredity**, v.88, p.335-342, 1997.

GRANEVITZE, Z. et al. Genetic diversity within chicken populations from different continents and management histories. **Animal Genetics**, v. 38, p.576-583, 2007.

GREENBERG, S.J. et al. Novel compound tetra-, dinucleotide microsatellite polymorphism in the tumor necrosis factor/lymphotoxin locus. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.4, n.1, p.79-84, 1997.

GUILLEMAUD, T. et al. Microsatellite characterization in the rainbow wrasse *Coris julis* (Pisces: Labridae). **Molecular Ecology**, v.9, p.629-644, 2000.

HALL, T.A. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98, 1999.

HARR, B. et al. Conservation of locus specific microsatellite variability across species: a comparison of two *Drosophila* sibling species *D. melanogaster* and *D. simulans*. **Molecular Biology and Evolution**, v15, p.176-784, 1998.

HANCOCK, J.M. Simple sequence and the expanding genome. **BioEssays**, v.18, p.421-425, 1996.

HEDRICK, P.W. (2005) **Genetics of populations**. 3^a Ed, Jones and Barlett Publishers: Editores, 2005, 737p.

HUANG, Y. et al. Characterization of 35 novel microsatellite DNA markers from the duck (*Anas platyrhynchos*) genome and cross-amplification in other birds. **Genetics Selection Evolution**, v.37, p.455-472, 2005.

IANELLA, P. et al. First radiation hybrid map of the river buffalo X chromosome (BBUX) and comparison with BTAX. **Animal Genetics**, *in press*.

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

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. **Cytogenetic and Genome Research**, v.102, p.65-75, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa Pecuária Municipal (PPM), 2006. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=20&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1>>. Acesso em: 11 fev. 2008.

JIN, L. et al. Mutation rate varies among alleles at a microsatellite locus: phylogenetic evidence. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.93, p.15285-15288, 1996.

KANDPAL, R.P.; KANDPAL, G.; WEISSMAN, M. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-

specific markers. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.91, p.88-92, 1994.

KARP, A.; EDWARDS, K.J. DNA markers: a global overview. In: **DNA markers: protocols, applications, and overviews**. WILEY-VCH, 1997, 1-159p.

KASHI, Y.; KING, D.; SOLLER, M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. **Trends in Genetics**, v.13, p.74-78, 1997.

KIERSTEIN, G. et al. Analysis of mitochondrial D-loop region casts new light on domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) phylogeny. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.30, p.308-324, 2004.

KIJAS, J.M. et al. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. **Biotechniques**, v.16, p.656-662, 1994.

KIM, K.-S. et al. Cross-species amplification of bovidae microsatellites and low diversity of the endangered korean goral. **Journal of Heredity**, v.95, n.6, p.521-525, 2004.

KRUGLYAK, S. et al. Distribution and abundance of microsatellites in the yeast genome can be explained by a balance between slippage events and point mutations. **Molecular and Biology Evolution**, v.17, p.1210-1219, 2000.

KRUGLYAK, S. et al. Equilibrium distribution of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.95, p.10774-40778, 1998.

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

KUMAR, S. et al. Mitochondrial DNA analyses of Indian water buffalo support a distinct genetic origin of river and swamp buffalo. **Animal Genetics**, v.38, p.227-232, 2007.

LAGERCRANTZ, U.; ELLEGREN, H., ANDERSSON, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. **Nucleic Acids Research**, v.21, p.1111-1115, 1993.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular and Biology Evolution**, v.4, n.3, p.203-221, 1987.

LI, Y.-C. et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p.2453-2465, 2002.

LI, M.-H. et al. The genetic structure of cattle populations (*Bos taurus*) in northern Eurasia and the neighbouring Near Eastern regions: implications for breeding strategies and conservation. **Molecular Ecology**, v. 16, p.3839-3853, 2007.

MARIANTE, A.S.; EGITO, A.A. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. **Theriogenology**, v.57, p. 223-235, 2002.

MARQUES, J.R.F. et al. Conservation of genetic resources of the small populations of domestic animal of the Amazon Region in Brazil. **Animal Genetic Resources Information**, v. 33, p. 31-40, 2003.

MATEUS, J.C. et al. Genetic diversity and differentiation in portuguese cattle breeds using microsatellites. **Animal Genetics**, v.35, p.106-113, 2004.

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

MOORE, S.S. et al. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primers pairs in closely related species. **Genomics**, v.10, p.654-660, 1991.

MOREIRA, P.; COSTA, A.L.; VALENTIN, J.F. Comportamento produtivo e reprodutivo de bubalinos mestiços Murrah-Mediterrâneo em pastagens cultivadas em terra firme, no Estado do Acre. **Embrapa-CPAF**, p.19, 1994.

MOXON, R.; WILLS, C. DNA microsatellites: agents of evolution? **Scientific American**, v.280, p.94-99, 1999.

NAUTA, M.J; WEISSING, F.J. Constrains on allele size at microsatellite loci: implications for genetic differentiation. **Genetics**, v.143, p.1021-1032, 1996.

NAVANI et al. A set of cattle microsatellite DNA markers for genome analysis of riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Genetics**, v.33, p.149-154, 2002.

OLLIVIER, L.; WREDE, J.; DISTL, O. An overview of the genetic resources of pigs in their management and conservation. In: **Pig genetic resources in Europe: characterization and conservation**. EAAP: Wageningen, 2001, 5-14p.

OLIVEIRA, E.J. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.2, p.294-307, 2006.

PRIMMER, C.R.; MOLLER, A.P.; ELLEGREN, H. A wide range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. **Molecular Ecology**, v.5, p.365-378, 1996.

QI, L.; AKIHIRO, K. Sequences characterization of microsatellite DNA sequences in pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). **Journal of Ocean University of China**, v.6, n.1, p.47-52, 2007.

RASSMANN, K.; SCHLÖTTERER, C., TAUTZ, D. Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase in chain reaction-based DNA fingerprinting. **Electrophoresis**, v.12, p. 113-118, 1991.

RITZ, L.R. et al. Phylogenetic analysis of the tribe bovini using microsatellites. **Animal Genetics**, v.31, p.178-185, 2000.

ROSE, O.; FALUSH, D. A threshold size for microsatellite expansion. **Molecular Biology and Evolution**, v.15, p.613-615, 1998.

RUBINSZTEIN, D.C. et al. Microsatellite evolution-evidence for directionality and variation in rate between species. **Nature Genetics**, v.10, p.337-343, 1995.

SANCRISTOBAL, M. et al. Genetic diversity within and between European pig breeds using microsatellite markers. **Animal Genetics**, v.37, p.189-198, 2006

SANTOS, M.S. et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* – Threskiornithidae-Aves). **Molecular Ecology Notes**, v.5, p.1-3,2005.

SCHLÖTTERER, C.; AMOS, B.; TAUTZ, D. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. **Nature**, v.354, p.63-65, 1991.

SCHLÖTTERER, C. Are microsatellites really simple sequences? **Current Biology**, v.8, p.R132-R134, 1998.

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosome**, v.109, p.365-371, 2000.

SECONDARY GUIDELINES FOR DEVELOPMENT OF NATIONAL FARM ANIMAL GENETIC RESOURCES MANAGEMENT PLANS. **FAO-UNEP**, 1998, 219p. Disponível em: <<http://dad.fao.org/en/refer/library/guidelin/marker.pdf>>.

SENA, L. et al. Polymorphisms in MHC-*DRA* and *-DRB* alleles of water buffalo (*Bubalus bubalis*) reveal different features from cattle DR alleles. **Animal Genetics**, v.34, p.1-10, 2003.

SENO, L.O.; CARDOSO, V.L.; TONHATI, H. Responses to selection for milk traits in dairy buffaloes. **Genetics and Molecular Research**, v.5, n.4, p.790-796, 2006.

SILVA, M.S.T. et al. Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores (PRONAF-PARÁ). **CPATU-EMBRAPA**, p.1-35, 2003. Disponível em: <http://www.cpatu.embrapa.br/Bufalo/paginas/pronaf_bufalos.doc>. Acesso em: 06 jun. 2007.

SLATE, J. et al. Bovine microsatellite loci are highly conserved in red deer (*Cervus elaphus*), sika deer (*Cervus nippon*) and soay sheep (*Ovis aries*). **Animal Genetics**, v.29, p.307-315, 1998.

SODHI, M. et al. Genetic diversity and structure of two prominent zebu cattle breeds adapted to the arid region of India inferred from microsatellite polymorphism. **Biochemistry Genetics**, 2008. DOI 10.1007/s10528-007-9135-5.

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

STALLINGS, R.L. et al. Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. **Genomics**, v.10, p.807-815, 1991.
STRASSMANN, J.E. et al. Trinucleotide microsatellite loci for a social wasp, *Polistes*. **Molecular Ecology**, v.6, p.97-100, 1997.

SUBRAMANIAN, S. et al. Triplet repeats in human genome: distribution and their association with genes and other genomic regions. **Bioinformatics**, v.19, n.5, 2003a.

SUBRAMANIAN, S.; MISHRA, R.K.; SINGH, L. Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: their abundance and diversity in specific genomic regions. **Genome Biology**, v.4, 2003b.

SUN, H.S.; KIRKPATRICK, B.W. Exploiting dinucleotide microsatellites conserved among mammalian species. **Mammalian Genome**, v.7, p.128-132, 1996.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology**, v.15, n.5, p.199-203, 2001.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v.17, n.16, p.6463-6471, 1989.

TAYLOR, J.S. et al. The death of a microsatellite: a phylogenetic perspective on a microsatellite interruptions. **Molecular Biology and Evolution**, v.16, p.567-572, 1999.

TÓTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, v.10, p.967-981, 2000.

TOZAKI, T et al. Isolation, characterization and chromosome assignment of 341 newly isolated equine microsatellite marker. **Animal Genetics**, v.35, p.462-504, 2004.

TOZAKI, T. et al. Improved resolution of the comparative horse-human map: investigating markers with *in silico* and linkage mapping approaches. **Gene**, v.392, p.181-186, 2007.

VAN HOOFT, W.F. et al. Applicability of bovine microsatellite markers for population genetic studies on african buffalo (*Syncerus caffer*). **Animal Genetics**, v.30, p.214-220, 1999.

WALDER, R.Y. et al. Short tandem repeat polymorphic markers for the rat genome from marker-selected libraries. **Mammalian Genome**, v.9, p.1013-1021, 1998.

WEBER, J.L. Informativeness of human (dC-dA)_n(dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**, v.7, p.524-530, 1990.

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

XU, X. et al. The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. **Nature Genetics**, v.24, p.396-399, 2000.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p.1-16, 2002.

ZHANG, Y. et al. Genetic diversity and differentiation of Chinese domestic buffalo based on 30 microsatellite markers. **Animal Genetics**, v. 38, p.569-575, 2007.

ZHU, Y., STRASSMANN, J.E.; QUELLER, D.C. Insertions, substitutions, and origin of microsatellites. **Genetical Research**, v.76, p.227-236, 2000.

ZUCOLOTO, R.B.; VERDADE, L.M.; COUTINHO, L.H. Microsatellite DNA library for *Caiman latirostris*. **Journal of Experimental Zoology**, v.294, p.346-351, 2002.

ZOU, F. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci from forest musk deer (*Moschus berezovskii*). **Zoological Science**, v.22, p.593-598, 2005.

Apêndice

*Artigo publicado na Revista Internacional *Italian Journal of Animal Science*
Volume 6, suplemento 2, p.338-341, 2007. ISSN on-line: 1828-051X;
impresa: 1594-4077.





Microsatellite loci isolation from river buffalo using enriched partial genomic libraries

Larissa Paola Rodrigues Venancio¹, M. Elisabete J. Amaral¹, M. Paula C. Schneider²,
Artur L. Silva²

¹UNESP – Universidade Estadual Paulista, IBILCE, Depto. Biologia, São José do Rio Preto, SP, Laboratório de Genômica Comparativa, 15054-000, Brazil.

²Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Laboratório de Polimorfismo de DNA - LPDNA, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil.

Corresponding author: Larissa Paola Rodrigues Venancio, Universidade Estadual Paulista (UNESP – São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil). E-mail: larissa_biorp@yahoo.com.br

ABSTRACT - The extensive use of buffalo in agriculture, especially in developing countries, begs for genetic resources to evaluate and improve traits important to local and regional economies. Brazil presents the largest water buffalo populations in the New World, with 1.1 million heads including swamp and river types. To design rational breeding strategies for optimum utilization and conservation of available genetic variability in the Brazilian buffalo's population, it is essential to understand their genetic architecture and relationship among various breeds. This depends, in part, on the knowledge of their genetic structure based on molecular markers like microsatellites. In the present study, we developed six enriched partial genomic libraries for river buffalo using selective hybridization methods. Genomic DNA was hybridized with six different arrays of repeat motif, 5' biotinylated - (CA)₁₅, (CT)₁₅, (AGG)₈, (GAAA)₈, (GATA)₈, (AAAAC)₈ – and bound to streptavidin coated beads. The cloning

process generated a total of 1824 recombinant clones. Up to date, 487 were directly sequenced for the presence of repeats, from which 13 have been positive for presence of repeats as follows: 9 for di-nucleotide repeats, 3 for tri-nucleotide repeats and 1 for tetra-nucleotide repeat. PCR primer pairs for the isolated microsatellites are under construction to determine optimum annealing temperature. These microsatellites will be useful for studies involving phylogenetic relationships, genome mapping and genetic diversity analysis within buffalo populations worldwide.

Key words: Microsatellites isolation, enriched partial genomic libraries, river buffalo.

INTRODUCTION

The water buffalo (*Bubalus bubalis*) contributes immensely to the agricultural economy through milk, meat, hides and draught power (Kumar *et al.*, 2006). There are about 158 million buffaloes in the world and a larger part of the human population depends on domestic river buffalo than on any other livestock species in the world (FAO & UNEP, 2000). Scientific resources are limited in many of the countries where buffalo are economically important livestock and as a consequence genome research has not been supported at the level of some of the other species (Womack, 2005). During the nineteenth and twentieth centuries water buffalo were imported into Brazil and population have increased so greatly that Brazil maintains the largest river buffalo population in the Americas (Sena *et al.*, 2003). There are approximately 1.1 million buffaloes in Brazil, including swamp (Carabao breed) and river types (Murrah, Jafarabadi, Mediterranean breeds) (ANUALPEC, 2006). To design rational breeding strategies for optimum utilization and conservation of available genetic variability in

the Brazilian buffalo's population, it is essential to understand their genetic architecture and relationship among various breeds. This depends, in part on the knowledge of their genetic structure based on molecular markers like microsatellites (Gonçalves *et al.*, 2006). Microsatellites or simple sequence repeats (SSRs) are tandemly repeated motif of 1-6 bases pairs found in all eukaryotic and prokaryotic genomes present in coding and noncoding regions (Tóth *et al.*, 2000). Microsatellites are powerful genetic markers and extremely valuable for genome mapping, forensic DNA studies, paternity testing, population genetics and conservation/management of biological resources (Jarne and Lagoda, 1996). Microsatellites loci can be isolated *de novo* from an specie of interest or utilized for related specie in which it has been previously characterized. This strategy of using a particular microsatellites in different but related species saves time in the genetic analysis process. However, several studies using this strategy has described a decrease in the PIC (Polymorphism Information Content) and an increase of null alleles in the population. Considering this scenario, in the present study we developed six enriched partial genomic libraries using selective hybridization methods for microsatellites isolation from river buffalo.

MATERIAL AND METHODS

Six enriched microsatellite libraries for *Bubalus bubalis* were constructed and screened, using modified protocols described by Gautschi *et al.*, 2000 and Guillemaud *et al.*, 2000. Genomic DNA was digested overnight at 37°C with *Sau3AI* restriction enzyme (Amersham Bioscience). The resulting fragments were separated using agarose gel eletrophoresis. Those fragments ranging from 300 to 1000 bp were purified using *DNA GFX PCR Purification Kit* (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions, and

ligated at 16°C overnight into *Sau3AI* adaptors (AdapF: 5'CTCTTGCTTACGCGTGGACTC3' / AdapR: 5'GATCGAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACAA3') using T4 DNA ligase at 16°C overnight. After denaturation, single-strand DNA fragments were enriched for microsatellites by hybridization with 5'-biotinylated, 3'-aminated (CA)₁₅, (CT)₁₅, (AGG)₈, (GAAA)₈, (GATA)₈, (AAAAC)₈ oligonucleotides bound to streptavidin-coated magnetic beads (Dynabeads M-280 streptavidin, Dynal Biotech-Invitrogen). Each set of fragments captured by the probes were eluted in 100µL TE buffer prior to the PCR amplification using adaptor-specific primers (AdapF). The size-selected fragments were cloned into pCR2.1 by using the TA cloning kit (Invitrogen). The resulting colonies were grown ~5 hours in liquid media and used as templates for PCR by using vector primers. PCR product was used for DNA sequencing by using standard protocols of the *DYEnamicTMET Dye Terminator Kit (GE Healthcare)*. Sequencing reactions were analyzed by using the capillary sequencer MegaBACE 1000 (Amersham Bioscience). The sequences were edited and aligned using BIOEDIT software (Hall, 1999) for primer design.

RESULTS AND DISCUSSION

The cloning process generated a total of 1824 recombinant clones. Up to date, 487 (26.7%) clones were directly sequenced for the presence of repeats, from which 13 (2.66%) have been positive follows: 9 for di-nucleotide repeats, 3 for tri-nucleotide repeats and 1 for tetra-nucleotide repeats. Microsatellites are classified as perfect, imperfect, interrupted or composite according with the type of the repeat sequence (Oliveira *et al*, 2006). Among the isolated microsatellites, seven were classified as perfect with the repeat sequence not interrupted by any base different from the motif (*e.g.*

CACACACACACACACACACACA) (**Fig.1**). Three were classified as interrupted, since we found a small no match sequence of 3 to 4 nucleotides within the repeated motif (*e.g.* CACACACACTTACACA). Three microsatellites were considered imperfect, because we found a pair of bases no match inside of the repeated motif (*e.g.* TGTGTGCCTTGTGTG). PCR primer pairs for all isolated microsatellites are under construction. Although, the results are still preliminary, the selected microsatellites will be useful for studies involving phylogenetic relationships, genome mapping and genetic diversity analysis within river buffalo populations worldwide. Considering that only 26.7% of the total clones were screened from the library and characterized, we verified that the library construction was successful regarding the identification of new microsatellites for this specie.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) (proc. FAPESP 06/54618-1). We are grateful to Dr. Evonnildo C. Gonçalves for his important suggestions and M. Silvanira R. Barbosa and Soraya S. Andrade for their technical assistance.

REFERENCES

ANUALPEC (Anuário da Pecuária Brasileira). 2006. Instituto FNP, São Paulo. pp.369p.

FAO & UNEP. 2000. Water buffalo: as asset undervalued. <http://www.alpha.org/publications/files/w_buffalo.pdf>.

Gautschi, B., Widmer, A., Koella, J. 2000. Isolation and characterization of microsatellites loci in the dice snake (*Natrix tessellata*). *Molecular Ecology* 9:2191-93.

Gonçalves, E.C., Silva, A., Barbosa, M.S.R., Schneider, M.P.C. 2004. Isolation and characterization of microsatellite loci in Amazonian red-handed howlers *Alouatta belzebul* (Primates, Platyrrhini). *Molecular Ecology* 4: 406-408.

Guillemaud, T., Streiff, R., Serrão-Santos, R. *et al.* 2000. Microsatellite characterization in the rainbow wrasse *Coris julis* (Pisces: Labridae). *Molecular Ecology* 9: 631.

Hall, T.A. 1999. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.

Jarne, P., Lagoda, P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol* 11:424-429.

Kumar, S., Gupta, J., Kumar, N., *et al.* 2006. Genetic variation and relationships among eight Indian riverine buffalo breeds. *Molecular Ecology* 15:593-600.

Oliveira, E. J., Pádua, J.G., Zucchi, M.I., *et al.* 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetic and Molecular Biology* 29: 294-307.

Sena, L.; Schneider, M.P.C.; Brening, B. *et al.* 2003. Polymorphisms in MHC-DRA and -DRB alleles of water buffalo (*Bubalus bubalis*) reveal different features from cattle DR alleles. *Animal Genetics* 34 (1):1-10.

Tóth, G., Gaspari, Z., Jurka, J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 10(7):967-81.

Womack, J.E. 2005. Advances in livestock genomics: opening the barn door. *Genome Research* 15(12): 1699-705.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)