



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

*Campus São Gabriel*

CARACTERIZAÇÃO E COMPARAÇÃO CITOGENÉTICA DOS  
BUBALINOS CARABAO, MURRAH E TIPO BAIO

Rejane Boschmann Reimche

2010

**REJANE BOSCHMANN REIMCHE**

**CARACTERIZAÇÃO E COMPARAÇÃO CITOGENÉTICA DOS  
BUBALINOS CARABAO, MURRAH E TIPO BAIO**

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa — UNIPAMPA, *Campus* São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Analía del Valle Garnero

**São Gabriel**

**2010**

**REJANE BOSCHMANN REIMCHE**

**CARACTERIZAÇÃO E COMPARAÇÃO CITOGENÉTICA DOS  
BUBALINOS CARABAO, MURRAH E TIPO BAIO**

Monografia submetida à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Monografia defendida e aprovada em: 14 de julho de 2010.

Banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Analía del Valle Garnero

Orientadora

UNIPAMPA

---

Prof. Dr. Ricardo José Gunski

UNIPAMPA

---

Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo

UNIPAMPA

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, à Deus, por trazer paz e tranquilidade durante os momentos difíceis e conceder-me constantemente à força e persistência para a conquista de minhas realizações.

A todos meus familiares, especialmente meus pais e meu irmão, pela ajuda, compreensão e incentivo que sempre me deram.

À minha orientadora, Professora Dr<sup>a</sup> Analía del Valle Garnero e ao Professor Dr. Ricardo José Gunski pela confiança, dedicação, paciência e ao incentivo.

Ao meu amigo, colega de pesquisa, Tiago Degrandi pelo companheirismo, ajuda de todos os momentos, pelo esforço e determinação.

Aos demais colegas do Grupo de Pesquisa, Jean, Verônica, Lilian, Mariana e Rafael, pelo auxílio e colaboração na pesquisa deste trabalho.

Aos pesquisadores da Embrapa Amazônia Oriental, Cíntia Marcondes e Ribamar Marques, pelo envio das amostras sanguíneas e colaboração para a pesquisa de Citogenética de Bubalinos.

A pesquisadora Maria Cecília Damé, da Embrapa Clima Temperados pela disponibilidade em colaborar para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo Mario Ledesma por ensinar a usar programas de computador úteis para a realização do trabalho e pela ajuda no aprendizado das técnicas de Citogenética Animal.

Aos demais professores da UNIPAMPA, Dr. Andrés Delgado Cañedo e Dr. Fabiano Pimentel Torres pelo incentivo e contribuição à minha formação acadêmica.

Aos meus queridos amigos da Igreja Batista Nacional que sempre estiveram do meu lado, trazendo as palavras certas e confortantes nos momentos difíceis.

“Confia ao Senhor as tuas obras, e teus  
pensamentos serão estabelecidos.”

Provérbios 16:3

## RESUMO

Com a finalidade de detectar eventuais alterações cromossômicas, tanto estruturais quanto numéricas, foram analisados citogeneticamente rebanhos de Carabao (*swamp buffalo*), Murrah e tipo Baio (*river buffalo*). As amostras sanguíneas do Carabao e tipo Baio foram retiradas de exemplares pertencentes à Embrapa Amazônia Oriental (PA), já as amostras do Murrah são oriundas da Embrapa Clima Temperados (RS). Após a realização da cultura foi feita a análise cromossômica onde o Carabao obteve o menor número ( $2n=48$ , XX/XY) enquanto que o tipo Baio e Murrah apresentaram número diplóide igual ( $2n=50$ , XX/XY). Na cariotipagem identificou-se a existência de três indivíduos híbridos, que estavam listados como Carabao. Estes apresentaram duas características importantes em seu cariótipo: heteromorfismo do primeiro par e ausência do membro do par 24. Entre a raça Murrah, uma fêmea apresentou heteromorfismo no par sexual (XX). A biometria comprovou a diferença de tamanho do primeiro par cromossômico, no caso do híbrido, e o heteromorfismo do par sexual X do Murrah. Além disso, a biometria cromossômica revelou para o Carabao uma média superior em relação ao tipo Baio e Murrah. O bandeamento G revelou maior quantidade de bandas escuras, ricas em AT, para o tipo Baio enquanto que o Carabao apresentou maior frequência de bandas claras, ricas em CG. A aplicação do bandeamento C revelou marcações semelhantes nas três subespécies, sendo que todos os cromossomos foram marcados nos centrômeros. O tipo Baio apresentou uma marcação distal de heterocromatina constitutiva no cromossomo sexual X. As regiões organizadoras de nucléolo foram identificadas nas regiões teloméricas em cinco pares cromossômicos no Carabao e em seis pares no tipo Baio.

Palavras-chaves: *Bubalus bubalis*; comparação; cromossomo; bandeamento C, G e NOR's; biometria

## ABSTRACT

In order to detect any chromosomal abnormalities, both structural and numerical, Carabao (*swamp buffalo*), Murrah and type Baio (*river buffalo*) were analyzed cytogenetically. Blood samples of the Carabao and type Baio were taken from specimens belonging to Embrapa Eastern Amazon (PA) since the Murrah samples are from the Embrapa Temperate Climate (RS). After cell culture completion, the chromosomal analysis was performed, where Carabao had the lowest number ( $2n=48$ , XX/XY), while type Baio and Murrah had the same diploid number ( $2n=50$ , XX/XY). In karyotyping three hybrid individuals were identified, who were listed as Carabao. These presented two important features in its karyotype: heteromorphism of the first pair and absence of a member of the pair 24. Among Murrah breed, a female presented heteromorphism in sexual pair (XX). Biometrics proved the difference in size of the first chromosome pair, in the case of the hybrid, and the heteromorphism of the X sexual pair from Murrah. Moreover, biometrics for Carabao chromosomes revealed a higher than average compared to type Baio and Murrah. The G banding revealed a higher number of dark bands, rich in AT, for Baio, while the Carabao presented a higher frequency of lighter bands, rich in CG. The C banding revealed similar markings in the three subspecies, and chromosomes were marked at the centromeres. The type Baio showed a distal marker of constitutive heterochromatin in the sex chromosome X. The nucleolus organizing regions were identified in the telomeric regions in five chromosome pairs in the Carabao and six pairs in type Baio.

Keywords: *Bubalus bubalis*; comparison; chromosome; C, G and NOR's- banding; biometry

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Carabao utilizado no trabalho do campo .....	14
Figura 2: Fenótipo de Carabao .....	16
Figura 3: Fenótipo da cabeça de Carabao .....	16
Figura 4: Fenótipo de Murrah .....	16
Figura 5: Fenótipo da cabeça do Murrah.....	16
Figura 6: Fenótipo do tipo Baio .....	17
Figura 7: Detalhe fenotípico da cabeça do tipo Baio .....	17
Figura 8: Semelhanças e diferenças fenotípicas entre tipo Baio (A) e raça Murrah (B) .....	18
Figura 9: Búfala albina da raça Murrah .....	22
Figura 10: Coleta de sangue da raça Murrah .....	22
Figura 11: Cultivo de linfócitos na capela de fluxo laminar .....	23
Figura 12: Cultura sanguínea incubada a 37°C .....	24
Figura 13: Cariótipo (à esquerda) e metáfase (à direita) de uma fêmea Carabao .....	28
Figura 14: Cariótipo (à esquerda) e metáfase (à direita) de um macho tipo Baio .....	30
Figura 15: Cariótipo (à esquerda) e metáfase (à direita) de uma fêmea Murrah .....	31
Figura 16: Heteromorfismo do par sexual (XX) da raça Murrah .....	32
Figura 17: Cariótipo (à esquerda) e metáfase (à direita) de uma fêmea híbrida .....	33
Figura 18: Comparação da morfologia do 1º cromossomo do: Carabao (A), híbrido (B) e tipo Baio (C). .....	34
Figura 19: Comparação da morfologia do 2º cromossomo do: Carabao (A), híbrido (B) e tipo Baio (C). .....	34



Figura 20: Cariótipo de híbrido F1 com número diplóide $2n=48$ e heteromorfismo no primeiro par .....	35
Figura 21: Cariótipo (esquerda) e metáfase (direita) da banda G de uma fêmea tipo Baio ...	36
Figura 22: Cariótipo (esquerda) e metáfase (direita) da banda G de uma fêmea Carabao .....	37
Figura 23: Metáfase com marcação de bandas C de fêmea Carabao .....	38
Figura 24: Análise sequencial Giemsa (esquerda) bandeamento C (direita) de fêmea Murrah .....	38
Figura 25: Cariótipo (esquerda) e metáfase (direita) de bandas C de um macho tipo Baio....	39
Figura 26: Metáfase com marcações NOR's de uma fêmea Carabao .....	40
Figura 27: Metáfase com marcações NOR's de uma fêmea tipo Baio.....	41
Figura 28: Detalhe da associação entre os cromossomos acrocêntricos 23 e 24.....	41

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
1.1. Distribuição geográfica dos bubalinos .....	10
1.2. Classificação zoológica do tipo Baio e das raças Carabao e Murrah .....	12
1.3. Características gerais dos bubalinos .....	13
1.4. Importância e caracterização fenotípica do Carabao, Murrah e tipo Baio .....	15
1.5. Histórico sobre a citogenética do <i>Bubalus bubalis</i> .....	18
2. OBJETIVOS .....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	22
3.1. Coleta .....	22
3.2. Preparação das metáfases mitóticas .....	23
3.3. Coloração Convencional .....	24
3.4. Bandeamento G .....	24
3.5. Bandeamento C .....	25
3.6. Regiões Organizadoras de Nucléolo .....	25
3.7. Biometria .....	26
3.8. Número Fundamental .....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
4.1. Resultado da coloração convencional .....	28
4.2. Resultado bandeamento G .....	36
4.3. Resultado bandeamento C .....	37
4.4. Resultado bandeamento NOR's .....	39
5. CONCLUSÃO .....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS BUBALINOS

O búfalo é originário do Norte da Índia e Sul da China e sua domesticação foi feita desde as civilizações que habitavam as margens dos rios Tigre, Eufrates, Indus e Yangtza (COOCKRILL, 1976). Segundo Zeuner (1963), o búfalo foi o primeiro animal a ser domesticado para o trabalho, entre os anos 2.500 a 2.100 A.C., e teria ocorrido na Mesopotâmia.

Com o passar dos anos, o búfalo começou a ganhar seu destaque e disseminou-se por várias partes do mundo. Inicialmente ele atingiu a Indochina, Malásia, Indonésia, Tailândia e outros países do extremo Oriente. No início de sua domesticação, essa espécie era utilizada somente para o trabalho, mas posteriormente constatou-se a importância da mesma para a produção de leite e carne. Dessa forma, os bubalinos foram conquistando espaço nos mais diversos países. Atualmente, encontram-se distribuídos praticamente em todos os continentes, particularmente na Ásia (Índia, Paquistão, Tailândia, China, Vietnã), África (Egito), Europa (Itália, Bulgária) e América do Sul (Brasil, Argentina, Venezuela, Peru). Sendo responsáveis por 7% do leite do planeta, estima-se que a população bubalina mundial é cerca de 170 milhões de cabeças (FAOSTAT, 2005) das quais cerca de 4 milhões se encontram no continente Americano, em especial na América Latina.

No Brasil, os búfalos foram introduzidos por volta de 1890, inicialmente na Ilha de Marajó (TONHATI et al., 1999; MIRANDA, 1986; FONSECA, 1986), com animais oriundos do sudeste Asiático e da Itália (raças Carabao e Mediterrâneo). Nesta região tiveram uma ótima adaptação e conseqüentemente resultaram numa rápida proliferação. Em 1907, foram introduzidos em Alagoas animais de pelagem baía, provavelmente vindos da Índia (variedade *fulvus*). Numa importação mais tardia, por iniciativa dos importadores de gado zebu, foram introduzidas raças indianas (Jafarabadi e Murrah) na região de Uberaba-MG e no Vale do Rio Grande-SP. Em 1989, foi feita oficialmente a importação de animais da raça Mediterrâneo, da Itália, para os estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Bahia, da mesma forma que sêmen

de reprodutores Murrah e Mediterrâneo foram importados da Itália e da Bulgária pela Embrapa (MARQUES et al., 2003). Estes animais adaptaram-se tanto ao sistema extensivo em áreas alagadas na região norte do Brasil quanto ao pastejo em áreas de cerrado na região sudeste (AMARAL e ESCRIVÃO, 2005).

Com o passar dos anos, os búfalos foram criando espaço nas demais regiões do Brasil e aos poucos se difundiram por grande parte do país. De acordo como foi apresentado, pela história das importações de bubalinos e da formação do rebanho no Brasil, é notável o número reduzido de animais fundadores, fato que leva a supor que existe a possibilidade de estar ocorrendo elevado grau de consanguinidade.

Atualmente, existem 19 raças descritas a nível mundial, porém no Brasil são criadas apenas quatro que possuem padrão definido e registro genealógico na ABCB (Associação Brasileira de Criadores de Búfalos) fundada em 1961 e ativa a partir de 1965.

Pesquisas mostram que o rebanho bubalino nacional vem crescendo de maneira constante e significativa em todas as regiões do país. Segundo Mariante et al. (2003), a taxa anual de crescimento do rebanho no Brasil é superior a 12%, mais de cinco vezes a de bovinos, embora existam estimativas de que esta taxa possa chegar aos 16%.

Apesar de haver divergência nas estimativas do efetivo populacional de búfalos no Brasil, segundo Perera et al. (2005) pode-se somar aproximadamente três milhões de cabeças, o que torna a criação destes animais no Brasil como a mais importante localizada fora do continente asiático (MARIANTE et al., 2003). Dentro desse contexto, vale destacar a região norte do Brasil, principalmente a Ilha de Marajó, que apresenta o maior rebanho bubalino do país, de acordo com a Tabela 1.

TABELA 1

Porcentagem da distribuição das raças de bubalinos nas regiões do Brasil

Região	Raça	Porcentagem
Norte	Murrah, Mediterrâneo, Jafarabadi, Carabao e Tipo Baio	62,90%
Sul	Murrah, Mediterrâneo e Jafarabadi	13,20%
Nordeste	Murrah, Mediterrâneo e Carabao	9,20%
Sudeste	Murrah, Mediterrâneo e Jafarabadi	9,10%
Centro-oeste	Murrah	5,60%

Fonte: IBGE, 2005 e ABCB, 2010

## 1.2 CLASSIFICAÇÃO ZOOLOGICA DO TIPO BAIO E DAS RAÇAS CARABAO E MURRAH

A primeira classificação zoológica para os bubalinos foi feita por Roderick Macgregor em 1941. Nessa época, apesar dos escassos estudos, o autor já concluiu que os búfalos fazem parte da mesma família dos bois e do bisão, porém pertencem a gêneros distintos. Para isso, Roderick fez uma comparação anatômica e fenotípica com as demais espécies da subfamília Bovinae e agrupou os búfalos no gênero *Bubalus*. No mesmo trabalho, o autor realizou um estudo sobre o búfalo doméstico ressaltando as diferenças entre o búfalo de pântano e o búfalo de rio (MACGREGOR, 1941).

Atualmente é válida a classificação zoológica para o búfalo segundo estudos feitos por Gaylord Simpson em 1945 (Tabela 2).

TABELA 2

Classificação zoológica do *Bubalus bubalis*

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Classe	Mammalia
Ordem	Artiodactyla
Sub-Ordem	Ruminantia
Família	Bovidae
Sub-família	Bovinae
Gênero	<i>Bubalus</i> <i>Synceros</i> <i>Bos</i> <i>Bison</i> <i>Bibos</i> <i>Anoa</i>
Espécie	<i>Bubalus bubalis</i>
Variedade	<i>B. b. kerebau</i> <i>B. b. bubalis</i> <i>B. b. fulvus</i>

Referência de Gaylord Simpson, 1945

Dentro da subfamília Bovinae destaca-se o gênero *Synceros*, animais selvagens que habitam as pradarias africanas (MASON, 1996). Pertencem a este grupo a espécie *Syncerus*

*caffer*, subdividida em duas subespécies: *S. caffer caffer* e *S. c. nanus* com número cromossômico de  $2n=52$  e  $2n=54$ , respectivamente (MARQUES et al., 2000).

O gênero *Bubalus* compreende cinco espécies: *Bubalus arnee* (Búfalo selvagem), *B. mindorensis* (Búfalo das Filipinas), *B. depressicornis* (Búfalo da Indonésia), *B. quarlesi* (Anoa da Montanha) e *B. bubalis* (Búfalo asiático).

A espécie *Bubalus bubalis*, conhecida como búfalo de água (*water buffalo*), subdivide-se em três subespécies (MIRANDA, 1986). O *B. bubalis kerebau* ou búfalo de pântano (*swamp buffalo*) apresenta cariótipo com  $2n=48$ , XX/XY. Esta variedade está representada apenas pela raça Carabao ou rosilha (como era denominada, no passado, na Ilha de Marajó, como referência à pelagem nesse tom) que é reconhecida como raça pela ABCB. A subespécie *B. b. bubalis* é o búfalo doméstico ou indiano com cariótipo  $2n=50$ , XX/XY, denominado búfalo de rio (*river buffalo*). Este grupo está representado pelas raças Jafarabadi, Mediterrâneo e Murrah, todas reconhecidas pela ABCB. Além dessas raças, pertence também a este grupo o tipo Baio que não é reconhecido como raça pela ABCB. Já a subespécie *B. b. fulvus* é o búfalo nativo da região nordeste da Índia, especialmente do Assam, vivendo geralmente em estado selvagem ou semi-doméstico, sendo um animal de porte menor que os das subespécies anteriores. É de coloração pardacenta ou avermelhada, tendo alguma semelhança com o tipo Baio do Brasil. (MARQUES et al., 2006).

### 1.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS BUBALINOS

Apesar de ser um grupo de animais bastante conhecidos mundialmente, os búfalos ainda não possuem o destaque que merecem. Face a isso, a bubalinocultura tem sido incentivada em todo o mundo e tem ganhado seu destaque devido a importância que esta espécie exerce.

Embora a aparência do búfalo transmita uma impressão de animal bravo, eles possuem temperamento dócil e calmo (MIRANDA, 1986). Adicionado ao fato de serem capazes de reconhecer as pessoas que lhe tratam, essas características tem facilitado sua criação e manejo. No Brasil, é criado o búfalo doméstico, muitas vezes confundido erroneamente com as

espécies selvagens e agressivas como o Bisão ou Búfalo Americano (*Bos bison bison*) e com o Búfalo Africano (*Syncerus caffer caffer*) (FAO, 1991).

Uma das principais características dos búfalos é a sua força motriz para o trabalho, pois suportam até o dobro de seu peso, com isso, são considerados mais fortes que os equinos, asininos e bovinos (FAO, 1991). Por esse motivo, o búfalo tem sido utilizado para trabalhos no campo que vão desde o preparo do solo, passando pelo plantio até a colheita e transporte dos produtos (Figura 1).



FIGURA 1- Carabao utilizado no trabalho do campo.  
Fonte- [http://en.wikipedia.org/wiki/Water\\_Buffalo](http://en.wikipedia.org/wiki/Water_Buffalo)

Por serem animais pouco seletivos quanto à ingestão de vegetais e subprodutos, os búfalos extraem o máximo rendimento dos nutrientes neles contidos e transformam qualquer volumoso de baixo teor nutritivo em componentes necessários para o seu metabolismo energético, convertendo-os em carne e leite (ALZATE et al., 2006). Isso é muito útil em um país com as características como as do Brasil, no qual encontramos grandes áreas de pastagens naturais, ideais para a criação de búfalos. A preferência por regiões alagadas ou áreas pantanosas é bastante peculiar para os bubalinos, isto ocorre porque esses animais são revestidos por um couro extremamente resistente e espesso. Quando expostos à luz do sol, sofrem muito, pois apresentam pelos escuros e de pequena quantidade. O que agrava mais a situação é a dificuldade que os bubalinos têm de dissipar o calor extracorpóreo, em função do reduzido número de glândulas sudoríparas. Por esse motivo, em seu ambiente criatório, ele necessita de sombra e açude ou lago para ficar mergulhado nas horas mais quentes do dia para se refrescar (ZAVA, 1984).

Outra característica muito importante dos bubalinos é a qualidade do leite e da carne, reconhecidos pelos seus componentes nutricionais. Em estudos já realizados, foi comprovada a superioridade do leite da búfala, sendo este mais saudável que o leite da vaca, apresentando-se rico em gorduras (5,5%) e maior teor de proteínas (4,2%) (TONHATI et al., 2000). De

modo semelhante, a qualidade de sua carne é muito superior se comparada com a bovina. Ambas possuem uma aparência similar, porém a carne de búfalo apresenta cerca de 40% menos colesterol, 12 vezes menos gordura, 55% menos calorias e melhores índices de proteínas e sais minerais ([www.bufalo.com.br](http://www.bufalo.com.br)).

#### **1.4 IMPORTÂNCIA E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO CARABAO, MURRAH E TIPO BAIÃO**

O *Bubalus bubalis kerebau*, também conhecido como búfalo de pântano (*swamp buffalo*), é representado apenas por uma raça originária do continente Asiático, mais precisamente da Indonésia, Filipinas e Sri Lanka. Indicada por alguns autores como sendo a primeira raça introduzida no Brasil, o Carabao tem como principal característica, desde a sua introdução no Brasil, a produção de carne. Além disso, por apresentar maior vigor, rusticidade e habilidade dos membros, é também considerada a raça mais bem adaptada para trabalhos de tração. Outro fator que se destaca nessa variedade é a sua aptidão às regiões alagadas e pantanosas o que favorece a utilização deste bubalino em trabalhos que exigem tração e força nessas regiões. Apesar de ser considerada a quarta raça com melhor desempenho na aptidão leiteira, o Carabao tem sido utilizado também nessa área, porém com menor ênfase (NASCIMENTO e CARVALHO, 1993).

Fenotipicamente, o Carabao apresenta um porte médio a grande e apresenta pelagem cinza escura ou rosilha, portadores de manchas de tonalidade clara ou branca nas patas, no pescoço logo abaixo da mandíbula e próximas ao peito em forma de listras circulares e paralelas (Figura 2). Sua cabeça de forma triangular e relativamente pequena porta chifres longos, grandes e fortes, de seção triangular, emergindo lateralmente e dirigindo-se em posição horizontal para fora e depois para trás e para cima. Orelhas em geral cobertas de pelos longos e claros (Figura 3) (ANDRADE e GARCIA, 2005). Portador de membros vigorosos e fortes, relativamente leves e corretamente apumados e bom desenvolvimento de massa muscular, o que favorece seu uso como animal tanto de tração agrícola.





FIGURA 2- Fenótipo de Carabao.  
Fonte- internet



FIGURA 3- Fenótipo da cabeça de Carabao.  
Fonte- Ribamar Marques, 2008

Originário da Índia, o *Bubalus bubalis bubalis* é considerado o búfalo doméstico propriamente dito e é também chamado de búfalo de rio (*river buffalo*). Pertencentes a este grupo, foram estudados no presente trabalho a raça Murrah e o tipo Baio.

Pelo fato da raça Murrah ter boa capacidade digestiva, o que é pré-requisito importante para a produção de leite, ela tem sido considerada a melhor produtora de leite dentre as raças bubalinas, sendo a mais criada no país. Diferencia-se por seu leite conter um maior teor de gordura se comparado com o leite das demais raças bubalinas (ROSA, 2007).

Como padrão fenotípico do Murrah, destaca-se o porte médio, a conformação compacta apresentando membros curtos, grossos e corretamente aprumados. Apresentam poucos pelos, pele fina e macia de pigmentação preta (Figura 4), sendo que manchas médias ou grandes de despigmentação do corpo não são toleradas. A raça Murrah apresenta esse nome pelo formato em caracol-espiral de seus chifres que são curtos, finos e espiralados saindo para trás, para fora, para baixo e para cima, com a ponta retorcida para dentro e enrolada, descrevendo curvaturas em torno de si mesmo (Figura 5).



FIGURA 4- Fenótipo de Murrah.  
Fonte- Rejane R., 2009



FIGURA 5- Fenótipo da cabeça do Murrah.  
Fonte- Rejane R., 2009

O outro bubalino estudado neste trabalho pertencente à subespécie *B. b. bubalis* é o tipo Baio que recebe este nome devido à sua coloração baia ou pardacenta. Possui um padrão corporal fenotípico robusto revelador de saúde e vigor, porte médio a grande e formato do corpo simétrico e equilibrado (Figura 6). Apresenta chifres curtos, finos e pequenos curvando-se para trás e para cima em forma de espiral (Figura 7).



FIGURA 6- Fenótipo do tipo Baio.  
Fonte- internet



FIGURA 7- Detalhe fenotípico da cabeça do tipo Baio.  
Fonte- internet

O tipo Baio não possui um registro genealógico na ABCB por este motivo não é considerado uma raça. Isto é decorrente do número reduzido de animais, que é insuficiente para abrir um livro de registro, e da pequena distribuição deste bubalino no país. Atualmente, acredita-se que haja em torno de 300 exemplares desta espécie no Brasil. Outra característica do tipo Baio, juntamente com a raça Carabao é o fato de ambos estarem em risco de extinção e descaracterização racial o que demonstra a importância destas espécies serem alvos de pesquisa e estudo para evitar a total extinção (CASSIANO et al., 2003).

Além disso, existem outras dúvidas em relação ao tipo Baio que ainda não estão esclarecidas, como por exemplo, a origem do mesmo. Este grupo apresenta algumas semelhanças com o búfalo nativo da região nordeste da Índia descrito como *Bubalus bubalis*, variedade *fulvus* sem haver, no entanto, nenhuma comprovação científica disso pela falta de literatura sobre o assunto. O tipo Baio também apresenta semelhanças com a raça Murrah (MARQUES et al., 2003) (Figura 8), pois ambos pertencem ao mesmo grupo genético, ou seja, *B. b. bubalis* (plataformarg.cenargen.embrapa.br/pnrg). Corroboram essa hipótese as informações do presidente da ABCB de que na Índia esses animais são considerados uma variedade da raça Murrah com a qual têm muita semelhança fenotípica (formato do corpo,

chifre, perfil da cabeça) diferindo apenas na coloração da pelagem (ALBUQUERQUE et al., 2006).

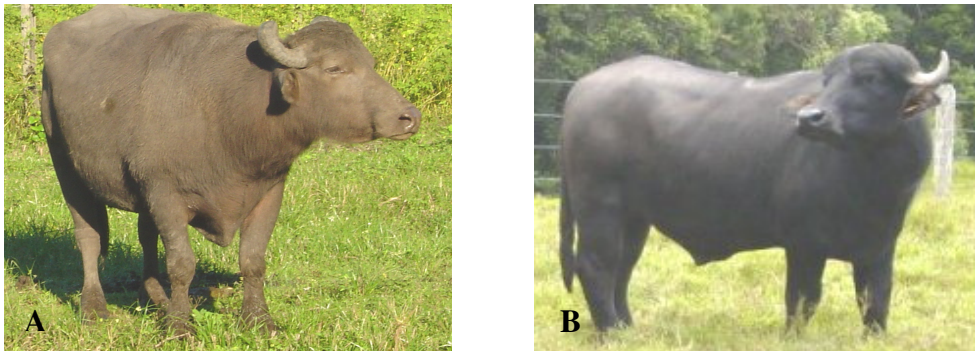


FIGURA 8- Semelhanças e diferenças fenotípicas entre Tipo Baio (A) e raça Murrah (B).

Porém, estudos realizados nos bubalinos com marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) resultou numa divergência genética de 20,42% entre o tipo Baio e a raça Murrah. A técnica usada no trabalho citado permite quantificar a variabilidade genética entre e dentro de diferentes grupamentos genéticos, em espécies distintas. Assim, concluiu-se que as análises de distância genética confirmam a diferenciação genética desses grupos. Dessa forma, contraria a hipótese do tipo Baio pertencer ao grupo Murrah (ALBUQUERQUE et al., 2005) (Marques et al., 2000).

### 1.5 HISTÓRICO SOBRE A CITOGENÉTICA DO *Bubalus bubalis*

No início da década de 30, haviam diversos estudos em andamento sobre *Bos taurus* (bovinos), mas não sobre *Bubalus bubalis*. Diante disso, em 1939 Pkakadze deu início aos estudos citogenéticos dos bubalinos. Como é discutido por Antonio de Girolamo, Pkakadze reportou erroneamente que o número diplóide para os *B. bubalis* seria de 56. Após cinco anos, Makino deu sequência nos estudos sobre os cromossomos de búfalos e constatou o número cromossômico de  $2n=48$  para o mesmo, o que foi posteriormente comprovado por Dutt e Bhattacharya em 1952 e Girolamo em 1957. Segundo Girolamo, o motivo da contagem cromossômica de Pkakadze ser superior à dos demais pesquisadores, deve-se ao fato deste

autor ter contado 8 cromossomos submetacêntricos como sendo dois acrocêntricos cada um deles, totalizando assim 16 o que somado aos demais 40 resultou em  $2n=56$  (GIROLAMO, 1957).

Esses investigadores fizeram uso de diversas técnicas primárias, e por esse motivo, em 1960, foram julgadas necessárias novas investigações, devido ao grande avanço da citogenética (CHAKRABARTI et al., 1980). No ano de 1967, Fischer e Ulbrich realizaram um dos primeiros estudos de citogenética com coloração convencional, onde reportaram o número diplóide de 50 cromossomos para o búfalo de água (ULBRICH e FISCHER, 1967).

Um ano mais tarde, Fischer e Ulbrich realizaram um estudo sobre a raça Murrah e o híbrido deste com o búfalo de pântano. Segundo os autores, o objetivo para este cruzamento seria agrupar em um indivíduo a qualidade leiteira do Murrah com a morfologia robusta do búfalo de pântano. Os primeiros descendentes da geração, chamados de F1, apresentaram  $2n=49$  e levando em consideração a forma do corpo e do chifre, eram intermediários aos parentais. A F1 foi então cruzada com a raça Murrah ( $2n=50$ ) e resultou numa geração com  $2n=49$  que se apresentou similar ao Murrah (FISCHER e ULBRICH, 1968).

Alguns anos depois iniciaram-se os trabalhos com coloração diferencial de citogenética. A primeira a ser realizada foi a técnica de bandeamento G, caracterizado pela desnaturação das proteínas cromossômicas. Um dos trabalhos pioneiros nessa área, aplicada em bubalinos, foi realizado por Toll (1976). O autor fez uma comparação com padrão de bandeamento G de búfalo de pântano da Austrália com caprinos, ovinos e bovinos. Toll concluiu que o padrão de bandas G entre os cromossomos das diferentes espécies de Bovidae é homólogo, pois ele obteve um resultado similar para o bandeamento cariotípico da fêmea do búfalo entre as demais espécies estudadas (TOLL et al., 1976).

Posteriormente, aplicou-se nos bubalinos a técnica de bandeamento C, onde se identifica a heterocromatina constitutiva. Esta foi primeiramente aplicada em búfalos no ano de 1978 por Cribiu e Obeidah. Neste trabalho, os autores estabeleceram um padrão de bandeamento C para o búfalo de água egípcio.

No ano de 1981, Cockrill classificou os búfalos de água, *Bubalus bubalis*, de acordo com seu habitat e características citogenéticas. Com este trabalho, os búfalos de água ficaram divididos em: búfalo de pântano com  $2n=48$  e búfalo de rio com  $2n=50$ .

A técnica de coloração com nitrato de prata (Ag-NOR) marca as regiões organizadoras de nucléolo. Essas regiões são fitas de DNA que possuem genes de RNA ribossômico,

organizando assim, os nucléolos. Di Berardino e Iannuzzi foram pioneiros na aplicação dessa técnica nos búfalos, no ano de 1981. Os autores focaram o estudo na translocação Robertsoniana ocorrida no mecanismo de evolução cariotípica na família *Bovidae*. Concluíram que o cromossomo 1 do búfalo de pântano se originou da fusão em tandem entre o cromossomos 9 (acrocêntrico) e a região telomérica do braço curto do cromossomo 4 (submetacêntrico) do Murrah. Esse evento resultou na redução do número diplóide cromossômico de 50 para 48 no búfalo de pântano.

## 2. OBJETIVOS

- Caracterizar e comparar citogeneticamente os búfalos da raça Murrah e tipo Baio (*Bubalus bubalis bubalis*) a raça Carabao (*B. b. kerebau*) introduzidos no Brasil.
- Padronizar as técnicas de bandeamento cromossômico G, C e NOR's.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 COLETA

A coleta e o envio das amostras sanguíneas da raça Carabao e do tipo Baio foi efetuada por técnicos especializados da Embrapa Amazônia Oriental (PA). Foram enviadas 25 amostras do tipo Baio (*B. b. bubalis*) sendo que destes, 8 eram machos e 17 fêmeas. As amostras da raça Carabao (*B. b. kerebau*) totalizaram 30, sendo 6 machos e 24 fêmeas. Enquanto que as amostras da raça Murrah foram num total de 13, com 7 fêmeas, uma com albinismo (Figura 9) e 6 machos, um deles com albinismo e um com hiperplasia muscular. Essas amostras foram coletadas na Embrapa Clima Temperados da cidade de Pelotas/RS pela nossa equipe de pesquisa e colaboração da pesquisadora M.Sc. Maria Cecília F. Damé (Figura 10).

Utilizando seringas hipodérmicas heparinizadas, foram coletados aproximadamente 10 ml de sangue da veia jugular dos exemplares. Logo após a coleta, as amostras foram acondicionadas a 4°C para o transporte.



FIGURA 9- Búfala albina da raça Murrah.  
Fonte- Rejane R., 2009



FIGURA 10- Coleta de sangue da raça Murrah.  
Fonte- Rejane R., 2009



### 3.2 PREPARAÇÃO DAS METÁFASES MITÓTICAS

Os cultivos foram realizados de acordo com o protocolo de Moorhead et al. (1960) em condições assépticas na capela de fluxo laminar (Figura 11).

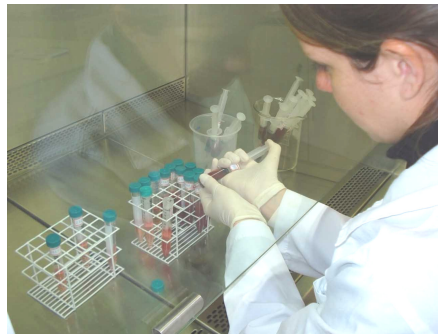


FIGURA 11- Cultivo de linfócitos na capela de fluxo laminar.  
Fonte- Rejane R., 2009

Para a realização da cultura, foram seguidos os seguintes passos:

- Em tubo falcon, adicionar 1 ml de sangue periférico e 10 ml de meio completo RPMI 1640 contendo 10% de soro bovino fetal, 0,1 ml de fitohemaglutinina e antibiótico (penicilina) (Gibco).
- Incubar a 37°C por 72 horas (Figura 12).
- Quando completar 71 horas adicionar aproximadamente 0,1 ml de colchicina (0,05%).
- 20 minutos antes de fazer a colheita centrifugar por 8 minutos a 1200 rpm, desprezar o sobrenadante, adicionar 10 ml de solução hipotônica (KCl 0,075M) e homogeneizar com pipeta Pasteur. Após estes procedimentos, incubar novamente a 37°C por 20 minutos.
- Transcorrido este tempo, retirar da estufa e acrescentar 5 gotas de solução fixadora (metanol, ácido acético 3:1), homogeneizar e centrifugar durante 8 minutos a 1200 rpm e posteriormente descartar o sobrenadante.
- Completar com 10 ml de solução fixadora, homogeneizar e centrifugar a 1200 rpm por 8 minutos e desprezar o sobrenadante. Repetir esta lavagem com solução fixadora mais duas vezes.



- Pingar 2 gotas da preparação numa lâmina limpa e deixar secar à temperatura ambiente.



FIGURA 12- Cultura sanguínea incubada a 37°C.  
Fonte- Rejane R., 2009

### 3.3 COLORAÇÃO CONVENCIONAL

As lâminas foram coradas por 5 minutos com Giemsa a 10% em tampão fosfato pH 6,8 (0,272 gramas de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em 200 ml de água destilada + 0,284 gramas de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  em 200 ml de água destilada), segundo Guerra et al. (2002).

### 3.4 BANDEAMENTO G

Para a obtenção de bandeamento G, utilizou-se a técnica segundo Seabright (1971) com modificações.

- Deixar a lâmina envelhecer por 5 dias, a temperatura ambiente.
- Imergir a lâmina por 1 minuto na solução de tripsina (0,1%) com 50 ml de tampão fosfato pH 6,8 a 37°C.
- Lavar em água corrente e corar com Giemsa durante 5 minutos.

### 3.5 BANDEAMENTO C

Para a obtenção das bandas de heterocromatina constitutiva foi utilizado o protocolo segundo Ledesma et al. (2002) e segue os seguintes passos:

- Colocar em banho-maria o hidróxido de bário (2,5 gramas de bário diluído em 50 ml de água destilada) e a solução salina (2 X SSC) a 60°C. Preparar o HCl 0,2N (1,6 ml de HCl em 100 ml de água destilada) e 0,01N (diluir uma parte do que restou da solução 0,2N até alcançar 0,01N).
- Pôr a lâmina que contém o material pingado em solução de HCl 0,2N, a temperatura ambiente, durante 6 minutos. Lavar em água corrente.
- Deixar por 8 minutos em bário a 60°C.
- Lavar em HCl 0,01N, a temperatura ambiente, por 3 minutos e depois enxugar em água corrente.
- Deixar 1 hora em SSC a 60°C e lavar em água corrente
- Corar com Giemsa durante 10 minutos.

### 3.6 REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLO

A identificação das regiões organizadoras de nucléolo (NOR's) foi realizada seguindo o protocolo, com alterações, de Howell e Black (1982).

- Preparar uma câmara úmida (uma placa de Petri forrada com papel de filtro e umedecida com água e dois bastões de vidro para servir como suporte para as lâminas).

- Colocar sobre a lâmina 4 gotas de solução coloidal (1 grama de gelatina diluída em 50 ml de água destilada). Gotejar sobre a solução 3 gotas de nitrato de prata ( $\text{NO}_3\text{Ag}$ ) à 50%. Misturar as duas soluções movimentando a lâmina delicadamente e cobrir com lamínula.
- Colocar a tampa da placa de Petri e incubar a  $60^\circ$  até que adquira uma tonalidade marrom dourado. Retirar a lamínula com água corrente e examinar no microscópio óptico.

### 3.7 BIOMETRIA

A análise biométrica dos cromossomos foi realizada mediante seleção das 10 melhores metáfases de cada uma das duas raças e do tipo Baio. Os cariótipos foram montados utilizando o programa Corel Photo-Paint X4 (versão 14) e mensurados utilizando o programa MicroMeasure 3.3 obtendo a média do comprimento cromossômico no programa Excel (Microsoft). Foi estimada a razão entre braços ( $r$ ) e o índice centromérico ( $ic$ ), que revela a posição do centrômero, segundo GUERRA (1986). No primeiro caso, a posição do centrômero é definida pelo valor obtido da razão entre o braço longo ( $l$ ) e o curto ( $c$ ):  $r=l/c$ . No segundo caso, divide-se o tamanho do braço curto multiplicado por 100 pelo comprimento total do cromossomo:  $ic=c \times 100/c + 1$ . Além disso, foi estimada a média do comprimento dos braços curtos e longos, assim como o comprimento total do cromossomo. A nomenclatura para designar a posição do centrômero proposta e discutida por Guerra (1986) foi utilizada neste trabalho para identificar a morfologia de cada cromossomo. Segundo Guerra, a nomenclatura de acordo com os índices centroméricos é: 50% à 40,1% - metacêntrico; 40% à 25,1% - submetacêntrico; 25% à 0,01% - acrocêntrico.

### **3.8 NÚMERO FUNDAMENTAL**

O número fundamental (NF) refere-se ao somatório do número de braços de cada cromossomo. Para calcular o NF foram levados em consideração cromossomos sub/metacêntricos e acrocêntricos com dois e um braço, respectivamente.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 RESULTADO DA COLORAÇÃO CONVENCIONAL

Para a raça Carabao foi encontrado o cariótipo de  $2n=48$  (Figura 13) com  $NF=58$  em 27 das 30 amostras. Nestes exemplares, foi constatada a existência de 23 pares de cromossomos autossômicos e um par sexual XX/XY. Para este grupo, o número diplóide está de acordo como foi descrito por Marques (1991).

O padrão biométrico para esta raça está exposto na Tabela 3. Com os resultados, tem-se o primeiro par com um índice centromérico de 42% o que revela uma morfologia metacêntrica com o centrômero numa posição próxima a região mediana. Os demais quatro primeiros pares apresentaram forma submetacêntrica com índices centroméricos variando entre 37% e 26%. Entre os acrocêntricos, o cromossomo sexual X foi o maior e o Y o menor.

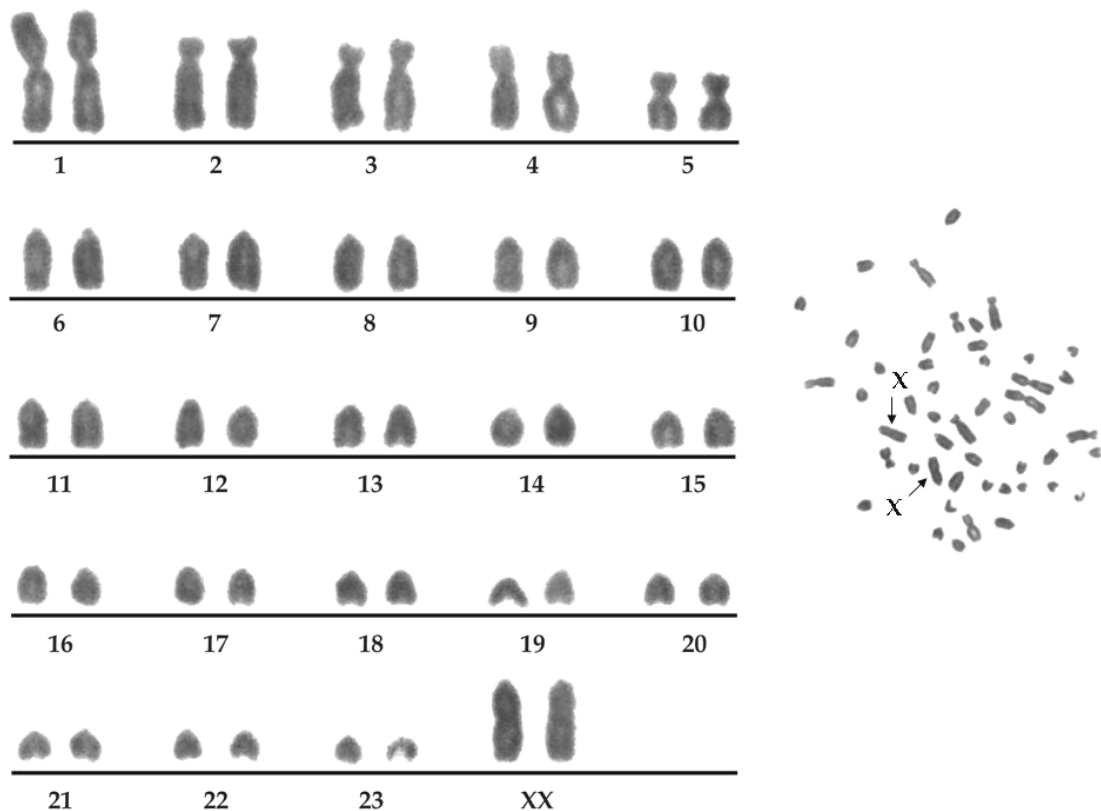


FIGURA 13- Cariótipo (à esquerda) e metáfase (à direita) de uma fêmea Carabao.

Biometria da raça Carabao (*B. b. kerebau*) mostrando a razão entre os braços (r) longo (l) e curto (c) e índice centromérico (ic) dos autossomos e dos cromossomos sexuais X e Y

Cromossomo Nº	l	c	l + c	r	ic
1	26,95370437	19,68679719	46,64050156	1,3855386	0,4200547
2	24,42481958	8,829509075	33,25432866	2,8254906	0,266914
3	22,41000902	9,325466858	31,73547588	2,5700453	0,2867834
4	20,04818749	9,580687135	29,62887463	2,09843	0,3302342
5	13,16734944	7,922547519	21,08989696	1,6561089	0,3779105
6	22,75604455	0			
7	20,89981654	0			
8	19,39733284	0			
9	18,97005194	0			
10	18,42934204	0			
11	18,00953346	0			
12	16,41459435	0			
13	15,89183766	0			
14	14,98484338	0			
15	14,28060922	0			
16	13,5674223	0			
17	12,93900814	0			
18	12,19557277	0			
19	11,78850292	0			
20	11,32593313	0			
21	10,46743622	0			
22	10,01476849	0			
23	8,686195739	0			
X	28,73388416	0			
Y	7,925208699	0			

Para o tipo Baio, todos os 25 exemplares apresentaram além de um par sexual XX/XY, 24 pares de cromossomos autossômicos, totalizando um número diplóide de  $2n=50$  com  $NF=60$  (Figura 14). O número cromossômico para o tipo Baio está de acordo como foi descrito por Marques (1991) e não foi encontrado nenhum tipo de alteração cromossômica, seja estrutural ou numérica.

De acordo com a biometria cromossômica (Tabela 4), os primeiros cinco pares são submetacêntricos, com índices centroméricos entre 38% a 26%, sendo o maior o quinto par e o menor o primeiro par. Os demais 20 pares são todos acrocêntricos, onde o Y é o menor e X o maior.

De forma geral, em relação à raça Carabao, o tipo Baio revelou uma média inferior no tamanho dos cromossomos e entre os primeiros cinco pares, o quinto par apresentou semelhança nos cinco aspectos analisados na biometria.

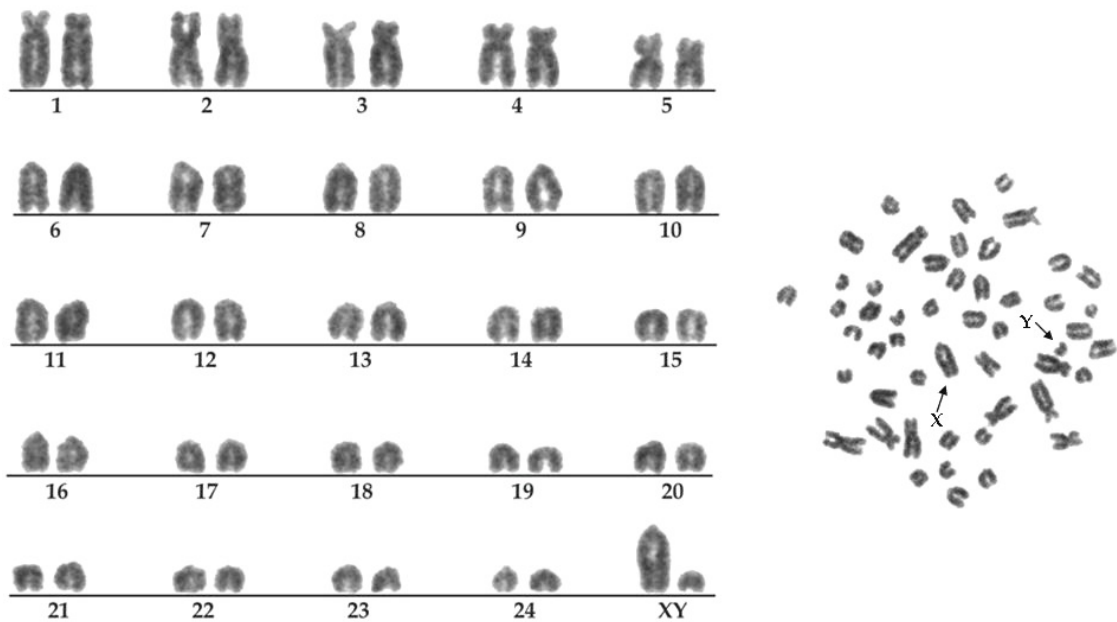


FIGURA 14- Cariótipo (à esquerda) e metáfase (à direita) de um macho tipo Baio.

TABELA 4

Biometria do tipo Baio (*B. b. bubalis*) mostrando a razão entre os braços (r) longo (l) e curto (c) e índice centromérico (ic) dos autossomos e dos cromossomos sexuais X e Y

Cromossomo N°	l	c	l + c	r	ic
1	22,46878727	7,73412021	29,84797861	2,8663558	0,2604381
2	19,40139025	9,459213933	28,86060216	2,1651191	0,3261605
3	17,55002425	9,845013329	27,39116357	1,8102231	0,3591938
4	17,46511885	8,086138814	25,5512569	2,2282278	0,3128873
5	13,19046776	8,209667932	21,40013569	1,6250641	0,3826209
6	20,36446515	0			
7	19,16024071	0			
8	18,61165657	0			
9	18,13964081	0			
10	17,30732568	0			
11	16,67844699	0			
12	16,13189508	0			
13	15,1245788	0			
14	14,59439403	0			
15	14,05806767	0			
16	13,52783269	0			
17	13,09573486	0			
18	12,5842412	0			
19	11,92623487	0			
20	11,37685793	0			
21	10,91667494	0			
22	10,60007046	0			
23	9,659120254	0			
24	8,724396342	0			
X	26,52110473	0			
Y	7,888810318	0			

Na pesquisa realizada para a raça Murrah, todos os exemplares apresentaram número diplóide de  $2n=50$  e  $NF=60$  (Figura 15). De acordo com resultados da biometria (Tabela 5), os primeiros cinco pares são todos submetacêntricos e os restantes todos acrocêntricos. O índice centromérico dos primeiros pares ficou num intervalo de 37% a 28% sendo o quinto com o maior índice e o primeiro par com o menor. Dentro do grupo dos acrocêntricos, esta o par sexual XY, onde o primeiro é o maior e o segundo o menor. O número cromossômico e a forma dos mesmos estão coerentes com o que foi descrito por Marques (1991).

Os exemplares portadores de albinismo e hiperplasia muscular não apresentaram nenhuma alteração em seus cariótipos, apresentando número diplóide normal ( $2n=50$ ).

Entre as três espécies estudadas, o Murrah revelou a menor média dos tamanhos cromossômicos, porém apresentou semelhança nos primeiros cinco pares com o tipo Baio pelo fato de ambos apresentarem os mesmos pares cromossômicos com a menor e maior razão entre os braços curtos e longos. O quinto par, submetacêntrico, revelou muita semelhança na sua biometria entre as três espécies.

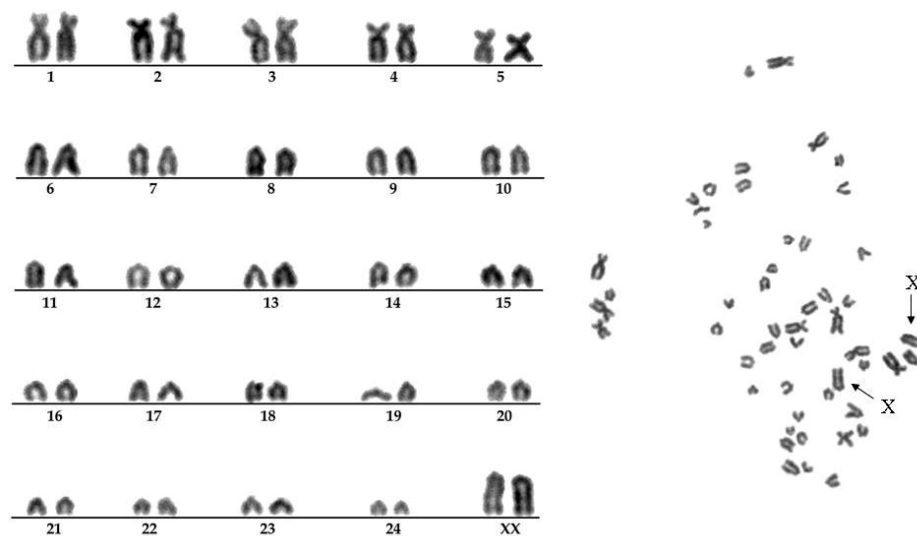


FIGURA 15- Cariótipo (à esquerda) e metáfase (à direita) de uma fêmea Murrah.



TABELA 5

Biometria da raça Murrah (*B. b. bubalis*) mostrando a razão entre os braços (r) longo (l) e curto (c) e índice centromérico (ic) dos autossomos e dos cromossomos sexuais X e Y

Cromossomo N°	l	c	l + c	r	ic
1	20,86229552	8,53380726	29,39610573	2,635519	0,2880867
2	18,53836084	8,420137831	26,95849926	2,5320223	0,2996688
3	16,828407	8,111466398	24,93987277	2,1476134	0,3251878
4	15,5330846	7,769083068	23,30216737	2,0954431	0,3274147
5	11,13741337	6,76272253	17,90013575	1,6958053	0,3732203
6	18,92296864	0			
7	17,31259342	0			
8	16,53278603	0			
9	16,1857649	0			
10	15,86463765	0			
11	15,07475495	0			
12	14,07674284	0			
13	13,58704888	0			
14	12,79501584	0			
15	12,26952927	0			
16	11,39236729	0			
17	10,9744171	0			
18	10,00458799	0			
19	9,487155209	0			
20	9,075544128	0			
21	8,205449904	0			
22	7,794410879	0			
23	7,122729188	0			
24	6,339583041	0			
X	27,11834278	0			
Y	6,29401784	0			

Dentro da raça Murrah, uma fêmea apresentou uma característica importante em seu cariótipo, foi identificado um heteromorfismo no par sexual XX (Figura 16). Essa diferença de tamanho foi comprovada mediante análise biométrica (Tabela 6). Segundo Marques (2003), as poucas importações da raça Murrah fizeram com que o rebanho fundador no Brasil apresente atualmente uma base genética estreita, sendo essa espécie alvo de alta consanguinidade. Diante disso, o heteromorfismo do XX detectado neste trabalho pode ser consequência deste problema. A consanguinidade contribuiu para a ocorrência de diversas doenças hereditárias diagnosticadas no rebanho brasileiro. Portanto, é necessário manter um nível baixo de endogamia para garantir variabilidade genética no rebanho.

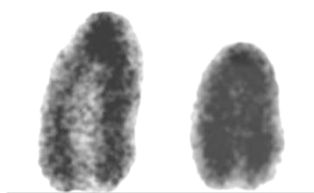


FIGURA 16- Heteromorfismo do par sexual (XX) da raça Murrah.

TABELA 6

Biometria do par sexual do exemplar com heteromorfismo no XX

Par sexual XX	l
1°	23,520371
2°	19,098154

Pertencentes à listagem da raça Carabao foram encontrados três exemplares híbridos, duas fêmeas e um macho (prole de uma das fêmeas híbridas encontradas), que apresentaram número cromossômico de  $2n=49$ , XX/XY e NF=59. Para estes, observou-se um cariótipo com duas particularidades importantes: heteromorfismo do 1° par, comprovado pela biometria (Tabela 7) e ausência do membro do par 24 (Figura 17).

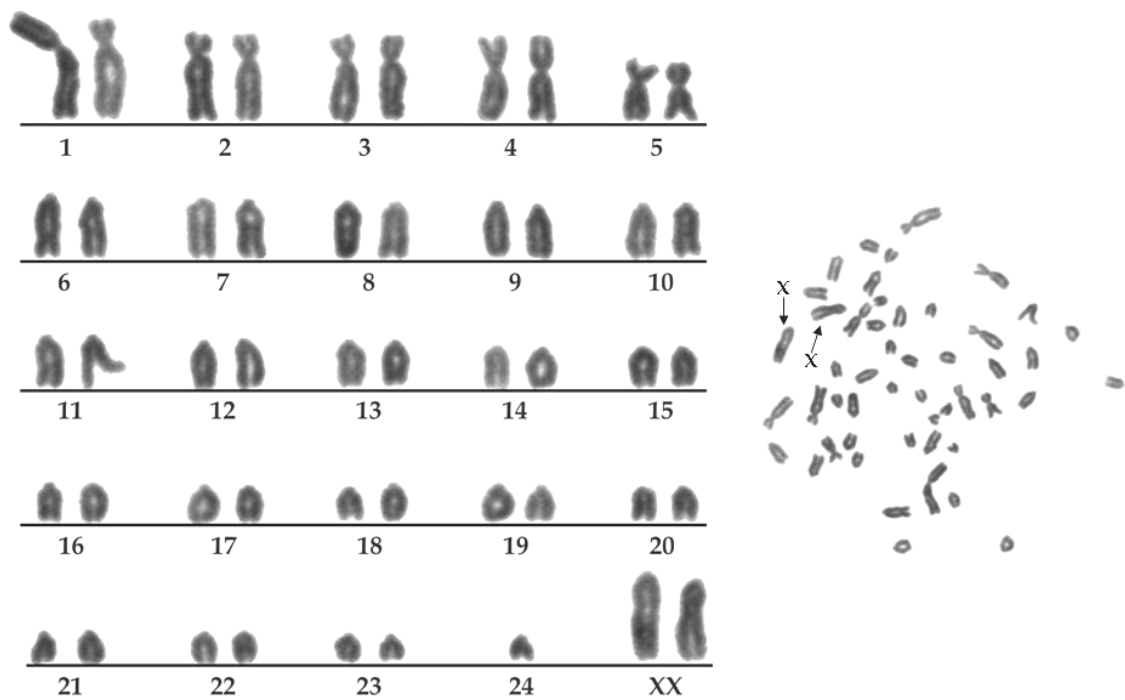


FIGURA 17- Cariótipo (à esquerda) e metáfase (à direita) de uma fêmea híbrida.

TABELA 7

Comparação entre as médias do tamanho total (l + c), do braço longo (l) e curto (c), e índice centroméricos dos cromossomos do primeiro par dos híbridos

1º par cromossômico	l	c	l + c	r	ic
1º	26,634206	20,773771	47,407974	1,2774749	0,4395668
2º	22,540659	9,2724654	31,813123	2,7426139	0,2805763

Na literatura, a existência de híbridos já é conhecida e discutida desde 1968 e pode ser muitas vezes induzida pelo homem para a obtenção de um exemplar com mais qualidades, unindo para isso duas raças distintas. No caso deste trabalho, a hibridização encontrada pode ter ocorrido devido a uma mistura entre as variedades durante o manejo. Portanto, os indivíduos híbridos encontrados neste trabalho são resultado do cruzamento entre a raça Carabao (2n=48) com o tipo Baio (2n=50) o que pode ser comprovado observando a morfologia dos cromossomos.

O 1º par cromossômico do Carabao é metacêntrico com o centrômero numa posição próxima a mediana e é semelhante à morfologia do primeiro cromossomo do híbrido (Figura 18). Enquanto que o primeiro par cromossômico do tipo Baio é submetacêntrico e semelhante ao 2º cromossomo do primeiro par do híbrido (Figura 19).

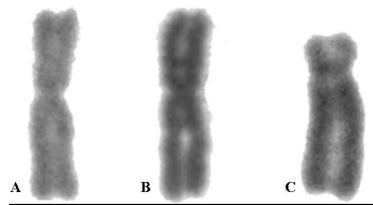


FIGURA 18- Comparação da morfologia do 1º cromossomo do: Carabao (A), híbrido (B) e tipo Baio (C).

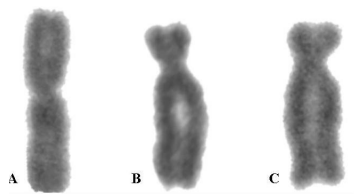


FIGURA 19- Comparação da morfologia do 2º cromossomo do: Carabao (A), híbrido (B) e tipo Baio (C).

Dentro do grupo dos híbridos, foi detectada uma híbrida com alta fertilidade. Para o aprofundamento de estudos, pesquisadores da Embrapa Amazônia Oriental (PA) enviaram uma segunda amostragem com a prole da mesma. Infelizmente, devido à problemas de falta de luz durante a realização da cultura, os resultados da obtenção de metáfases não foram satisfatórios. Porém, juntamente com as primeiras amostras enviadas, constavam três exemplares da prole dessa fêmea híbrida. Mediante análise citogenética, comprovou-se a existência de um exemplar F1 que apresentou número diplóide  $2n=48$ , porém com heteromorfismo no primeiro par (Figura 20). Enquanto que outro exemplar F2 apresentou cariótipos com números diplóides distintos de  $2n=48$ ,  $2n=49$  e  $2n=50$ .

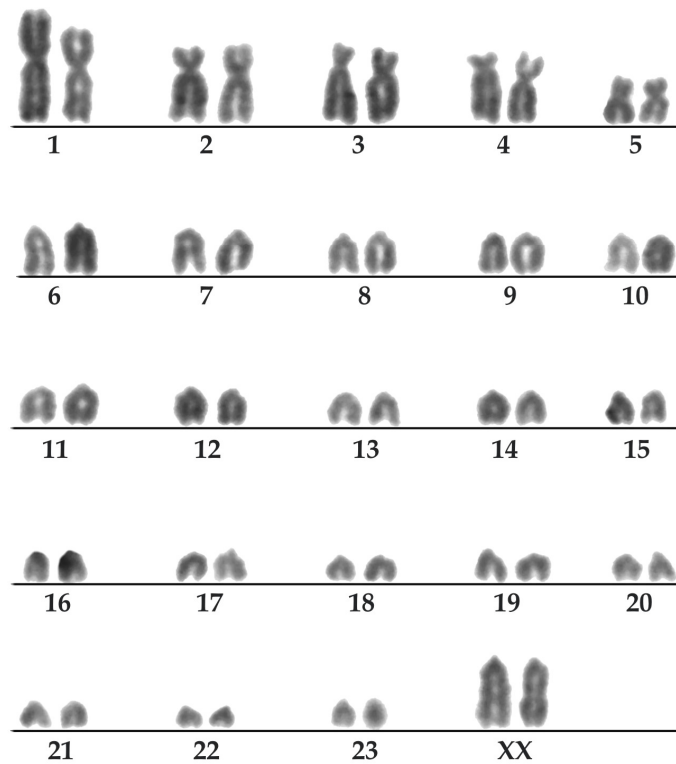


FIGURA 20- Cariótipo de híbrido F1 com número diplóide  $2n=48$  e heteromorfismo no primeiro par.

## 4.2 RESULTADO BANDEAMENTO G

A técnica com a utilização de tripsina e Giemsa revelou padrões de bandas G para cada cromossomo. Esse padrão de bandas é útil para realizar devidamente a identificação dos pares cromossômicos. As mesmas se apresentam como faixas transversais com diferentes tonalidades, claras e escuras. As bandas claras são ricas em bases GC (guanina e citosina) enquanto que as escuras são ricas em AT (adenina e timina). No resultado do bandejamento G no tipo Baio (Figura 21), as bandas mais frequentes são escuras ou coradas, no entanto, na raça Carabao, são mais evidentes as bandas claras (Figura 22). O bandejamento G não foi realizado na raça Murrah, devido à escassez de células mitóticas em divisão e pela falta de metáfases de boa qualidade para a realização da técnica.

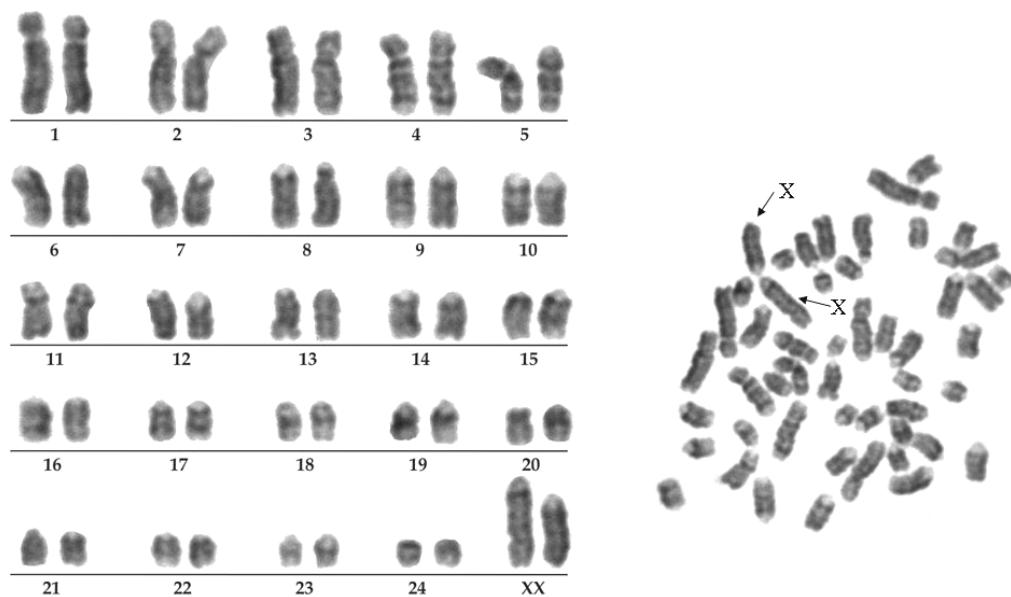


FIGURA 21- Cariótipo (esquerda) e metáfase (direita) da banda G de uma fêmea tipo Baio.

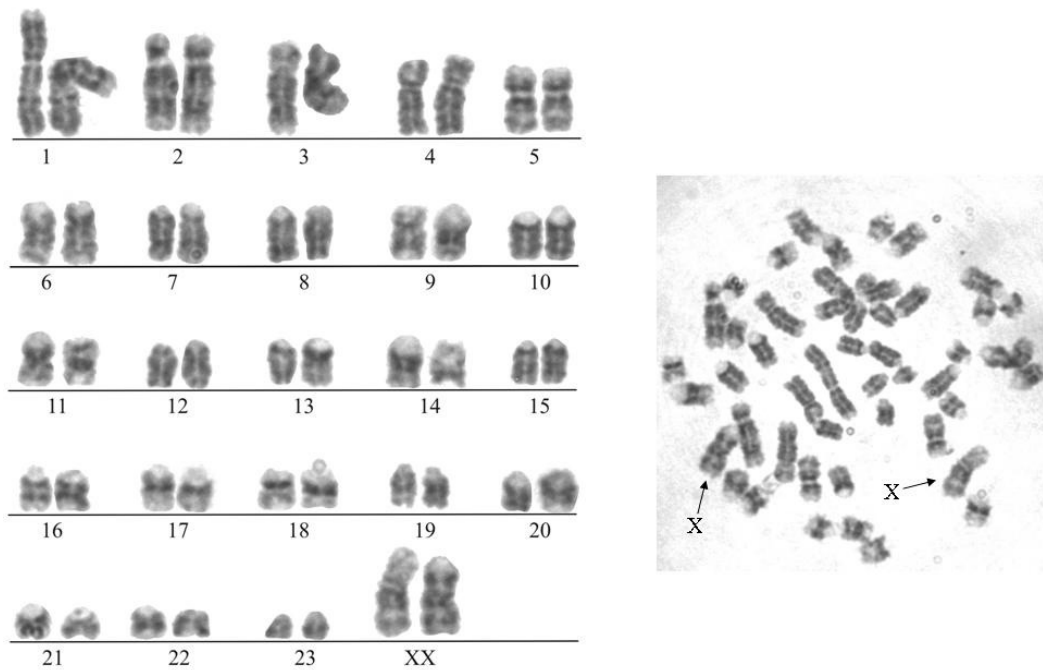


FIGURA 22- Cariótipo (esquerda) e metáfase (direita) da banda G de uma fêmea Carabao.

#### 4.3 RESULTADO BANDEAMENTO C

A identificação das bandas C revela a presença e a localização da heterocromatina constitutiva que tem funções estruturais durante o ciclo celular. Essas regiões nunca se expressam como proteínas e são altamente repetitivas e aparecem como blocos nos cromossomos.

O bandejamento C para o Carabao (Figura 23), Murrah (Figura 24) e tipo Baio (Figura 25) mostrou bandas centroméricas em todos os autossomos acrocêntricos enquanto que os centrômeros de todos os submetacêntricos foram tingidos levemente. Em relação ao par sexual, o cromossomo X apresentou bandas C-positivas tanto em fêmeas quanto em machos, em contrapartida o cromossomo Y apresentou marcação C-negativa.

O cromossomo sexual X do Baio além de apresentar a marcação na região centromérica, apresentou também uma marcação intersticial, próximo ao centrômero.

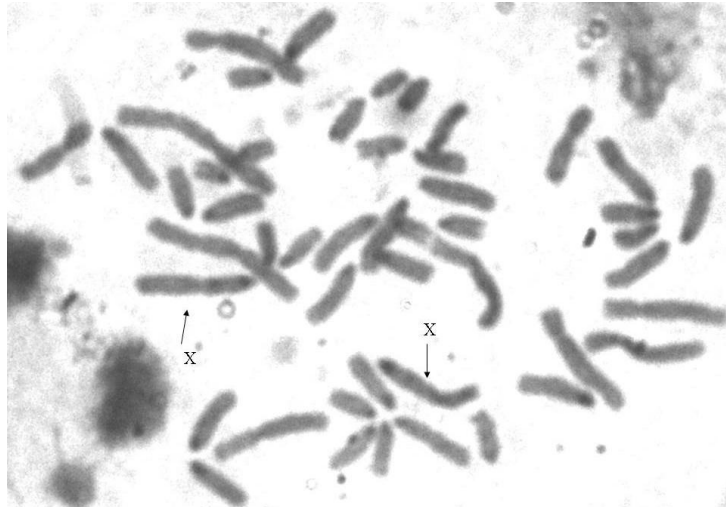


FIGURA 23- Metáfase com marcação de bandas C de uma fêmea Carabao.

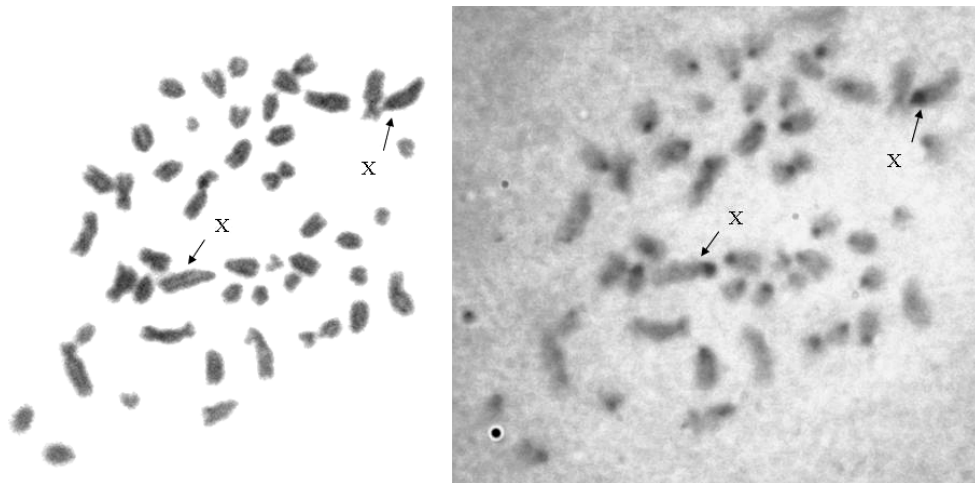


FIGURA 24- Análise sequencial Giemsa (esquerda) bandeamento C (direita) de uma fêmea Murrah.

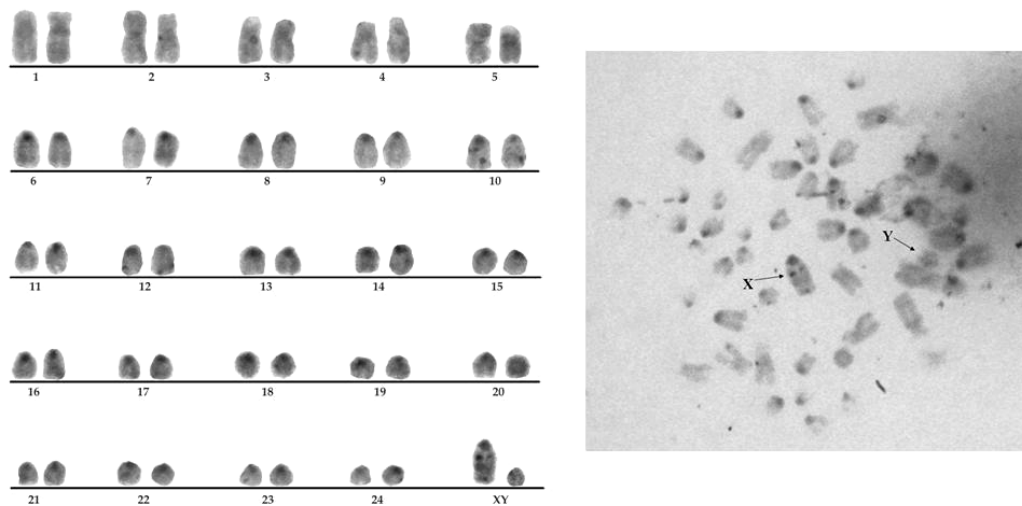


FIGURA 25- Cariótipo (esquerda) e metáfase (direita) de bandas C de um macho tipo Baio.

#### 4.4 RESULTADO BANDEAMENTO NOR's

A técnica de bandeamento que utiliza a coloração com nitrato de prata (Ag-NOR) demarca as regiões organizadoras de nucléolo. O nucléolo é constituído basicamente de DNA ribossômico (DNAr), RNA ribossômico (RNAr) e proteínas. Ele corresponde às regiões onde se localizam as sequências de DNAr, responsáveis pela transcrição do RNAr.

No búfalo de pântano ( $2n=48$ ) as metáfases revelaram marcações NOR's na região telomérica em cinco pares de autossomos, 4p (submetacêntrico), 8, 20, 22 e 23 (acrocêntricos) (Figura 26).



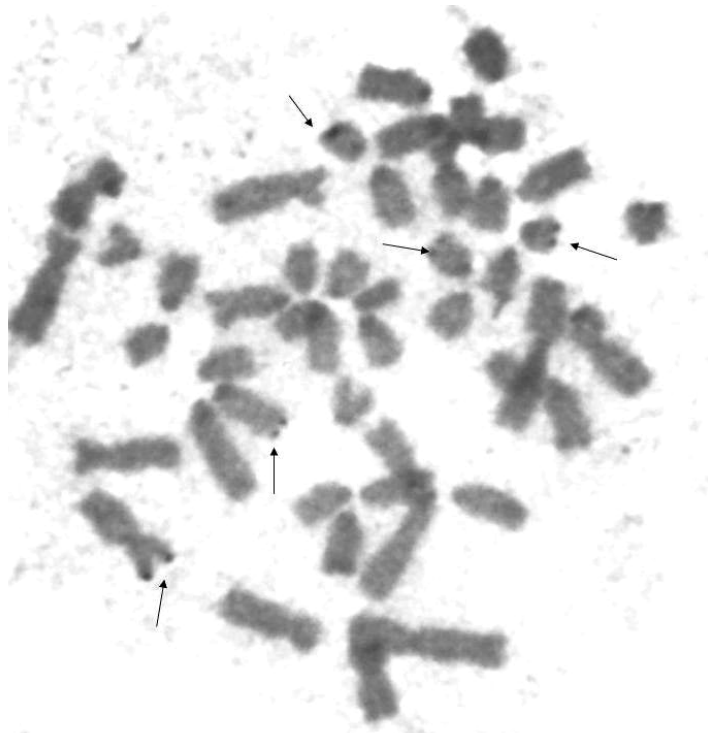


FIGURA 26- Metáfase com marcações NOR's de uma fêmea Carabao.

Enquanto que no tipo Baio, observou-se marcações teloméricas NOR's em 6 pares de autossomos, sendo eles 3p e 4p (submetacêntricos), 08, 21, 23 e 24 (acrocêntricos) (Figura 27).

Ainda no tipo Baio, foi encontrada uma associação entre os cromossomos 23 e 24 (Figura 28). A associação encontrada nos cromossomos organizadores de nucléolo mostra que ambos estavam envolvidos em uma atividade comum de transcrição do RNAr.

Na raça Murrah, pelo fato de não haver metáfases de boa qualidade, não foi obtido um padrão desejável de bandas NOR's.

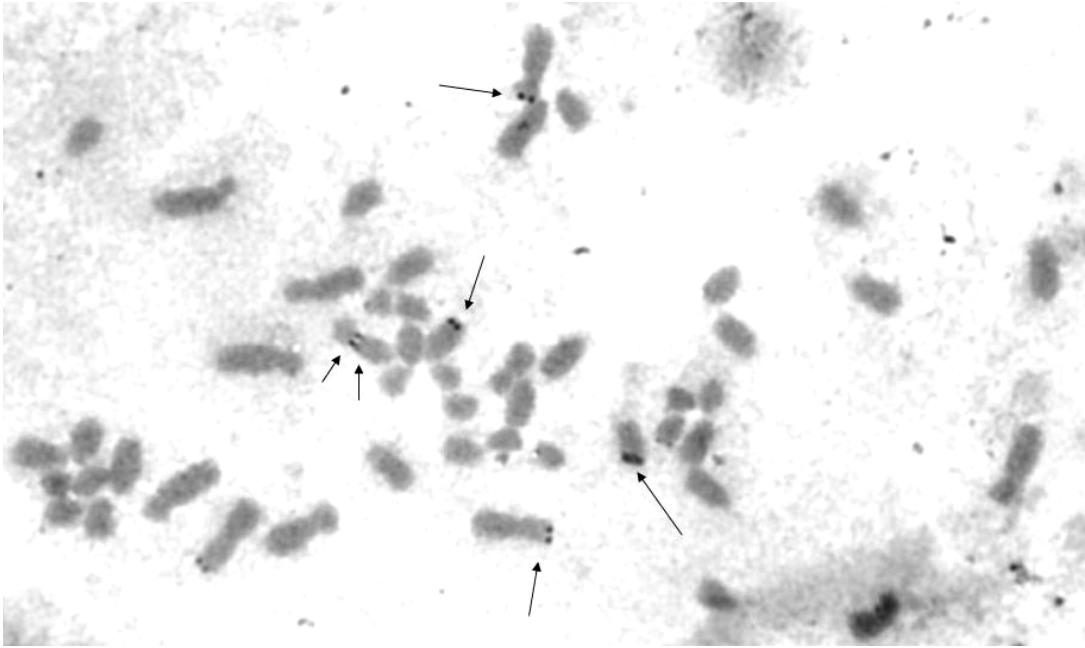


FIGURA 27- Metáfase com marcações NOR's de uma fêmea tipo Baio.

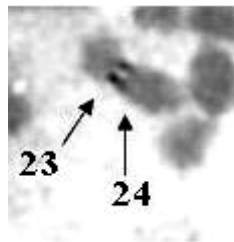


FIGURA 28- Detalhe da associação entre os cromossomos acrocêntricos 23 e 24.

## 5. CONCLUSÃO

Através do estudo citogenético, observou-se as diferenças cariotípicas existentes entre as raças Carabao e Murrah e o tipo Baio, sendo que o primeiro apresentou número diplóide  $2n=48$  XX/XY com NF=58 e os dois últimos  $2n=50$  XX/XY com NF=60.

Foram identificados três exemplares híbridos com  $2n=49$  e NF=59. Diante da análise cariotípica, pôde-se concluir que estes são resultado do cruzamento entre o tipo Baio e o Carabao. Estes indivíduos apresentaram heteromorfismo do primeiro par e ausência do membro do par 24. Além disso, foi identificada uma fêmea da raça Murrah com heteromorfismo no par sexual.

A aplicação da técnica de bandeamento G permitiu a identificação correta de cada par e revelou um padrão de bandas claras e escuras, sendo mais frequentes as bandas escuras no tipo Baio e as claras no Carabao. O padrão de bandas C revelou marcações nas regiões centroméricas dos cromossomos e a marcação C-negativa do Y no Carabao, Tipo Baio e Murrah. O tipo Baio apresentou marcações intersticiais no cromossomo X. As regiões organizadoras de nucléolo mostraram marcações em 6 pares cromossômicos no tipo Baio, onde foi encontrada uma associação entre os cromossomos 22 e 23, e em 5 pares no Carabao.

Há necessidade de mais estudos sobre a genética das subespécies *Bubalus bubalis kerebau* e *B. b. bubalis* para a identificação das possíveis anomalias cariotípicas. No caso da raça Carabao e do tipo Baio, além da identificação dessas alterações, ambos estão num processo de extinção. Por outro lado, o rebanho brasileiro do Murrah tem grande importância na produção de leite, porém sofre alta consaguinidade o que revela a necessidade de mais estudos genéticos para identificar tais alterações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, M. S. M.; EGITO, A. A.; PAIVA, S.R.; MARQUES, J. R. F.; CASTRO, S.T.R.; COSTA, M.R.; MARIANTE, A. da S. **Conservação e caracterização de búfalos no Brasil: Uma revisão da literatura.** Brasília, DF, 2006.
- ALBUQUERQUE, M. S. M. **Marcadores moleculares e variabilidade genética em búfalos no Brasil.** 111 f. Tese (Doutorado em Genética) - Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, SP, 2005.
- AMARAL, F.R.; ESCRIVÃO, S.C. **Aspectos relacionados à búfala leiteira.** Revista Brasileira Reprodução Animal. Belo Horizonte, 29 v., 111-117 p., 2005.
- ALZATE, M.M.; LÓPEZ, J.B.; MÁRQUEZ, M.E. **Evaluación cariotípica de un grupo de búfalos en Fredonia, Antioquia (Colombia).** Rev Col Cienc PEC, Colombia, 2006.
- ANDRADE, V.J. de; GARCIA, S.K. **Padrões raciais e registro de bubalinos.** Rev Bras Reprod Anim. Belo Horizonte, 29 v., 39-45 p., 2005.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE BÚFALOS. **O búfalo-carne.** Disponível em: <http://www.bufalo.com.br/frigorifico/index.htm>. Acesso em: 9 junho 2010.
- CASSIANO, L.A.P.; MARIANTE, A. da S.; McMANUS, C.; MARQUES, J.R.F.; COSTA, N.A. da. **Caracterização fenotípica de raças bubalinas nacionais e do tipo Baio.** Pesquisa Agropecuária Brasileira. 38 v., 1337-1342 p., 2003.
- CHAKRABARTI, S.; BENJAMIN, B.D. **Chromosomal studies on Indian Water Buffaloes.** Cheiron, 138-140 p, 1980.
- COCKRILL, R. **The water buffalo: A review.** Brit. Vet. J., 8-16 p, 1981.
- COCKRILL, W.R. **The buffaloes of China.** Rome, FAO, 1976.
- CRIBIU, E.P.; OBEIDAH, A., **The C-banding pattern of the Egyptian Water Buffalo (*Bubalus bubalis*).** Genet. Sel. Evol., 271 -274, 1978.
- DI BERARDINO, D.; IANNUZZI, L. **Chromosome banding homologies in swamp and Murrah buffalo.** J. Hered., 183-188 p., 1981.

EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL. **Rede Animal**. Disponível em: <http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/pnrg/rede-animal/nucleos-de-conservacao/banco-de-germoplasma-animal-da-amazonia-bagam-1/nucleos-de-conservacao/bubalinos-tipo-baio>. Acesso em: 10/06/2010 às 22:00h.

FAO (FAO. Produção Animal e Saúde, 004) **O Búfalo**. Brasília, DF: MARA: ABCB, 320 p., 1991.

FISCHER, H.; ULBRICH, F. **Chromosomes of the Murrah Buffalo and its Crossbreds with the Asiatic Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*)**. Z. Tierzucht. 84:110-114, 1968.

FONSECA, W. **O Búfalo: Sinônimo de Carne, Leite, Manteiga e Trabalho** Coleção Brasil Agrícola. 4<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Ícone, 47–48 p., 1986.

GAYLORD, G.S. **The principles of classification and a classification of mammals**. Bulletin of the American Museum of Natural History, 1–350 p., 1945.

GIROLAMO, A. de. **Über das Verhalten der chromosomen beim Büffeln**. Acta Anatômica, 323-330, p., 1957.

GUERRA, M. **Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al*** Rev. Bras. Genet. 9 v., 741-743 p., 1986.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ed. FUNPEC. Ribeirão Preto, 191 p., 2002.

HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. **Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method**. Experientia, 1014-1015 p., 1980.

LEDESMA, M.A.; GARNERO, A.V.; GUNSKI, R.J. **Análise do cariótipo de duas espécies da família Formicariidae (Aves, Passeriformes)**. Ararajuba, 1v.15-19 p., 2002.

MACGREGOR, R.. **The Domestic Buffalo**. The Veterinary Record. 53 v., 443-450 p., 1941.

MARIANTE, A. S.; MCMANUS, C.; MENDONÇA, J. F.; **Country report on the state of animal genetic resources**. Brasília: Embrapa/Genetic Resources and Biotechnology, 121 p., 2003.

MARQUES, J. R. F.; WILHAM, J.; RAMOS, A.A. **Cytogenetics of domestic buffaloes (*Bubalus bubalis* L.)** General Articles, 43 v., 230-235 p., 1991

MARQUES, J. R. F.; CAMARGO JR, R.N.C.; MARQUES, L.C.; RODRIGUES, A.E. **Bubalinocultura no Brasil: Criação, Melhoramento e Perspectivas**, 2006.

MARQUES, J. R. F.; COSTA, M. R.; EGITO, A. A.; MARIANTE, A. da S.; ALBUQUERQUE, M. S. M. **Conservation of genetic resources of the small populations of domestic animal of the Amazon Region in Brazil.** Animal Genetic Resources Information, 33 v., 31-40 p., 2003.

MARQUES, J. R. F.; DIAS, A. V. S.; TEIXEIRA, J. C.; CASSIANO, L. A. P. **Origem, domesticação e classificação zoológica.** In: MARQUES, J. R. F. (Ed.). **Búfalos: o produtor pergunta, a Embrapa responde.** Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, (Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. Coleção 500 Perguntas, 500 Respostas), 2000.

MASON, I. L. **A World Dictionary of Livestock Breeds, Types and Varieties.** CAB International, Wallingford, Oxford, UK. 1996.

MIRANDA, W. C. **Criação de Búfalos no Brasil.** Editora dos Criadores, São Paulo, 15–39 p., 1986.

MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLINAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. **Chromosome preparations of leukocytes cultured From Human perihelal blood.** Exp. Cell Res. 20 v., 613-616 p., 1960.

NASCIMENTO, C.; CARVALHO, L. O. M. **Criação de Búfalos: Alimentação, Manejo, Melhoramento e Instalações.** Brasília: EMBRAPA-SPI, 403 p., 1993.

PERERA, B.M.A.O.; ABEYGUAWARDENA, H.; VALE, W. G.; CHANTALAKHANA, C. **Livestock and wealth creation: Improving the husbandry of animals kept by poor people in developing countries.** Livestock Production Programme. Natural Resources International Lida, 2005.

ROSA, B. R. T. **Introdução de búfalos no Brasil e sua aptidão leiteira.** Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, Publicação científica da faculdade de medicina veterinária e zootecnia de garça/famed Ano iv, número, 08, janeiro de 2007.

SEABRIGHT, M. **A rapid banding technique for human chromosomes.** Lancet ii: 971-972 p., 1971.

SIMPSON, G.G. **The principles of classification of mammals.** Bull. Amer. Mus. Nat. Hist., N.Y., 85 v., 1-350 p., 1945.

TOLL, G.L.; HALNAN, C.R.F. **The Giemsa banding pattern of the Australian swamp buffalo (*Bubalus bubalis*): Chromosome homology with other Bovidae.** Can. J. Genet. Cytol. 18 v., 311-324 p., 1976.

TONHATI, H.; DUARTE J. M. C.; MUÑOZ, M. F. C.; OLIVEIRA, J. A. de; MACHADO, D. F. B.; OLIVEIRA, J. F. S. de. **Parâmetros Genéticos para a Produção de Leite em Bubalinos no Estado de São Paulo.** In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Porto Alegre, RS. Anais Barueri, SP. Videolar, 1999.

TONHATI, H.; MUÑOZ, M.F.C.; OLIVEIRA, J.A.de; DUARTE, J.M.C.; FURTADO, T.P.; TSEIMAZIDES, S.P. **Parâmetros genéticos para a produção de leite, gordura e proteína em bubalinos.** Revista Sociedade Brasileira de Zootecnia. Viçosa, 29 v., 1320-1325 p., 2000.

ULBRICH, F.; FISCHER, H. **Die Chromosomen des Asiatischen Wasserbüffels (*Bubalus bubalis*) und des Afrikanischen Büffels (*Syncerus caffer*).** Z. Tierzüchtg, Zuchtgsbiol., 219-223p, 1967.

ZAVA, M.A.R.A. **Produção de Búfalos.** Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1984.

ZEUNER, F.E. **A History of Domesticated Animals.** London, 344 p., 1963.