

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**  
**CAMPUS SÃO GABRIEL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA E MOLECULAR DE BUBALINOS DA  
RAÇA CARABAO, DO TIPO BAIO E HÍBRIDOS, MANTIDOS EM  
CONSERVAÇÃO NO BRASIL**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**TIAGO MARAFIGA DEGRANDI**

**São Gabriel**  
**2013**

**TIAGO MARAFIGA DEGRANDI**

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA E MOLECULAR DE BUBALINOS DA  
RAÇA CARABAO, DO TIPO BAIO E HÍBRIDOS, MANTIDOS EM  
CONSERVAÇÃO NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa *Campus* São Gabriel, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Analía Del Valle Garnero

**São Gabriel  
2013**

Degrandi, Tiago Marafiga

Caracterização cromossômica e molecular de bubalinos da raça Carabao, do tipo Baio e híbridos, mantidos em conservação no Brasil/Tiago Marafiga Degrandi. 04/03/2013. 67f

Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Pampa, 2013.

Orientação: Dr<sup>a</sup>. Analía Del Valle Garnero.

1. Citogenética. 2. Microsatélites. 3. NORs.

**TIAGO MARAFIGA DEGRANDI**

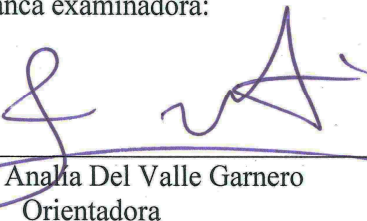
**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA E MOLECULAR DE BUBALINOS  
DA RAÇA CARABAO, TIPO BAIO E HÍBRIDOS, MANTIDOS EM  
CONSERVAÇÃO NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa — UNIPAMPA, *Campus* São Gabriel, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Genética

Dissertação defendida e aprovada em: 04 de março de 2013.

Banca examinadora:



---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Analia Del Valle Garnero  
Orientadora  
Universidade Federal do Pampa- UNIPAMPA



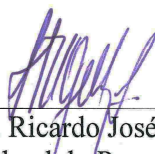
---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Vera Lúcia da Silva Valente Gaiesty  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS



---

Prof. Dr. Thales Renato Ochotorena de Freitas  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS



---

Prof. Dr. Ricardo José Gunski  
Universidade Federal do Pampa- UNIPAMPA

Dedico esta dissertação aos meus pais e minha irmã pela fonte de amor inesgotável, incentivo, compreensão e constante presença em todos os momentos de minha vida.

## AGRADECIMENTO

A Professora Dr<sup>a</sup>. Analía Del Valle Garnero e o Professor Dr. Ricardo José Gunski pela orientação, amizade, pelo apoio, e principalmente pelo incentivo para que eu realizasse o curso de mestrado;

Aos técnicos e pesquisadores da EMBRAPA, em especial ao Dr. José Ribamar Felipe Marques pelo fornecimento das amostras;

Ao Professor Dr. Valdir Marcos Stefenon pela amizade e colaboração no desenvolvimento desta dissertação;

A Dr<sup>a</sup>. Yanina Panzera e Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira, por me apresentarem novas ferramentas de estudo especialmente pelo ensino e colaboração na realização da técnica de FISH;

A técnica Dr<sup>a</sup>. Adriana Koslovski Sassi pela amizade e constante ajuda no desenvolvimento e amadurecimento do projeto e nas atividades de laboratório;

Aos professores do PPGCB, minha gratidão pela forma de conduzir o curso em todas as etapas;

A CAPES pela bolsa concedida.

A todos os colegas do curso de mestrado pelo convívio e pelos momentos de amizade em especial Rafael, Lilian, Jordana, Alex, Leici, Lucio, Cris, Grazi, Thiago, Angela, Ana, Estefania;

E por último, mas não menos importantes aquelas pessoas que direta ou indiretamente participaram/acompanharam minha trajetória de mestrando não só dentro da universidade, mas também como amigos que fiz durante este período.

Muito obrigado!

## RESUMO

Os búfalos do tipo Baio e da raça Carabao encontrados na Ilha de Marajó-Pará/ Brasil constituem duas pequenas populações com número muito reduzido de exemplares, o que os torna extremamente suscetíveis à extinção. De acordo com estudos citogenéticos, estes animais são divididos em dois grupos: os búfalos de rio que apresentam  $2n=50$ , e os búfalos de pântano com  $2n=48$ . O cruzamento entre ambos resulta na formação de híbridos viáveis e férteis com  $2n=49$ , que apresentam na descendência a formação de animais  $2n=48$ ,  $49$  ou  $50$ . Neste estudo foi avaliado um total de 110 animais (45 do tipo Baio, 50 da raça Carabao e 15 descendentes de uma fêmea híbrida), todos pertencentes ao programa brasileiro de conservação dos recursos genéticos. Utilizaram-se técnicas de citogenética clássica e de biologia molecular, para investigar possíveis alterações cromossômicas, a hibridização e aspectos evolutivos entre os búfalos. Para os búfalos do tipo Baio foi observado  $2n=50$ , para a raça Carabao  $2n=48$ , em três exemplares se observou  $2n=49$  confirmando a ocorrência de hibridização entre os animais do programa. Para alguns descendentes da linhagem híbrida foi observado número diplóide e cariótipo típico de animais da raça Carabao. As análises através de marcadores microssatélites CSSM06, 8, 42, 66 identificaram 13, 14, 6 e dois, o locus Hel9 identificou tres animais respectivamente, como híbridos. Estes resultados foram corroborados com os dados de registro genealógico do programa de conservação. Além disso, caracterizaram-se também as regiões organizadoras do nucléolo- Ag-NORs e FISH 18s, sendo observada uma divergência do número de NORs entre o tipo Baio, presente nos cromossomos 3p, 4p, 6, 21, 23 e 24, e a raça Carabao 4p, 6, 20, 22 e 23, sendo esta resultante da perda do sítio presente no cromossomo 4p ancestral dos búfalos de rio. Para o híbrido F1 foram observados os 11 sítios NORs sendo expressos e em associação, correspondendo as NORs de seus parentais. As análises genéticas realizadas neste trabalho foram implementadas no programa conservação como ferramenta auxiliar para a seleção dos animais. Além disso, estes resultados contribuem com informações sobre aspectos evolutivos entre os búfalos e o fenômeno da hibridização.

Palavras- chave: Cromossomos, biometria, bandas C, conservação genética, seleção.

## ABSTRACT

The buffaloes type Baio and race Carabao found in island Marajó-Pará/Brazil are two small populations with very few copies, which makes them extremely susceptible to extinction. According to cytogenetic studies, these animals are divided into two groups of buffalo river that have  $2n = 50$  and swamp buffaloes with  $2n = 48$ , respectively. The cross between both results in formation of hybrids with  $2n = 49$  viable and fertile, showing the formation in the offspring of animals  $2n = 48, 49$  or  $50$ . This study evaluated a total of 110 animals (45 of type Baio, 50 and 15 Carabao breed offspring of a female hybrid), all belonging to the Brazilian program of conservation genetic resources. We used techniques of classical cytogenetics and molecular biology, to investigate possible chromosomal changes, hybridization and evolutionary aspects of the buffalo. For the buffaloes type Baio was observed  $2n = 50$  to  $2n =$  Carabao race 48, in tree was observed  $2n = 49$  confirming the occurrence of hybridization between animals of the program. For some descendants of the hybrid strain was observed number diploid karyotype and typical breed animals Carabao. The analyzes of microsatellite markers by CSSM06, 8, 42, 66 identified 13, 14, 6 and two Hel9 locus identified three animals, respectively, as hybrids. These results were corroborated with data from genealogical record of the conservation program. Moreover, also characterized the nucleolus organizer regions of Ag-NOR and FISH-18s, being observed a divergence in the number of NORs between type Baio, present on chromosomes 3p, 4p, 6, 21, 23 and 24, and race Carabao 4p, 6, 20, 22 and 23, this being due to the loss of this site on chromosome 4p ancestor of the buffalo river. For the F1 hybrid were observed NORs the 11 sites being expressed and in combination, corresponding NORs of their parents. Genetic analyzes performed in this study were implemented in the conservation program as an auxiliary tool for the selection of animals. Furthermore, these results contribute information on evolutionary aspects between the buffalo and the phenomenon of hybridization.

Key-Words: Chromosomes, biometrics, C banding, conservation genetics, selection



## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figure 1: Karyotype of female type Baio (*B. bubalis bubalis*) a  $2n=50$ . The first five chromosome pairs are submetacentric and the rest are telocentric. .... 20

Figure 2: Karyotype of a  $2n=48$  Carabao breed (*B. bubalis kerebau*) male. The first pair is metacentric, the second to the fifth pairs are submetacentric and the rest of the chromosome complement is telocentric..... 21

Figure 3: Karyotype of a female F1 hybrid (Carabao breed x Baio type) characterized as presenting chromosome number  $2n=49$ . There is a trivalent on the first position between chromosome 1 in swamp buffalo and chromosomes 4 and 9 in river buffalo. .... 25

Figure 4: Karyotype of a female F2 specimen with chromosome number  $2n=48$  and heteromorphism on the first pair..... 26

Figure 5: a) Metaphase with conventional staining for a carabao breed male; b) Sequential c-banding; the arrows indicate the X and Y sex chromosomes..... 28

Figure 6: Karyotype showing the G-banding pattern and the homology between the chromosomes of river and swamp buffalo, where each chromosome pair was assembled using the first chromosome of the Carabao breed and the second chromosome of the Baio type. \* indicates the formation of a trivalent between chromosome 1 in swamp buffalo, 4p and 9 in river buffalo ..... 30

### Capítulo 2

Figura 1: Análise de cordenadas principal dos grupos genéticos tipo Baio, raça Carabao e híbridos..... 43

Figura 2: Miscigenação racial observada entre animais da raça Carabao e tipo Baio..... 45

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 3

Figure 1: Sequential analysis of Giemsa/Ag-NOR in one female of Baio type  $2n=50$ ; The arrows point to the NORs in the telomérica position of chromosomes 3p, 4p, 6, 21, 23 and 24. In addition, it is observed expression of the homologous 4 e 6 pairs ..... 55

Figure 2: Sequential analysis of Giemsa/Ag-NOR in one representative male from the Carabao breed  $2n=48$ ; The arrows point to NORs in the telomeric position of the chromosomes 4p, 6, 20, 22 and 23. In addition it is observed the expression of the homologous 4p, 20 e 23 and a triple association among chromosomes 4p, 20, 22 and a double association between chromosomes 4p and 23. .... 56

Figure 3: Sequential analysis of Giemsa/Ag-NOR in one representative female from crossbreed F1 with  $2n=49$  chromosomes; In b, it is observed 11 chromosomes being expressed. Eight of these are presented in association as indicated by the arrows\*; In d, 5 chromosomes are expressed and one triple association is observed among 3p e 4p e 23; In f, it is observed 7 chromosomes expressed, being three chromosomes associated in 4p, 6 and 23.57

Figure 4: Metaphases stained with DAPI (blue) in FISH analysis with 18s probe (signals red) in three cytotypes the buffaloes: a) Baio type  $2n=50$ , 12 signals; b) Carabao breed  $2n=48$ , 10 signals and c) crossbreed  $2n=49$ , 11 signals..... 58

Figure 5: FISH analysis showing the telomeric sequence of a representative metaphase of one female crossbreed with  $2n=49$  chromosomes. The chromosomes are stained with DAPI (blue) and the telomérica probes are the red signals in the telomeres of met/submetacentric and telocentric chromosomes. The arrow point to the position of tandem fusion (4p;9) of chromosome 1 from swamp buffaloes which do not show telomeric sequence.. ..... 59

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Table 1: partial genealogy of specimens descendent from a female identified as an f1 hybrid (2n=49) between Carabao breed and Baio type buffalo, showing the variation in diploid number (2n) through generations f2, f3 and f4 and the morphological characteristics of the karyotype..... 23

Table 2: chromosome biometry of Baio type buffalo (*b. Bubalis bubalis*), and Carabao breed buffalo (*b. Bubalis kerebau*), showing the averages lengths of the long arm (q), short arm (p), total length (q+p) and the centromeric index (ci) of the autosomes and sex chromosomes and their respective morphology. .... 24

### Capítulo 2

Tabela 1: Índices de diversidade genética de cinco locus microssatélites para três grupos de búfalos, raça Carabao, tipo Baio e híbridos..... 42

Tabela 2: Alelos privados para cinco locus microssatélites para búfalos da raça Carabao e do tipo Baio. .... 44

Tabela 3: Genealogia parcial de um grupo de búfalos descendentes de uma fêmea híbrida f1 (2n=49), número cromossômico e peso molecular dos alelos para cinco locus microssatélites através das gerações F1-F4..... 46

### Capítulo 3

Table 1: Chromosome homeology containing NORs of different Bovidae species and crossbreed buffaloes..... 61

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....  | 13 |
| <b>2 CAPÍTULO 1-</b> Cytogenetic identification of four generations of crossbred buffalo (river x swamp) in a genetic conservation program on the island of Marajó/Brazil.....             | 15 |
| 2.1 Abstract .....   | 16 |
| 2.2 Introduction .....   | 17 |
| 2.3 Material and Methods.....  | 18 |
| 2.3.1 Cultivation of lymphocytes .....   | 18 |
| 2.3.2 Cytogenetic analyses .....   | 19 |
| 2.4 Results .....  | 19 |
| 2.5 Discussion.....  | 31 |
| 2.6 Funding.....   | 33 |
| 2.7 References .....   | 34 |
| <b>3 CAPÍTULO 2-</b> Marcadores microssatélites aplicados na identificação de búfalos híbridos (Carabao x tipo Baio) das gerações F1, F2, F3 e F4, mantidos em conservação no Brasil ..... | 36 |
| 3.1 Resumo.....  | 37 |
| 3.2 Introdução .....   | 38 |
| 3.3 Material e Métodos .....   | 39 |
| 3.3.1 Seleção de Microssatélites.....  | 40 |
| 3.3.2 Análises genéticas .....   | 41 |
| 3.4 Resultados e Discussão .....   | 41 |
| 3.4.1 Diversidade genética .....   | 41 |
| 3.4.2 Grupos Genéticos.....  | 43 |
| 3.4.3 Alelos privados.....   | 43 |
| 3.4.4 Identificação dos Híbridos.....  | 45 |
| 3.5 Conclusões.....  | 47 |
| 3.6 Agradecimentos .....   | 47 |
| 3.7 Agradecimentos .....   | 47 |
| 3.8 Referências bibliográficas .....   | 47 |
| <b>4 CAPÍTULO 3-</b> Characterization of transcriptionally active NORs, distribution of telomeric sequence and ribosomal gene 18S in river, swamp and its crossbreed buffaloes .....       | 49 |
| 4.1 Abstract .....   | 50 |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.2 Introduction .....                               | 51        |
| 4.3 Material and Methods.....                        | 52        |
| 4.3.1 Samples and cell culture.....                  | 52        |
| 4.3.2 Ag-NORs analysis.....                          | 52        |
| 4.3.3 FISH ribosomal sequence 18S.....               | 52        |
| 4.3.4 FISH Telomeric sequence1 .....                 | 53        |
| 4.4 Results .....                                    | 53        |
| 4.4.1 Sequential analysis of Giemsa and Ag-NOR ..... | 53        |
| 4.4.2 18S FISH analysis.....                         | 53        |
| 4.4.3 Telomeric FISH analysis .....                  | 53        |
| 4.5 Discussion.....                                  | 60        |
| 4.6 Funding.....                                     | 62        |
| 4.7 Acknowledgements.....                            | 62        |
| 4.8 References .....                                 | 62        |
| <b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>                  | <b>64</b> |
| <b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAL.....</b>       | <b>65</b> |

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A crescente demanda por alimentos e a corrida ao desenvolvimento vem exercendo forte pressão sobre os sistemas agropecuários de criação, sobre o meio ambiente e as espécies domésticas que são utilizadas na produção. Diante disso, uma das alternativas para minimizar tal situação vem sendo a busca por grupos genéticos mais produtivos com maior rendimento em curtos períodos de tempo e também espaço, sendo estes resultantes da aplicação de acentuados programas de melhoramento genético (EGITO *et al.*, 2002).

Assim sendo, muitas das espécies que constituíram anteriormente a base da produção animal nacional, ditas “naturalizadas” vem sendo substituídas ou absorvidas por cruzamentos com outras raças recentemente introduzidas e ou melhoradas. Dessa forma, aquele recurso genético já adaptado há alguns séculos às condições de clima, vegetação e doenças que aqui foram expostos, está sendo perdido, surgindo assim a preocupação com a diversidade genética que possamos estar perdendo a caminho do desenvolvimento (MARIANTE, 1993).

Em 1991, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) elaborou um programa mundial cujo objetivo foi realizar um levantamento sobre a situação das principais espécies de interesse econômico em diversos países. Do mesmo modo, no Brasil, foi criado em 1983 um programa nacional de conservação dos recursos genéticos animais, no qual estão inseridos diversos núcleos animais, com raças de asininos, equinos, ovinos, caprinos, bovinos e bubalinos (EGITO *et al.*, 2002).

Atendendo esta necessidade, a Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária (EMBRAPA) vem desenvolvendo ações com algumas das raças de iminente extinção, visando à conservação dos recursos genéticos *in situ* e *ex situ*, além do melhoramento deste patrimônio genético e o uso sustentável (MARQUES *et al.*, 2008).

Dentre os grupos genéticos inseridos neste programa, destacam-se os búfalos domésticos (*Bubalus bubalis*), que se caracterizam como excelente alternativa para produção de carne e leite. Quando comparado com outros bovinos, apresentam maior rendimento e melhor qualidade de seus derivados, conferindo-lhes vantagens frente às tendências mundiais de mercado em relação aos padrões de produção e consumo sustentáveis (MARQUES *et al.*, 2003).

No Brasil, os búfalos foram introduzidos por volta de 1889, inicialmente na ilha de Marajó e hoje estão presentes cinco diferentes grupos genéticos de bubalinos: a raça Murrah,

Mediterrânea, Jafarabadi, Carabao e o tipo Baio não reconhecido como raça pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos- ABCB (ALBUQUERQUE *et al.*, 2006).

Entre estes, a raça Carabao e tipo Baio da ilha de Marajó-Pará, representam dois grupos genéticos distintos, os búfalos de rio e de pântano respectivamente. Além disso, estes animais encontram-se em número reduzido de exemplares, pois, não mais que 500 exemplares representam estes grupos no país, o que os torna extremamente suscetíveis à extinção, necessitando de medidas rápidas para a conservação deste patrimônio genético (MARQUES *et al.*, 2003; MARQUES *et al.*, 2008).

Do ponto de vista citogenético, o tipo Baio e a raça Carabao distinguem-se facilmente por apresentar número diplóide 50 e 48, respectivamente (ULBRICH & FISCHER, 1967; FISCHER & ULBRICH, 1968; BERARDINO & IANNUZZI, 1981; BONGSO & HILMI, 1982, DEGRANDI *et al.*, 2010). No entanto, apesar destas divergências cariotípicas, a hibridização entre ambos é viável e fértil, resultando a formação de exemplares F1 identificados por apresentar  $2n=49$ . Quando realizado o retrocruzamento do híbrido com seus parentais, ocorre a formação de exemplares com  $2n=50$ , 48 ou 49. Tal fato tem sua origem na formação de gametas  $n=24$  e  $n=25$  na meiose que exemplares híbridos F1 apresentam (HARISAH *et al.*, 1989).

Assim sendo, animais com cariótipos  $2n=50$  ou 48 podem ser descendentes de híbridos F1 e apresentar ou não variações em seus cariótipos. Com isso, surge a necessidade de uma avaliação não só cromossômica, mas também molecular dos animais da raça Carabao e do tipo Baio mantidos em conservação na ilha de Marajó, a fim de identificar a presença de hibridização nestes exemplares e possíveis marcadores genéticos para sua identificação.

## **2 CAPÍTULO 1**

### **Cytogenetic identification of four generations of crossbred buffalo (river x swamp) in a genetic conservation program on the island of Marajó/Brazil**

Manuscrito formatado para o periódico Journal Of Applied Genetics

ISSN: 1234-1983 (Versão impressa)

ISSN: 2190-3883 (Versão eletrônica)



**Cytogenetic identification of four generations of crossbred buffaloes (river x swamp) in  
a genetic conservation program on the island of Marajó/Brasil**

**T. M. Degrandi · J. R.F. Marques · R. J. Gunski · M. R.T. Costa · R. B. Reimche · L. C.  
Marques · M. R. Figueiró · A. D.V. Garnero**

**2.1 Abstract** The domestic buffalo is divided into two groups; the river buffalo, which has chromosome number  $2n=50$ , and the swamp buffalo, which  $2n=48$ . Crossbreeding between these results in the formation of F1 generation specimens which have  $2n=49$  and that are both viable and fertile. The objective of this study was to cytogenetically evaluate Carabao breed and Baio type buffalo maintained in conservation in Brazil. To this end, blood samples were taken from 20 animals from the Carabao breed, 20 from the Baio type and 10 animals belonging to a lineage descending from a female hybrid. Cultivation of lymphocytes was used to obtain metaphases. Chromosome number and biometry, C, G-banding patterns were determined. The Baio type presented chromosome number  $2n=50$  and the Carabao breed presented  $2n=48$ . For the specimens descending from a female F1 hybrid with  $2n=49$ , the formation of specimens with chromosome numbers of  $2n=48$  and  $2n=49$  were observed, showing morphological variations particularly in the first pair of chromosomes. The chromosome number  $2n=49$  confirms crossbreeding between the animals in the conservation program, the exclusion of these animals from original herds therefore being recommended in order to keep the genotype of each genetic group separate.

**Key words:** Chromosomes, biometry, C-bands, Amazônia, selection.

**T. M. Degrandi (✉) · R. J. Gunski · R. B. Reimche · A. D.V. Garnero**

Federal University of Pampa (Unipampa), Avenida Antônio Trilha, 1847, CEP 97300-000,  
São Gabriel - Rio Grande do Sul, Brazil; e-mail: tdegrandi@hotmail.com

**J. R.F. Marques · M. R.T. Costa · M. R. Figueiró ·**

Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) - Eastern Amazon Unit. Trav. Dr.  
Enéas Pinheiro s/nº Caixa Postal, 48, CEP 66095-100, Belém - Pará, Brazil

**L. C. Marques**

Federal University of Pará (UFPA), Belém - Pará.

## 2.2 Introduction

Domestic buffalo or water buffalo belong to the *Bubalus bubalis* species and are divided into two subspecies according to cytogenetic characteristics and habitat: river buffalo (subspecies *bubalis*) with chromosome number  $2n=50$ , and swamp buffalo (subspecies *kerebau*) with chromosome number  $2n=48$  (Pkhadze 1939; Ulbrich and Fischer 1967). According to G-banding analysis, this karyotypic divergence is a result of a tandem fusion between chromosome 4 and 9 of the ancestral karyotype of the river buffalo, reducing the chromosome number to  $2n=48$  in swamp buffalo (Hishinuma et al. 1992; Tanaka et al. 2000).

As well as reducing the chromosome number, this causes the formation of a large metacentric chromosome 1 in swamp buffalo and the loss of a nucleolar organizing region (NOR) site, present on the short arm of ancestral chromosome 4 in river buffalo, reducing the six NOR sites to five in swamp buffalo (Di Bernardino and Iannuzzi 1981; Hishinuma et al. 1992).

Despite these karyotypic differences, these animals are not reproductively isolated and the F1 hybrid is viable and fertile, presenting karyotype  $2n=49$  and producing gametes  $n=24$  and  $n=25$  during meiosis. This results in the formation of three karyotypic groups ( $2n=48$ ,  $2n=49$  and  $2n=50$ ) in successive generations F2, F3 and F4 (Fischer and Ulbrich 1968; Harisah et al. 1989, Dai et al. 1994).

In some countries such as China, crossbreeding between river and swamp buffalo has been used as an alternative tool for genetic improvement of livestock, achieving rates of production four times higher in comparison with purebred animals as a result of the vigor of the heterozygous hybrid (Cruz, 2010). However, in Brazil the Baio type buffalo (river buffalo) and the Carabao breed (swamp buffalo) are found only in small numbers and are maintained in a genetic conservation program that aims to keep these groups separate, conserving their genetic heritage *in situ* as well as *ex situ* (Egito et al. 2002).

In Brazil there has been a consistent effort to elucidate facts relating to the cytogenetics of domestic buffalo (Marques and Jorge, 1991). In view of this, Degrandi *et al.* (2010) analyzed the karyotype of 25 Baio type animals and 30 Carabao breed animals for the selection of breeding stock for the buffalo conservation program. They identified the presence of specimens with karyotype  $2n=49$ , suggesting the occurrence of crossbreeding between Baio type and Carabao breed animals in the program. In addition, they observed that these animals belonged to the lineage of a female including a total of 26 descendants. In view of

this, cytogenetic analyses were used as a primary tool for the selection of buffalo, given the need to identify the chromosome number of each of the specimens maintained in conservation.

Therefore, the objective of this study was to apply cytogenetic analyses using conventional staining, G- and C-banding and chromosome biometry with the aim of characterizing Baio type and Carabao breed buffalo maintained in conservation in Brazil, as well as characterizing chromosomal markers for the identification of their respective hybrids through generations F1, F2, F3 and F4.

### **2.3 Materials and Methods**

In order to carry out this study, samples were taken from 50 specimens belonging to the Carabao breed and 45 to the Baio type, all of which coming from the in situ animal genetic resources conservation program in Brazil: large species - Code SEG 01.06.01.06.00.04/Animal Network, developed at the Eastern Amazon Animal Germplasm Bank (BAGAM) in Salvaterra on the island of Marajó, belonging to the Eastern Amazon Unit of the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) – Belém, Pará.

In addition, samples were taken from 10 animals belonging to a lineage descending from a female phenotypically identified as of the Carabao breed with karyotype  $2n=49$  (Degrandi et al. 2010), this being the result of crossbreeding between animals of the Baio type and the Carabao breed. The animals evaluated from this lineage were distributed over generations F1 to F4 according to genealogical data provided by the conservation program.

#### **2.3.1 Cultivation of lymphocytes**

Metaphases were obtained through the cultivation of lymphocytes (Moorhead et al. 1960). To do this, 10 ml of peripheral blood was sampled from each specimen using in heparin vacuum blood collection tubes. The samples were stored at 4°C in order to be transported from the island of Marajó in Pará to the Biology laboratory at the Federal University of Pampa (UNIPAMPA), located in the city of São Gabriel in the state of Rio Grande do Sul, totaling 72 hours from the time of collection until the cultures were performed.

Each cell culture was performed in aseptic conditions using 1 ml lymphocyte solution taken from the peripheral blood samples in 10 ml RPMI 1640 medium supplemented with 20% fetal calf serum, 0.05 ml penicillin/streptomycin and 0.1 ml phytohemagglutinin. After 71 hours, the cells were treated with 0.01ml 0.05% colchicine solution for one hour and a hypotonic solution of 0.75M KCl for 20 minutes and then fixed with a 3:1 methanol:acetic acid solution.

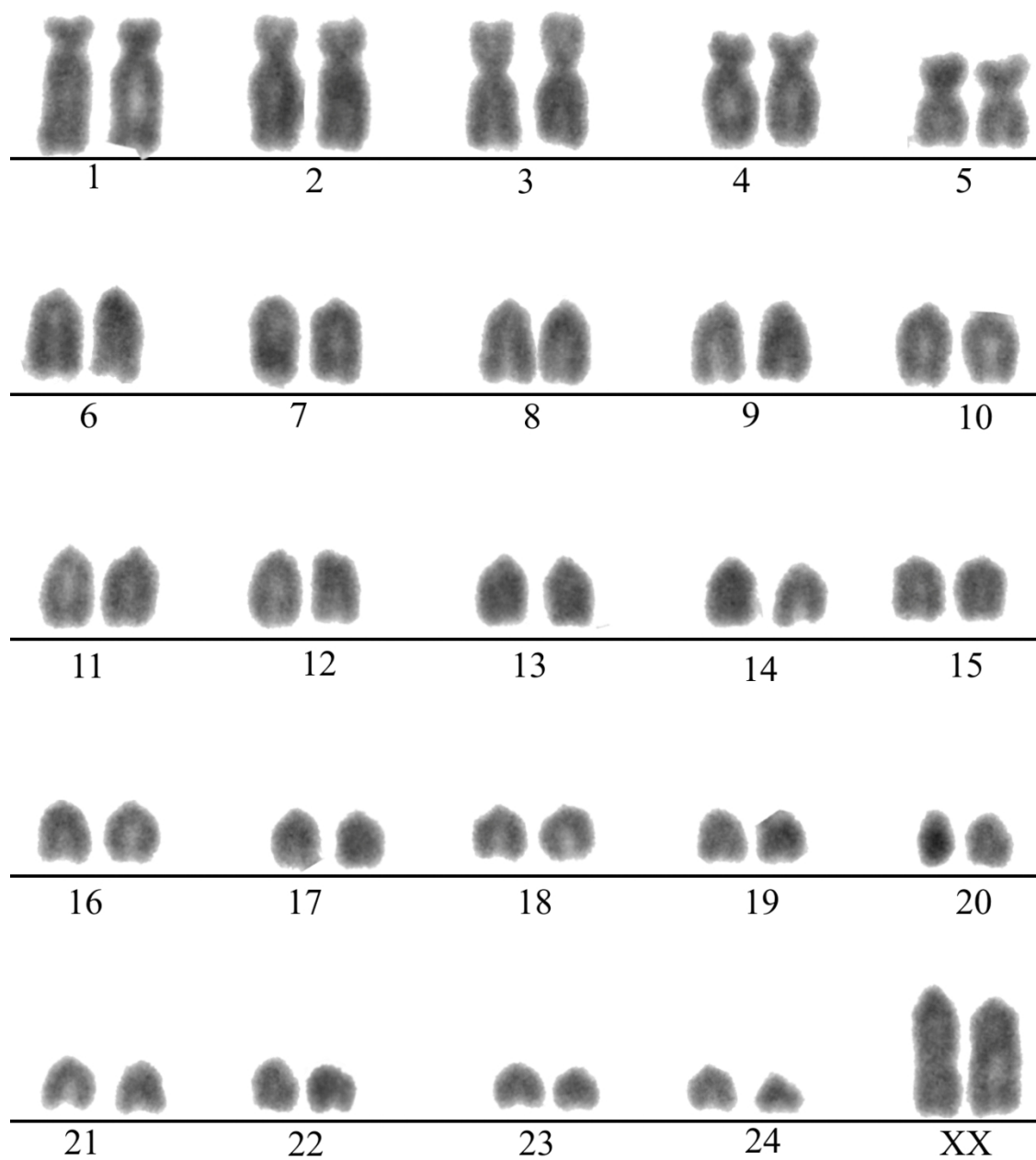
### **2.3.2 Cytogenetic analyses**

The chromosomal preparations were colored with Giemsa stain to determine the diploid number. Forty metaphases were evaluated per specimen and the best of these were photographed to assemble the karyotypes and used to carry out biometric analysis of the chromosomes.

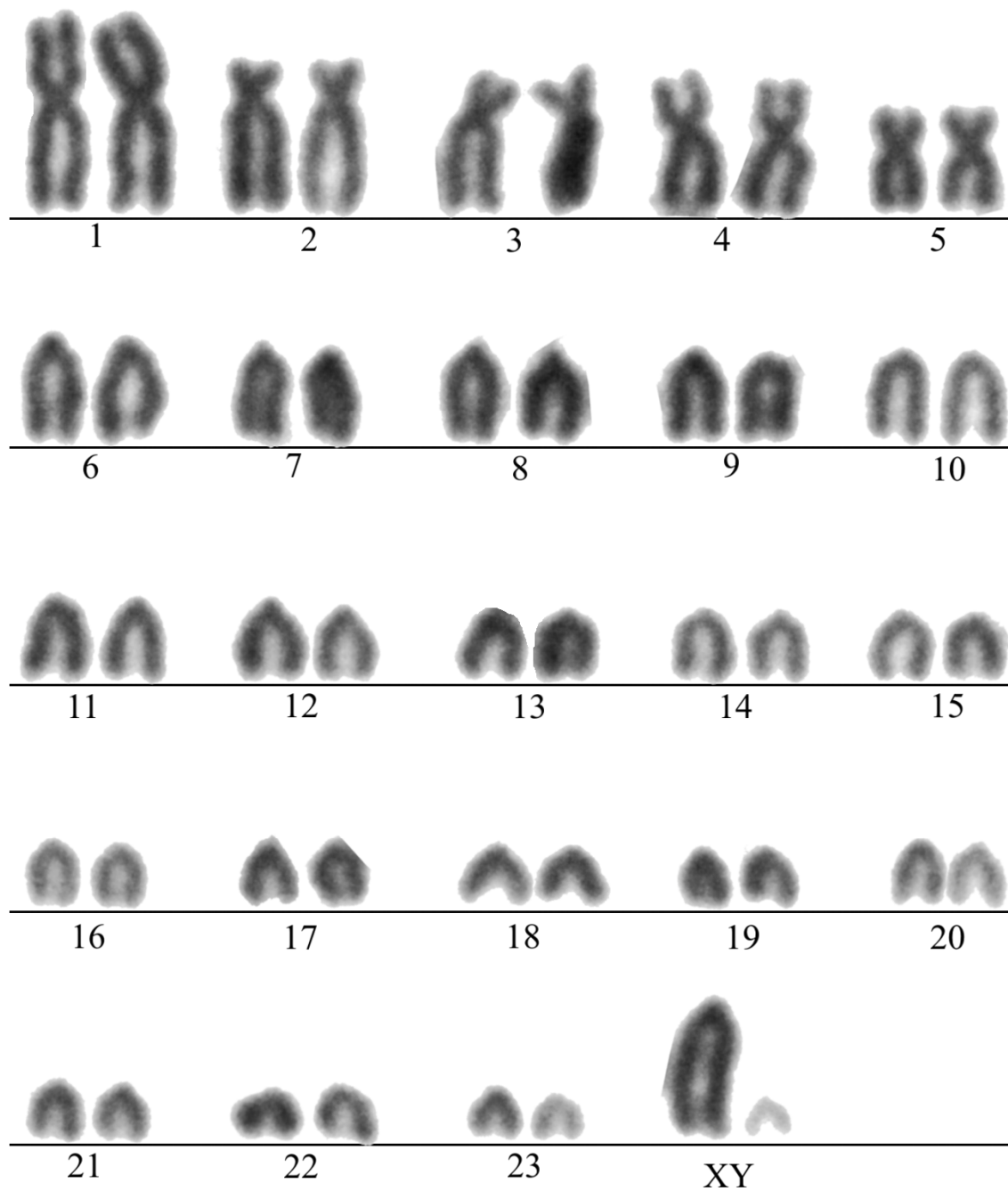
Biometric analysis was carried out using Micromesure 3.1 software with 10 measurements being carried out for each karyotypic group (Carabao and Baio type). Values for the distance between the centromere and the telomere for the short (p) and long (q) arm of each chromosome pair were estimated for the calculation of the centromeric index, and these values were grouped together in a matrix in Excel for statistical analysis of the average between the 10 measurements. Chromosome morphology was classified using the average value of the centromeric index according to the method described by Guerra (1986). In addition to these analyses, G- and C-banding techniques were used (Seabright 1971; Sumner 1972).

## **2.4 Results**

The  $2n=50$  karyotype was observed for all of the Baio type specimens evaluated (Fig. 1), these therefore belong to the river buffalo subspecies. The Carabao breed specimens presented a  $2n=48$  karyotype (Fig. 2), this being the typical chromosome number for the swamp buffalo.



**Figure 1:** Karyotype of female Baio type (*B. bubalis bubalis*) a  $2n=50$ . The first five chromosome pairs are submetacentric and the rest are telocentric.



**Figure 2:** Karyotype of a  $2n=48$  Carabao breed (*B. bubalis kerebau*) male. The first pair is metacentric, the second to the fifth pairs are submetacentric and the rest of the chromosome complement is telocentric.

According to the chromosome biometry data, (Tab. 1) the karyotypic divergence between swamp and river buffalo is restricted to the morphology of the first chromosome pair observed as metacentric in swamp buffalo and submetacentric in river buffalo. The 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> pairs are submetacentric and the rest of the chromosome complement is made up of 19 telocentric pairs in river buffalo and 18 telocentric pairs in swamp buffalo. The X and Y sex chromosomes are observed to be the largest and the smallest telocentric chromosomes within the entire complement respectively.

For the group of animals descending (Tab. 2) from the female previously identified as an F1  $2n=49$  hybrid (Fig. 3), the formation of three different karyotypes was observed: a) A  $2n=49$  karyotype characterized as presenting the pairing between chromosome 1 in swamp buffalo and chromosomes 4 and 9 in river buffalo, exactly as was seen for the F1 specimens (Fig. 3) where one specimen from the F2 generation and another from the F3 generation were observed; b) A  $2n=48$  karyotype (Figure 4) with heteromorphisms, especially in the first chromosome pair; c) A  $2n=48$  karyotype, typical of the Carabao breed, without morphological variations (Fig. 2).

**Table 1:** Chromosome biometry of Baio type buffalo (*B. bubalis bubalis*) and Carabao breed (*B. bubalis Kerebau*), showing the averages lengths of the long arm (q), short arm (p), total length (q+p) and the centrometric index (CI) of the autosomes and sex chromosomes and their respective morphology.

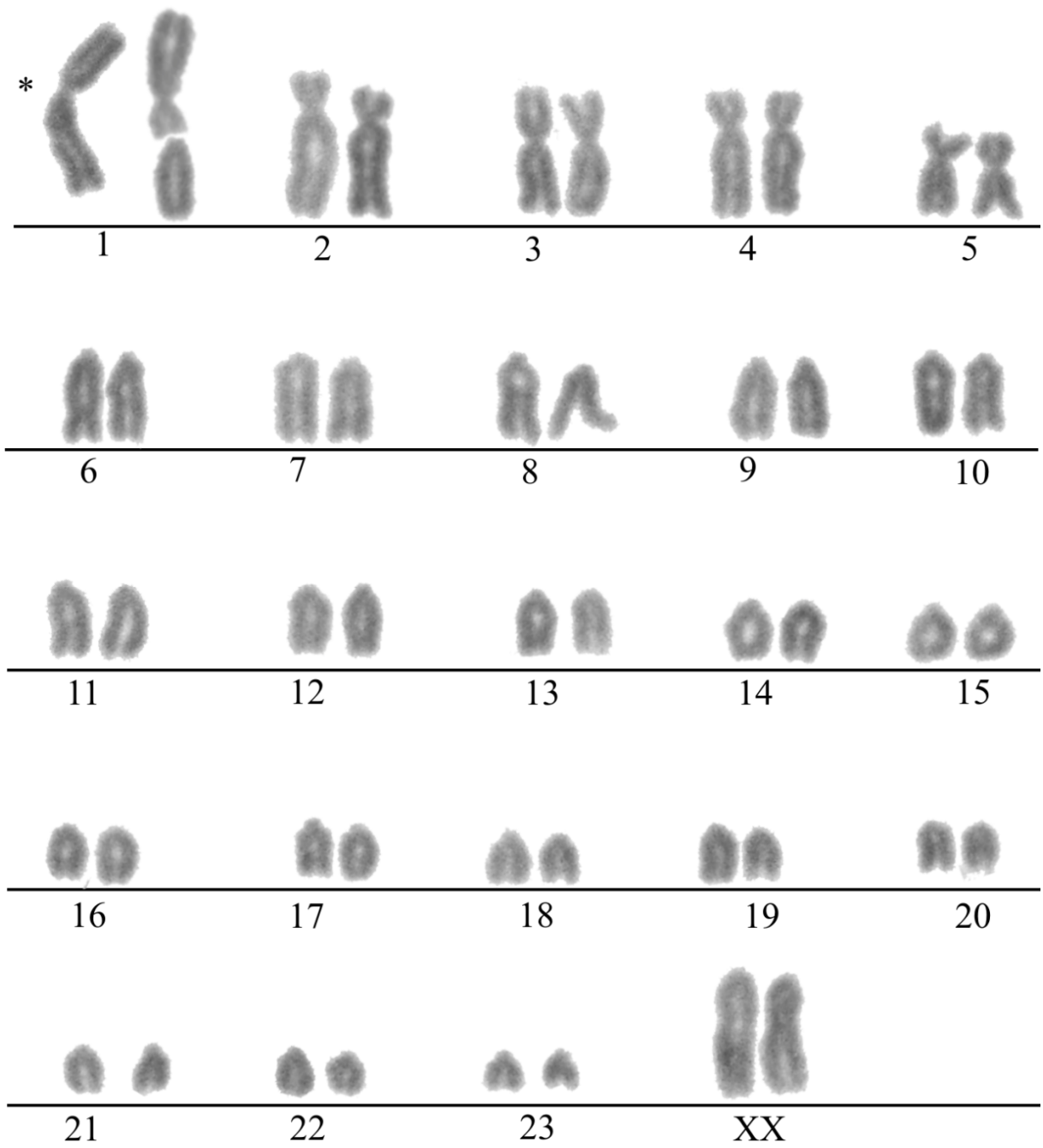
| Chromosome Pair  | Baio Type |      |       |      |                | Carabao Breed |       |       |      |                |
|------------------|-----------|------|-------|------|----------------|---------------|-------|-------|------|----------------|
|                  | q         | p    | q + p | CI   | Morphology     | q             | p     | q + p | CI   | Morphology     |
| 1 <sup>st</sup>  | 22.47     | 7.73 | 29.85 | 0.26 | Submetacentric | 26.95         | 19.69 | 46.64 | 0.42 | Metacentric    |
| 2 <sup>nd</sup>  | 19.40     | 9.46 | 28.86 | 0.33 | Submetacentric | 24.42         | 8.83  | 33.25 | 0.27 | Submetacentric |
| 3 <sup>rd</sup>  | 17.55     | 9.85 | 27.39 | 0.36 | Submetacentric | 22.41         | 9.33  | 31.74 | 0.29 | Submetacentric |
| 4 <sup>th</sup>  | 17.47     | 8.09 | 25.55 | 0.31 | Submetacentric | 20.05         | 9.58  | 29.63 | 0.33 | Submetacentric |
| 5 <sup>th</sup>  | 13.19     | 8.21 | 21.40 | 0.38 | Submetacentric | 13.17         | 7.92  | 21.09 | 0.38 | Submetacentric |
| 6 <sup>th</sup>  | 20.36     | 0.00 | 20.36 | 0.00 | Telocentric    | 22.76         | 0.00  | 22.76 | 0.00 | Telocentric    |
| 7 <sup>th</sup>  | 19.16     | 0.00 | 19.16 | 0.00 | Telocentric    | 20.90         | 0.00  | 20.90 | 0.00 | Telocentric    |
| 8 <sup>th</sup>  | 18.61     | 0.00 | 18.61 | 0.00 | Telocentric    | 19.40         | 0.00  | 19.40 | 0.00 | Telocentric    |
| 9 <sup>th</sup>  | 18.14     | 0.00 | 18.14 | 0.00 | Telocentric    | 18.97         | 0.00  | 18.97 | 0.00 | Telocentric    |
| 10 <sup>th</sup> | 17.31     | 0.00 | 17.31 | 0.00 | Telocentric    | 18.43         | 0.00  | 18.43 | 0.00 | Telocentric    |
| 11 <sup>th</sup> | 16.68     | 0.00 | 16.68 | 0.00 | Telocentric    | 18.01         | 0.00  | 18.01 | 0.00 | Telocentric    |
| 12 <sup>th</sup> | 16.13     | 0.00 | 16.13 | 0.00 | Telocentric    | 16.41         | 0.00  | 16.41 | 0.00 | Telocentric    |
| 13 <sup>th</sup> | 15.12     | 0.00 | 15.12 | 0.00 | Telocentric    | 15.89         | 0.00  | 15.89 | 0.00 | Telocentric    |
| 14 <sup>th</sup> | 14.59     | 0.00 | 14.59 | 0.00 | Telocentric    | 14.98         | 0.00  | 14.98 | 0.00 | Telocentric    |
| 15 <sup>th</sup> | 14.06     | 0.00 | 14.06 | 0.00 | Telocentric    | 14.28         | 0.00  | 14.28 | 0.00 | Telocentric    |
| 16 <sup>th</sup> | 13.53     | 0.00 | 13.53 | 0.00 | Telocentric    | 13.57         | 0.00  | 13.57 | 0.00 | Telocentric    |
| 17 <sup>th</sup> | 13.10     | 0.00 | 13.10 | 0.00 | Telocentric    | 12.94         | 0.00  | 12.94 | 0.00 | Telocentric    |
| 18 <sup>th</sup> | 12.58     | 0.00 | 12.58 | 0.00 | Telocentric    | 12.20         | 0.00  | 12.20 | 0.00 | Telocentric    |
| 19 <sup>th</sup> | 11.93     | 0.00 | 11.93 | 0.00 | Telocentric    | 11.79         | 0.00  | 11.79 | 0.00 | Telocentric    |
| 20 <sup>th</sup> | 11.38     | 0.00 | 11.38 | 0.00 | Telocentric    | 11.33         | 0.00  | 11.33 | 0.00 | Telocentric    |
| 21 <sup>st</sup> | 10.92     | 0.00 | 10.92 | 0.00 | Telocentric    | 10.47         | 0.00  | 10.47 | 0.00 | Telocentric    |
| 22 <sup>nd</sup> | 10.60     | 0.00 | 10.60 | 0.00 | Telocentric    | 10.01         | 0.00  | 10.01 | 0.00 | Telocentric    |
| 23 <sup>rd</sup> | 9.66      | 0.00 | 9.66  | 0.00 | Telocentric    | 8.69          | 0.00  | 8.69  | 0.00 | Telocentric    |
| 24 <sup>th</sup> | 8.72      | 0.00 | 8.72  | 0.00 | Telocentric    |               |       |       |      |                |
| X                | 26.52     | 0.00 | 26.52 | 0.00 | Telocentric    | 28.73         | 0.00  | 28.73 | 0.00 | Telocentric    |
| Y                | 7.89      | 0.00 | 7.89  | 0.00 | Telocentric    | 7.93          | 0.00  | 7.93  | 0.00 | Telocentric    |



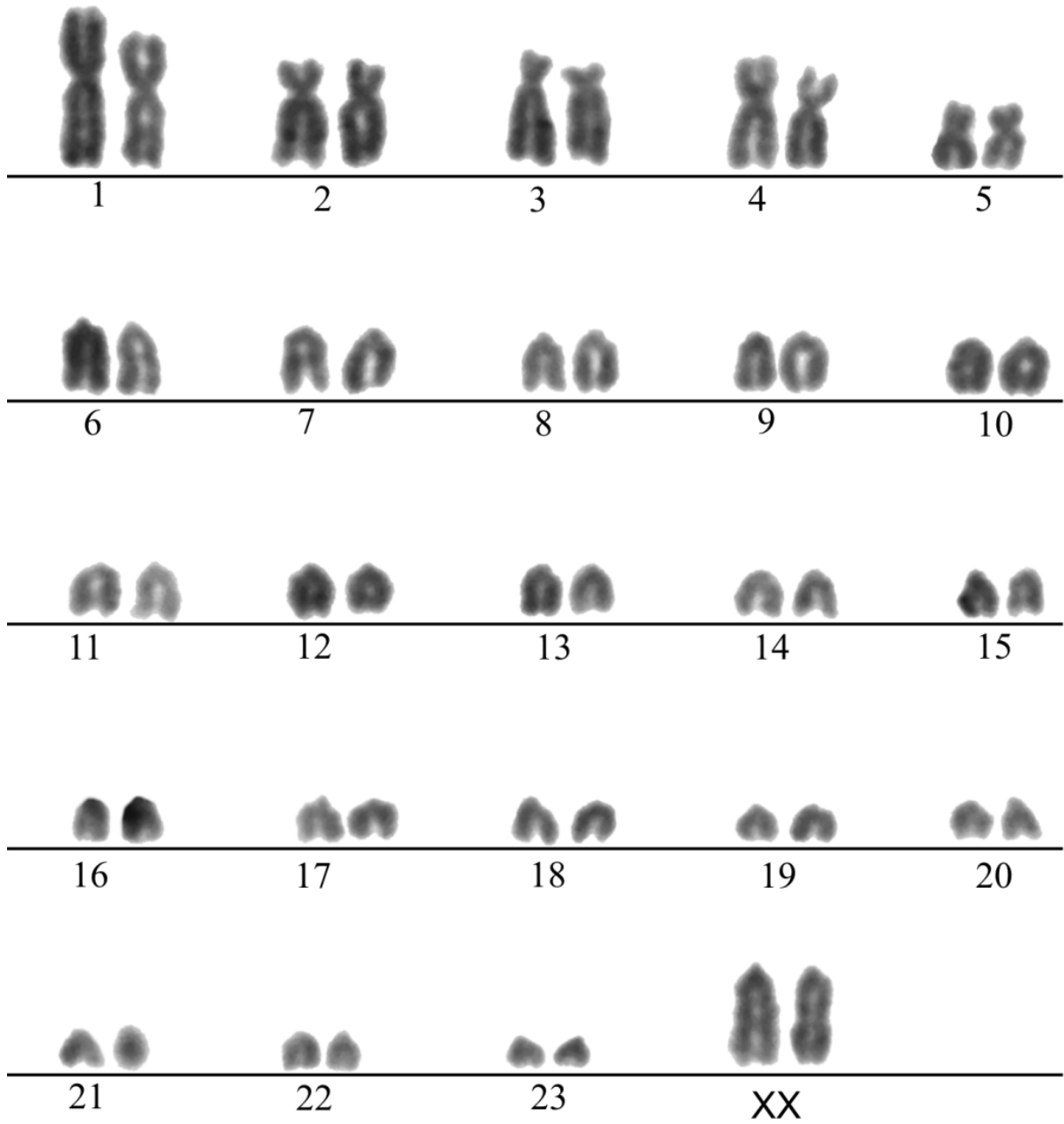
**Table 2:** Partial genealogy of specimens descendent from a female identified as an F1 hybrid (2n=49) between Carabao breed and Baio type buffalo, showing the variation in diploid number (2n) through generations F2, F3 and F4 and the morphological characteristics of the karyotype.

| <b>Generation</b> | <b>Specimen</b> | <b>Sex</b> | <b>Birth Date</b> | <b>2n</b> | <b>Mother</b> | <b>2n-Mother</b> | <b>Father</b> | <b>2n-Father</b> | <b>Morphological characteristics of the karyotype</b> |
|-------------------|-----------------|------------|-------------------|-----------|---------------|------------------|---------------|------------------|---|
| <b>F1*</b>        | 02              | F          | 20/03/1991        | 49        | 1CA           | 48               | 1BA           | 50               | Formation of a trivalent on the first position        |
| <b>F2</b>         | 03              | F          | 24/04/2001        | 48        | 02            | 49               | 5978          | 48               | Typical Carabao karyotype                             |
|                   | 04              | M          | 01/10/2004        | 49        | 02            | 49               | 207           | 48               | Formation of a trivalent on the first position        |
|                   | 05              | M          | 18/10/2006        | 48        | 02            | 49               | 207           | 48               | 1 <sup>st</sup> pair heteromorphic                    |
|                   | 06              | M          | 10/01/2009        | 48        | 02            | 49               | 246           | 48               | Typical Carabao karyotype                             |
| <b>F3</b>         | 07              | F          | 06/07/2002        | 49        | 12            | -                | 5978          | 48               | Formation of a trivalent on the first position        |
|                   | 08              | M          | 01/06/2005        | 48        | 03            | 48               | 207           | 48               | Typical Carabao karyotype                             |
|                   | 09              | M          | 15/06/2007        | 48        | 03            | 48               | 207           | 48               | Typical Carabao karyotype                             |
| <b>F4</b>         | 10              | F          | 18/10/2005        | 48        | 143           | -                | 207           | 48               | Typical Carabao karyotype                             |
|                   | 11              | F          | 15/08/2009        | 48        | 07            | 49               | 246           | 48               | Typical Carabao karyotype                             |

\* = First record evaluated in the group; Rg= genealogical register, F= Female, M= Male.



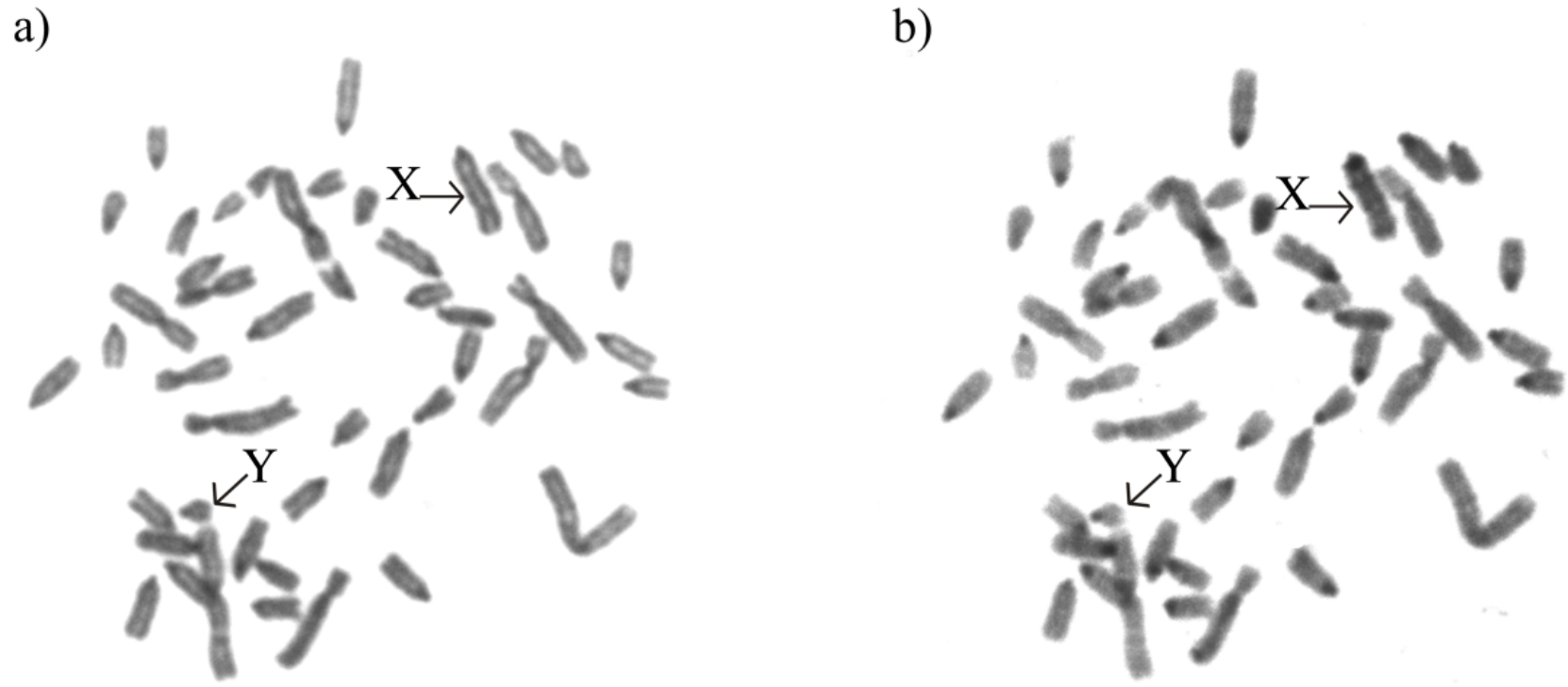
**Figure 3:** Karyotype of a female F1 hybrid (Carabao breed x Baio type) characterized as presenting chromosome number  $2n=49$ . \* There is a trivalent on the first position between chromosome 1 in swamp buffalo and chromosomes 4 and 9 in river buffalo.



**Figure 4:** Karyotype of a female F2 specimen with chromosome number  $2n=48$  and heteromorphism on the first pair.

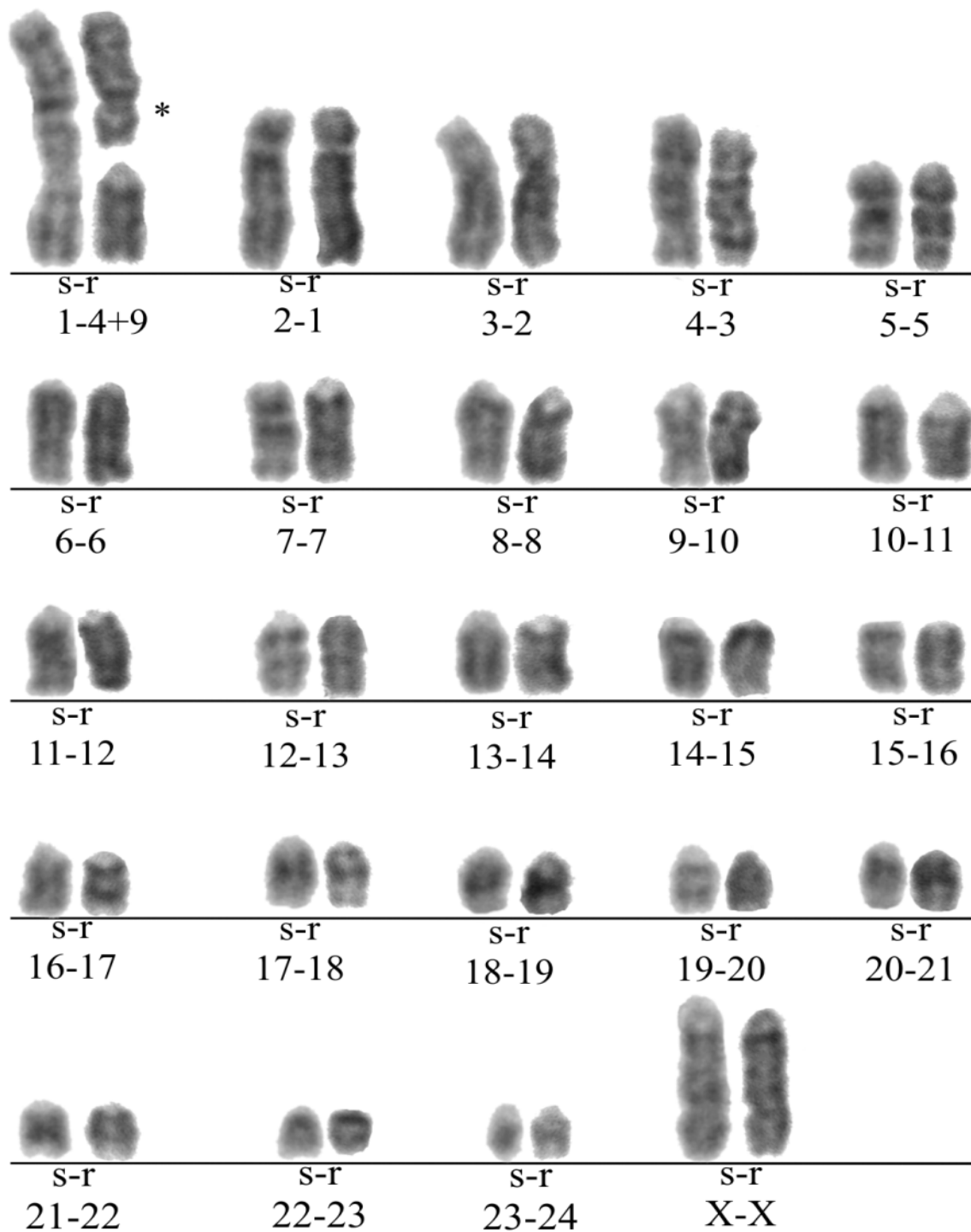
It is important to emphasize that all of the animals belonging to this progeny presented phenotypic characteristics of the Carabao breed and could only be identified using genealogical records and the cytogenetic data from this study.

C-banding (Fig. 5) revealed the presence of constitutive heterochromatin in centromeric regions across the whole chromosome complement for both river and swamp buffalo, and no differences were observed within this typical marking pattern. In addition, it was observed that the X sex chromosome presents interstitial marking on the long arm q and that the Y chromosome presents weak coloration, indicating low levels of constitutive heterochromatin.



**Figure 5:** a) Metaphase with conventional staining for a Carabao breed male; b) sequential C-banding; the arrows indicate the X and Y sex chromosomes.

G-banding was initially used to carry out the correct identification of homologous pairs and to compare the karyotypes of the buffalo being studied. The G-banding pattern karyotype (Fig. 6), where each chromosome pair was assembled using the first chromosome of the Carabao breed and the second member of the pair corresponding to the homologous pair in the Baio type. In addition, the pairing between chromosome 1 in swamp buffalo and chromosomes 4 and 9 in river buffalo, this fusion resulting in the reorganization of subsequent pairs during assembly of the karyotype and chromosome pairing in F1 hybrid specimens. These specimens presented all of the paired chromosomes and the homologous karyotype was confirmed through conventional staining.



**Figure 6:** Karyotype showing the G-banding pattern and the homology between the chromosomes of river and swamp buffalo, where each chromosome pair was assembled using the first chromosome of the Carabao breed and the second chromosome of the Baio type. \* Indicates the formation of a trivalent between chromosome 1 in swamp buffalo, 4p and 9 in river buffalo.

## 2.5 Discussion

The Baio type buffalo presented karyotype  $2n=50$  (Fig. 1), a karyotype characteristic of river buffalo, while the Carabao breed presented karyotype  $2n=48$  (Fig. 2), characteristic of swamp buffalo. Both karyotypes were assembled in order of size and morphology and are in accordance with those described by Pkhadze (1939) and Ulbrich and Fischer (1967) respectively, in their studies of Asiatic buffalo.

The chromosome biometry data of Baio type and Carabao breed buffalo (Tab. 2) indicate that the karyotypic divergence between these is restricted to the first chromosome pair and is a result of a tandem fusion between chromosomes 4 and 9 in the ancestral karyotype of river buffalo ( $2n=50$ ), reducing the chromosome number in swamp buffalo ( $2n=48$ ). This data was confirmed using G-banding (Fig. 6), which corroborates the data collected by Bernardino and Iannuzzi, (1981); Hishinuma et al. (1992) and Tanaka et al. (2000).

Another result of this reorganization is the reordering of chromosome pairs in swamp buffalo, which occurs during assembly of the karyotype as the chromosome resulting from the tandem fusion occupies the first position. This can also be observed through biometry in relation to the difference in the total length of the chromosomes, which for swamp buffalo tend to be larger than for river buffalo in this position (Tab. 2, columns 10 and 4 respectively).

Observing the cytogenetic studies carried out in both of these groups of buffalo it is possible to identify five consequences related to this event: the loss of the centromere on chromosome 9; the fusion of heterochromatin with euchromatin on the telomeric portion of the short chromosome on chromosome 4; the loss of an NOR site present on the short arm of the ancestral chromosome 4; the formation of a large metacentric chromosome that occupies the first position of the karyotype in swamp buffalo and the consequent reorganization of some of its pairs, as observed by Bernardino and Iannuzzi, (1981); Hishinuma et al. (1992) and Tanaka et al. (2000).

The Baio type and Carabao breed presented G-banding homologies across the whole chromosome complement (Fig. 6). These results are in accordance with Bernardino and Iannuzzi (1981), who observed G-banding homologies between chromosomes 4 and 9 in river buffalo and chromosome 1 in swamp buffalo for the first time, identifying this as a tandem



fusion. This was also the case for Tanaka et al. (2000), who described a fusion between the telomere on the short arm of chromosome 4 and the centromere of chromosome 9, a fusion between heterochromatin and euchromatin and the loss of the centromere on chromosome 9 when using telemetric sequences.

Despite karyotypic differences between river and swamp buffalo, crossbreeding between these animals results in the formation of F1 specimens characterized as presenting karyotype  $2n=49$  and the pairing between chromosome 1 in swamp buffalo and chromosomes 4 and 9 in river buffalo on the first position of the karyotype (Fig. 3), as observed for the hybrid specimens used in this study. However, the results obtained in this study disagree with those collected by Fischer and Ulbrich (1968), who reported a karyotype of hybrid specimens with heteromorphism of the first pair and absence of one of the homologues on position 24 of the karyotype.

The F1 hybrid specimens presented all of the paired chromosomes during meiosis with the formation of a 1+4+9 trivalent, viable unbalanced gametes  $n=24$  and  $n=25$  are therefore produced, following Mendel's law of segregation and indicating that the gametes produced are not necessarily of pure river or swamp buffalo (Dai et al. 1994). This is proved by the formation of karyotypes with 49, 50 and 48 chromosomes in the F2 generation specimens observed in this study (Tab. 1), which may or may not present chromosome heteromorphism in the first pair and were previously observed by Harisah et al. (1989).

In addition, it is important to emphasize that the karyotype characteristics of  $2n=49$  specimens were the same for F2 and F3 generation specimens and F1 specimens (Fig. 3), making the identification of the generation to which different specimens belong possible only when backed up with data from genealogical records (Tab. 1).

This occurs in the same way for the animals identified to have karyotype  $2n=48$  and that do not present the heteromorphism and karyotype characteristics that would enable classification of the hybrid. This result does not define them as purebred animals, however, as they are descendents of an F1 hybrid specimen that follows Mendel's law of segregation, where gametes  $n=24$  and  $n=25$  are not formed exclusively from Carabao and Baio type chromosomes respectively.

The identification of specimens with karyotype  $2n=49$  confirms the crossbreeding of Baio type and Carabao breed animals in the conservation project. As the objective is to

maintain both of these groups separate and avoid crossbreeding between them, it is necessary to exclude not just animals identified as  $2n=49$  (for F1, F2 and F3 generations), but also their descendents ( $2n=50$  and  $2n=48$ ) since F1 hybrid specimens present meiosis that follows Mendel's law of segregation.

Despite the karyotypic differences observed for some animals belonging to the progeny, for others it was not possible to find cytogenetic markers to distinguish  $2n=48$  Carabao breed animals from  $2n=48$  animals belonging to the hybrid lineage. In the same way, it was not possible to distinguish between  $2n=49$  specimens belonging to the F1 or F2 generations without using data from genealogical records. Therefore, it is important to recognize molecular parameters as well as parameters such as chromosome number, morphology and banding for this identification.

In view of this, it is expected that molecular analyses will be able to contribute to future stages of the program by providing more information on crossbreeding between river and swamp buffalo (represented by the Baio type and the Carabao breed used in this study respectively) and provide markers for their identification.

This study has broadened the general understanding of the processes involved in crossbreeding between river buffalo and swamp buffalo. In addition, the results presented provide essential parameters to help with the genetic conservation program's future actions, especially those relating to the reproductive management of these animals. Cytogenetic analysis is an excellent tool that can be used for this purpose, enabling the selection of breeding stock that is free of chromosomal alterations.

## **2.6 Funding**

This study was funded by the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA), the Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) and the Federal University of Pampa (UNIPAMPA).

## 2.7 References

- Di Bernardino D, Iannuzzi L (1981) Chromosome banding homologies in swamp and Murrah buffalo. *J Hered* 72:183 188.
- Cruz LC (2010) Recent developments in the buffalo industry of Asia. *Rev Vet* 21:7 19.
- Dai K, Gillies CB, Dollin AE, Hilmi M (1994) Synaptonemal complex analysis of hybrid and purebred water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Hereditas* 121:171 184.
- Degrandi TM, Reimche RB, Marques JRF, Gunski RJ (2010) Cytogenetic characterization of swamp (*B. bubalis kerebau*) and river (*B. bubalis bubalis*) buffaloes and respective progeny. *Rev Vet.* 21:358 362.
- Egito AA, Mariante AS, Albuquerque MSM (2002) Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. *Arch Zootec* 51:39 52.
- Fischer H, Ulbrich F (1968) Chromosomes of the Murrah Buffalo and its Crossbreds with the Asiatic Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Z. Tierzucht.* 84:110 114.
- Guerra MDS (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Rev Brasil Genet* 9:741 743.
- Harisah M, Azmi TI, Hilmi M, Vidyadaran MK, Bongso TA, Nava ZM, Momongan V, Basrur PK (1989) Identification of crossbred buffalo genotypes and their chromosome segregation patterns. *Genome* 32:999 1002.
- Hishinuma M, Hilmi M, Takahashi Y, Mori Y, Kana Y, Jainudeen MR, Kanagawa H (1992) High-resolution GTG-banding of chromosomes in the swamp buffalo (*Bubalus bubalis L.*): Description of chromosome 1. *Hereditas* 117:97 101.
- Marques JRF, Jorge W, Ramos AA (1991) Cytogenetics of domestic buffaloes (*Bubalus bubalis L.*). *Cien Cult* 43:230 235.

Moorhead PS, Nowell PC, Mellinan WJ, Battips DME, Hungerford DA (1960) Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 20:613 616.

Pkhakadze GM (1939) Chromosome complement in buffalo (*Bubalus bubalis* L.). *Comp Rend Acad Sci USSR*. 24:794 795.

Seabright M (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2:971 972.

Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75:304 306.

Tanaka K, Matsuda Y, Masangkay JS, Solis CD, Anunciado RVP, Kuro-O M, Namikawa T (2000) Cytogenetic analysis of the Tamaraw (*Bubalus mindorensis*): a comparison of R-banded karyotype and chromosomal distribution of centromeric satellite DNAs, telomeric sequence, and 18s-28s rRNA genes with domestic water buffaloes. *J Hered* 9:117 121.

Ulbrich F, Fischer UJ (1967) The chromosomes of the Asiatic buffalo (*Bubalus bubalis*) and the African buffalo (*Syncerus caffer*). *Z Tierzuchtg Zuchtgsbiol*. 83:219 223.

### **3 CAPÍTULO 2**

#### **Marcadores microssatélites aplicados na identificação de búfalos híbridos (Carabao x tipo Baio) das gerações F1, F2, F3 e F4, mantidos em conservação no Brasil**

Manuscrito formatado para o periódico Journal of Genetics

ISSN: 0022-1333 (Versão eletrônica)

## **Marcadores microssatélites aplicados na identificação de búfalos híbridos (Carabao x tipo Baio) das gerações F1, F2, F3 e F4, mantidos em conservação no Brasil**

T. M. DEGRANDI<sup>1\*</sup>, R. KRETSCHMER, V. M. STEFENON<sup>1</sup>, A. K. SASSI<sup>1</sup>, J. R. F. MARQUES<sup>2</sup>, R. J. GUNSKI<sup>1</sup> AND A. D. V. GARNERO<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup> *Universidade Federal do Pampa, São Gabriel 97300-000, Brazil*

<sup>(2)</sup> *Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária- Amazônia Oriental, Belém 66095-100, Brazil*

### **3.1 Resumo**

Os búfalos do tipo Baio e da raça Carabao da Ilha de Marajó-Pará/ Brasil constituem duas pequenas populações, com número muito reduzido de exemplares, o que os torna extremamente suscetíveis à extinção. O tipo baio apresenta  $2n=50$  pertencendo ao grupo classificado como búfalos de rio enquanto a raça Carabao é identificada com  $2n=48$  sendo búfalos de pântano. A hibridização entre ambos resulta em exemplares férteis com  $2n=49$  que apresentam na descendência a formação de animais  $2n=48$ , 49 ou 50. Este trabalho foi realizado para distinguir animais puros de híbridos mantidos em conservação. Amostras de 45 animais (15 tipo Baio, 15 Carabao e 15 híbridos) foram genotipados para 5 loci microssatélites (CSSM- 006, 008, 042, 066 e Hel 9). Embora o tamanho amostral seja pequeno foi observado alta diversidade genética dentro e entre os grupos, sendo esta um provável reflexo das ações do programa de conservação. Os loci CSSM06, 8, 42,66 identificaram a presença de alelos privados do grupo tipo Baio para 13, 14, 6 e 2 animais híbridos, respectivamente. Enquanto, que o locus Hel9 identificou apenas 3 animais. Estas análises serviram para identificar os animais que devem ser mantidos no programa de conservação, excluindo aqueles que apresentaram miscigenação racial.

### **Palavras chave:**

\*Endereço para correspondência e-mail: tdegrandi@hotmail.com

**Título curto:** Identificação de búfalos híbridos

### 3.2 Introdução

Os búfalos domésticos *Bubalus bubalis* são divididos em dois grupos, de acordo com características citogenéticas e de hábitat: os búfalos de rio pertencem a subespécie *bubalis* e são encontrados em vários países da Ásia, Europa e Américas e apresentam  $2n=50$  cromossomos; búfalos de pântano subespécie *kerebau*, são encontrados em países como Malásia, Indonésia, Filipinas, Ceilão, Tailândia e também na região norte do Brasil e caracterizam-se por apresentar  $2n=48$  cromossomos (Ulbrich and Fischer, 1967; Fischer and Ulbrich, 1968, Bongso and Hilmi, 1982).

Apesar de possuírem números cromossômicos diferentes, os búfalos de rio e de pântano podem cruzar entre si, gerando um híbrido F1 fenotipicamente similar aos búfalos de pântano, que é identificado principalmente por características citogenéticas tais como, a presença de  $2n=49$  cromossomos, heteromorfismo no primeiro par e ausência de um dos homólogos na posição 24 do cariótipo. Além disso, o híbrido F1 pode apresentar a formação de gametas viáveis com valor haplóide ( $n$ ) 24 ou 25 cromossomos, resultando em cariótipos  $2n=48$ ,  $2n=49$  ou  $2n=50$  nas gerações F2, F3, F4 dependendo do cariótipo de seus parentais (Harisah *et al.* 1989).

Do ponto de vista citogenético, parece fácil a identificação dos búfalos híbridos quando se observam exemplares com cariótipos  $2n=49$ , porém, cariótipos  $2n=48$  ou 50 observados nas gerações subsequentes de um progenitor híbrido F1, em sua maioria, não fornecem características citogenéticas para sua identificação/classificação, sendo necessário o reconhecimento de outros parâmetros.

Flamand *et al.* (2003) empregaram sequências de microssatélites para identificação de marcadores genéticos afim de distinguir bubalinos selvagens, domésticos e híbridos ao estudar um grupo de animais mantidos em conservação, em uma reserva no Nepal. Mais recentemente Albuquerque *et al.* (2006) e Marques *et al.* (2011) usaram um painel de 13 e 25 marcadores microssatélites, respectivamente, para caracterizar a estrutura genética dos cinco grupos de bubalinos (Carabao, Jafarabadi, Mediterrâneo, Murrah e Tipo Baio) introduzidos no Brasil, além de avaliar a situação dos animais da raça Carabao e do tipo Baio, também mantidos em um programa de conservação genética na Ilha de Marajó/PA- Brasil.

Os animais da raça Carabao e do tipo Baio da Ilha de Marajó-Pará/ Brasil são representantes exclusivos de seus grupos genéticos, pois, não mais que 500 animais representam estes grupos no país, o que os torna extremamente suscetíveis à extinção, necessitando de medidas rápidas para a conservação deste patrimônio genético (Marques *et al.*, 2003). Frente a isso, foi criado um programa que visa à conservação genética tanto *in situ* como *ex situ* destes animais, desenvolvendo pesquisas para estabelecimento de parâmetros produtivos, fenotípicos, genéticos e citogenéticos de ambos os grupos (Egito *et al.*, 2002).

Com a finalidade de selecionar reprodutores livres de alterações cromossômicas, Degrandi *et al.* (2010), realizaram um estudo citogenético de alguns animais da raça Carabao e do tipo Baio, e identificaram a presença de cariótipos  $2n=49$  cromossomos, indicando a existência de híbridos no grupo de animais mantidos em conservação. Assim recorreu-se aos dados genealógicos dos animais identificados, onde se observou que muitos dos exemplares cariotípicamente normais  $2n=48$  pertenciam a uma descendência híbrida e não apresentavam marcadores cromossômicos para sua identificação.

Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi utilizar um conjunto de microssatélites para identificar possíveis marcadores para identificação de búfalos híbridos das gerações F1, F2, F3 e F4.

### 3.3 Material e Métodos

Neste trabalho foram coletados no total de 45 búfalos da ilha de Marajó-Belém/PA, todos pertencentes ao programa brasileiro de conservação dos recursos genéticos. Estes animais foram divididos em três grupos, sendo 15 do tipo Baio (búfalos de rio), 15 da raça Carabao (búfalos de pântano) e 15 animais pertencentes a uma linhagem descendente de uma fêmea híbrida Carabao x tipo Baio com  $2n=49$ , e desta linhagem distinguiram-se quatro gerações (F1=1 exemplar), (F2=4 exemplares), (F3=3 exemplares), (F4=7 exemplares) com base nos registros genealógicos do programa.

O número cromossômico de cada exemplar foi determinado previamente por (Degrandi *et al.*, 2010) e destas amostras foi realizado a extração de DNA, utilizando mini kit de extração de DNA (PureLink Genomic DNA Mini Kit–Invitrogen®) a partir de linfócitos



fixados com Metanol e Ácido Acético que haviam sido utilizados na caracterização cromossômica.

### 3.3.1 Seleção de Microsatélites

Para análise foram selecionados cinco locus microsatélites (CSSM- 006, 008, 042, 066) e Hel 9, os quais foram previamente utilizados para caracterizar as populações de búfalos do Brasil (Albuquerque *et al.* 2006; Marques *et al.* 2011).

Para realização do PCR foram adicionados em cada microtubo de 0,5 ml, 2,5 µl de buffer 10X, 1,5 µl de cada primer (*forward* e *reverse*), 1 µl de dNTPs (10nM), 0,5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl de enzima Taqpolimerase, 30ng de DNA e 16 µl H<sub>2</sub>O. Após, os resultados do PCR foram conferidos com eletroforese em gel Poliacrilamida 1%, corados com AgNO<sub>3</sub> e fotografados.

As fotos dos géis foram avaliadas no *software TotalLab* - Nonlinear Dynamics Ltd versão 2008, para quantificar o peso molecular dos alelos para cada locus em relação ao DNA lader de 100pb, identificando assim os indivíduos homozigotos e heterozigotos. Estes valores foram agrupados em uma matriz do *software* Excel para análises.

### 3.3.2 Análises genéticas

As análises de diversidade genética foram realizadas no *software* Genalex 6.41 estimando o número de alelos observados (Na) e esperados (Ne), heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho) cada grupo (tipo Baio, raça Carabao e híbridos).

Para identificação dos alelos privados foram confrontados os dados dos cinco locus microsatélites apenas dos grupos Carabao e tipo Baio, excluindo o grupo híbrido desta análise.

A identificação dos híbridos foi realizada pelo método direto de comparação de alelos, identificando a presença dos alelos privados de animais do tipo Baio em exemplares da linhagem híbrida. Além disso, foram realizadas análises dos grupos genéticos no *software* *Estructure* para identificar a miscigenação racial entre os grupos. Para tal foram utilizados assumiu-se a existência de hibridização entre os grupos e o número de populações  $k=2$ .

### 3.4 Resultados e Discussão

Foram obtidos resultados dos cinco locus microssatélites selecionados para 45 animais divididos em três grupos: tipo Baio (n=15), raça Carabao (n=15) e os descendentes de uma búfala F1 híbrida 2n=49 (n=15). Para as análises da diversidade genética, os grupos foram avaliados conjuntamente. No entanto, para identificar os alelos privados a raça Carabao e o tipo Baio foram confrontados separadamente, excluindo o grupo híbrido desta análise.

#### 3.4.1 Diversidade genética

Todos os locus microssatélites avaliados, apresentaram um elevado número de alelos observados em relação ao esperado considerando o tamanho da amostra, indicando alta variabilidade genética. Em média o número de alelos por população (Tabela 1) foi 11,4 para os animais da raça Carabao e 11,6 para o tipo Baio, estes valores encontram-se acima dos observados por Albuquerque *et al.* (2006), que observaram 5,53 e 5,38 respectivamente. Para o grupo de animais considerado híbrido neste trabalho foi observado em média 11,4 alelos, este grupo não foi avaliado por Albuquerque *et al.* (2006).

Os valores da heterozigosidade observada em relação à esperada também apresentaram-se superiores (Tabela 1), sendo observado 100% de heterozigotos no tipo Baio para os locus CSSM008, 042 e 066, e locus CSSM008 para o grupo híbrido. Estes resultados observado para o tipo Baio pode ter sua origem no cruzamento que estes animais tiveram no passado com outras raças de búfalos, visando o aumento da variabilidade genética, e para o híbrido resulta do cruzamento com animais da raça Carabao.

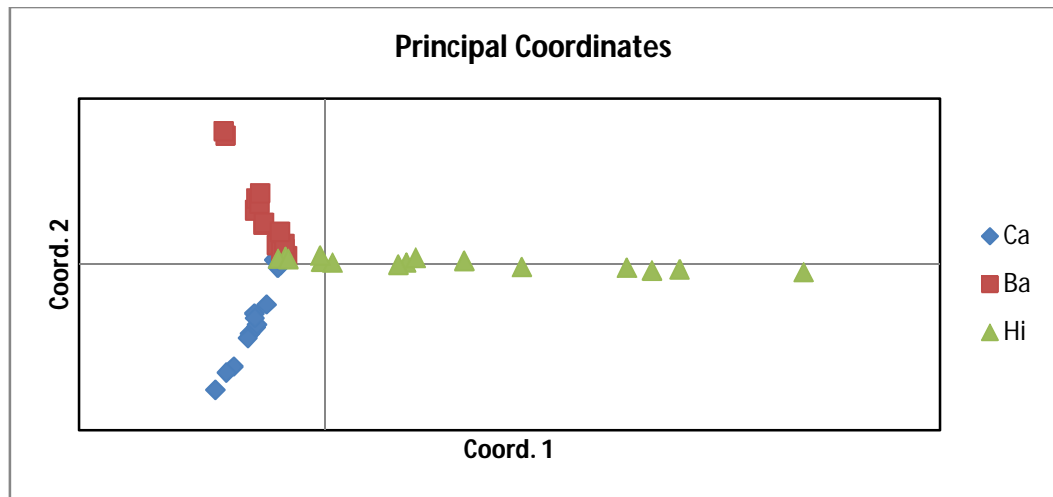
**Tabela 1:** Índices de diversidade genética de cinco locus microssatélites para três grupos de búfalos raça Carabao, tipo Baio e híbridos.

| Locus          | Carabao |       |       |      |      |       | Tipo Baio |       |      |      |       | Híbrido |      |      |      |       |
|----------------|---------|-------|-------|------|------|-------|-----------|-------|------|------|-------|---------|------|------|------|-------|
|                | N       | Na    | Ne    | Ho   | He   | F     | Na        | Ne    | Ho   | He   | F     | Na      | Ne   | Ho   | He   | F     |
| <b>CSSM006</b> | 15      | 11,00 | 7,14  | 0,60 | 0,86 | 0,30  | 12,00     | 7,38  | 0,93 | 0,86 | -0,08 | 10,00   | 8,82 | 0,67 | 0,89 | 0,25  |
| <b>CSSM008</b> | 15      | 9,00  | 6,43  | 0,60 | 0,84 | 0,29  | 11,00     | 7,38  | 1,00 | 0,86 | -0,16 | 9,00    | 4,95 | 1,00 | 0,80 | -0,25 |
| <b>CSSM042</b> | 15      | 11,00 | 6,62  | 0,93 | 0,85 | -0,10 | 12,00     | 10,23 | 1,00 | 0,90 | -0,11 | 10,00   | 7,35 | 0,54 | 0,86 | 0,38  |
| <b>CSSM066</b> | 15      | 10,00 | 7,26  | 0,93 | 0,86 | -0,08 | 12,00     | 6,00  | 1,00 | 0,83 | -0,20 | 16,00   | 9,78 | 0,60 | 0,90 | 0,33  |
| <b>Hel 9-C</b> | 15      | 16,00 | 13,24 | 0,93 | 0,92 | -0,01 | 11,00     | 8,33  | 0,80 | 0,88 | 0,09  | 12,00   | 5,76 | 0,57 | 0,83 | 0,31  |
| <b>Média</b>   | 15      | 11,40 | 8,14  | 0,80 | 0,87 | 0,08  | 11,60     | 7,86  | 0,95 | 0,87 | -0,09 | 11,40   | 7,33 | 0,68 | 0,85 | 0,20  |

N=número de amostras; Na= Número de alelos, Ne= número de alelos esperados, Ho= Heterozigosidade observada, He= Heterozigosidade esperada, F= índice de fixação.

### 3.4.2 Grupos Genéticos

A análise de coordenadas principal, dividiu os grupos genéticos em três agrupamentos (tipo Baio, Carabao e Híbridos), sendo o híbrido em posição intermediária (Figura 1).



**Figura 1:** Análise de coordenadas principal dos grupos genéticos tipo Baio, raça Carabao e híbridos.

### 3.4.3 Alelos privados

O tipo Baio e a raça Carabao foram confrontados para identificação dos alelos privados para cada grupo considerando os cinco locus microssatélites. Identificaram-se em média 6 alelos para a raça Carabao e 7,4 para o tipo Baio, (Tabela 2). O locus Hel 9 foi o que apresentou o maior número de alelos privados para a raça Carabao (13 alelos), enquanto para os animais do tipo Baio o maior número de alelos foi observado para o locus CSSM66, em (9 alelos).

**Tabela 2:** Alelos privados para cinco locus microssatélites em búfalos da raça Carabao e do tipo Baio.

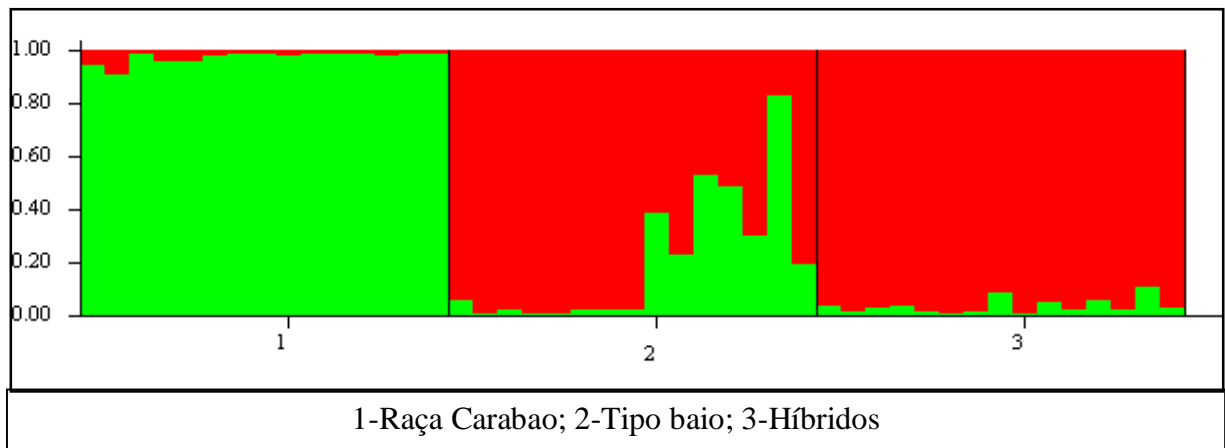
| Locus   | Alelo privado raça Carabao |   | Alelo privado tipo Baio |   |
|---------|----------------------------|---|-------------------------|---|
|         | Na*                        | Peso molecular  | Na*                     | Peso molecular                              |
| CSSM006 | 4                          | 178, 185, 201, 234  | 5                       | 203, 207, 210, 251, 267                     |
| CSSM008 | 6                          | 227, 238, 245, 263, 284, 300                                    | 8                       | 174, 177, 182, 187, 191, 205, 214, 218      |
| CSSM042 | 6                          | 209, 212, 224, 250, 252, 259                                    | 7                       | 188, 191, 195, 199, 219, 222, 236           |
| CSSM066 | 7                          | 177, 184, 186, 188, 218, 224, 227                               | 9                       | 156, 160, 161, 165, 167, 170, 172, 174, 205 |
| Hel9    | 13                         | 140, 152, 169, 172, 175, 183, 190, 193, 202, 204, 206, 210, 218 | 8                       | 121, 126, 130, 132, 134, 154, 160, 161      |
| Média   | 6,0                        |   | 7,4                     |   |

Na\*=número de alelos privados

### 3.4.4 Identificação dos Híbridos

Todos os animais descendentes da búfala híbrida ( $2n=49$ ) (Tabela 3), avaliados neste trabalho são mantidos no programa de conservação juntamente com animais da raça Carabao, devido às semelhanças fenotípicas. Além disso, muitos dos exemplares desta linhagem também apresentaram o valor diplóide  $2n=48$ , típico de búfalos da raça Carabao, ocorrendo ainda animais com  $2n=49$  nas gerações F2 e F3 com características citogenéticas similares a híbrida F1.

Os valores do peso molecular de cada alelo para os cinco locus microssátelites para os animais do grupo híbrido (Tabela 3) foram utilizados para comparações com os alelos privados observados para animais do tipo Baio (Tabela 2), através desta estratégia observou-se alelos do tipo Baio em 14 animais para o locus CSSM08, 13 para o locus CSSM06 sendo estes os mais informativos, enquanto que o locus CSSM066 identificou apenas 2 exemplar da geração F4. Estes resultados indicam a miscigenação que ocorre entre os animais mantidos em conservação, corroboram estes resultados das análises realizadas no *software Estructure* (Figura 2).



**Figura 2:** Miscigenação racial observada entre animais da raça Carabao e tipo Baio

**Tabela 3:** Genealogia parcial de um grupo de búfalos descendentes de uma fêmea híbrida F1 (2n=49), número cromossômico e peso molecular dos alelos para cinco locus microssatélites através das gerações F1-F4.

| Geração   | Rg   | Data de nascimento | Sexo | 2n | Locus Microssatélites |         |         |         |         |      |      |      |      |      |
|-----------|------|--------------------|------|----|-----------------------|---------|---------|---------|---------|------|------|------|------|------|
|           |      |                    |      |    | CSSM006               | CSSM008 | CSSM042 | CSSM066 | Hel 9-C |      |      |      |      |      |
| <b>F1</b> | 4672 | 20/03/1991         | F    | 49 | 207*                  | 207     | 177*    | 210     | 209     | 252  | 160  | 198  | 144  | 144  |
| <b>F2</b> | 742  | 10/01/2009         | M    | 48 | 245                   | 300     | 182*    | 218     | 172     | 209  | 143  | 143  | 144  | 169  |
|           | 609  | 18/10/2006         | M    | 48 | 224                   | 262     | 177*    | 227     | 168     | 168  | 138  | 163  | 126  | 144  |
|           | 524  | 01/10/2004         | M    | 49 | 224                   | 284     | 182*    | 218*    | 175     | 175  | 148  | 183  | 130* | 160* |
|           | 278  | 24/04/2001         | F    | 48 | 229                   | 284     | 191*    | 232     | 191*    | 191* | 138  | 138  | 126* | 154* |
| <b>F3</b> | 542  | 01/06/2005         | M    | 48 | 245                   | 300     | 182*    | 218*    | 175     | 188* | 143  | 194  | 140  | 140  |
|           | 423  | 01/07/2003         | F    | 48 | 245                   | 300     | 182*    | 218*    | 209     | 209  | 143  | 198  | 140  | 140  |
|           | 362  | 06/07/2002         | F    | 49 | 224                   | 284     | 182*    | 218*    | 206     | 247  | 177  | 218  | 144  | 144  |
| <b>F4</b> | 639  | 18/06/2007         | F    | 48 | 210*                  | 300     | 177*    | 218*    | 191*    | 209  | 143  | 200  | 134* | 170  |
|           | 604  | 15/08/2006         | F    | 48 | 245                   | 245     | 174     | 218*    | 0       | 0    | 143  | 143  | 0    | 0    |
|           | 561  | 18/10/2005         | F    | 48 | 210*                  | 262     | 177*    | 218*    | 209     | 252  | 165  | 205* | 140  | 172  |
|           | 583  | 09/06/2006         | F    | 48 | 227                   | 227     | 182*    | 227     | 199*    | 199* | 151  | 151  | 148  | 148  |
|           | 647  | 02/08/2007         | M    | 48 | 210*                  | 262     | 177*    | 210     | 191*    | 206  | 163  | 163  | 144  | 144  |
|           | 598  | 04/08/2006         | M    | 48 | 239                   | 239     | 182*    | 220     | 0       | 0    | 146  | 146  | 144  | 175  |
|           | 728  | 07/09/2008         | M    | 48 | 227                   | 227     | 182*    | 218*    | 199*    | 199* | 160* | 196  | 140  | 175  |

Rg=número do registro de nascimento; 2n= número diplóide, \* Alelo privado observado para animais do tipo Baio;

### 3.5 Conclusões

Os locus microssatélites podem ser utilizados como uma ferramenta para identificação de híbridos, podendo ainda ser associados aos dados citogenéticos e de genealogia dos animais.

A presença de búfalos híbridos entre os animais mantidos em conservação compromete um dos principais objetivos do programa, conservar os grupos genéticos separadamente, sendo assim é fundamental a identificação dos mesmos bem como a exclusão destes das etapas reprodutivas do programa.

### 3.6 Agradecimentos

Aos técnicos da Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária- Amazônia Oriental pelo envio das amostras, e CAPES pela bolsa.

### 3.7 Referências

- Albuquerque M. S., Egito A. A., Paiva S. R., Marques J. R. F., Castro S. T. R., Costa M. R. and Mariante A. S. 2006 Conservação e caracterização de búfalos no Brasil: Uma revisão da literatura. Documentos EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia Brasília-DF 2006.
- Bongso T. A. and Hilmi M. 1982 Chromosome banding homologies of a tandem fusion in river, swamp, and crossbred buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Can. J. Genet. Cytol.* **24**, 667-673.
- Degrandi T. M., Reimche R. B., Marques J. R. F. and Gunski R.J. 2010 Cytogenetic characterization of swamp (*B. bubalis kerebau*) and river (*B. bubalis bubalis*) buffaloes and respective progeny. *Rev. vet. UNNE.* **21**, 358-162.
- Egito A. A., Mariante A. S. and Albuquerque M. S. M. 2002 Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. *Arch. Zootec.* **51**, 39-52.
- Flamand J. R. B., Vankan D., Gairhe K. P., Duong H. and Barker J. S. F. 2003. Genetic identification of wild Asian water buffalo in Nepal. *Animal Conservation.* **6**: 265-270.



- Fischer H. and Ulbrich F. 1968 Chromosomes of the Murrah buffalo and its crossbreds with the Asiatic swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). *Z. Tierzuchtg* **84**, 110-114.
- Harisah M., Azmi T. I., Hilmi M., Vidyadaran M. K., Bongso T. A., Nava Z. M., Momongan V. and Basrur P. K. 1989 Identification of crossbred buffalo genotypes and their chromosome segregation patterns. *Genome*. **32**, 999-1002.
- Marques J. R. F., Costa M. R., Egito A. A., Mariante A. S. and Albuquerque M. S. M. 2003 Conservation of genetic resources of the small populations of domestic animal of the Amazon Region in Brazil. *Animal Genetic Resources Information*, **33**, 31-40.
- Marques J. R. F., Martínez A. M., Costa M. R., Albuquerque M. S. M., Quiroz J., Vega-Pla J. L. and Delgado J. V. 2011. Genetic diversity of Brazilian buffaloes (*Bubalus bubalis*) using DNA microsatellites. *Arch. Zootec.* **60**: 1213-1221
- Ulbrich F. and Fischer H. 1967 The chromosomes of the Asiatic buffalo (*Bubalus bubalis*) and the African buffalo (*Cynceus caffer*). *Z. Tierzuchtg.* **83**, 219-223.

#### **4 CAPÍTULO 3**

### **Characterization of transcriptionally active NORs, distribution of telomeric sequence and ribosomal gene 18S in river, swamp and its crossbreed buffaloes**

Manuscrito formatado para o periódico Journal Of Heredity  
ISSN 1465-7333 (Versão eletrônica)

## **Characterization of transcriptionally active NORs, distribution of telomeric sequence and ribosomal gene 18S in river, swamp and its crossbreed buffaloes**

Tiago M. Degrandi, Sebastian P. Mimbacas, Yanina Panzera, Edivaldo H.C. de Oliveira, José R.F. Marques, Lucia Vinade, Ricardo J. Gunski and Analía D.V. Garnero

Federal University of Pampa- Campus São Gabriel (UNIPAMPA). Avenida Antônio Trilha, 1847, CEP 97300-000, São Gabriel- Rio Grande do Sul/Brazil (Degrandi, Vinade, Gunski and Garnero); the Faculty of the science, University of the Republic, Igúa 4225, 11400 Montevideo, Uruguay (Panzera and Mimbacas); the Institute Evandro Chagas (IEC). Rodovia BR-316 km 7 s/n - Levilândia - 67030-000- Ananindeua- Pará/Brasil (De Oliveira) and the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) - Eastern Amazon. Trav. Dr. Enéas Pinheiro s/nº Caixa Postal, 48, CEP 66095-100, Belém-Pará/Brazil (Marques).

Address correspondence to Tiago M. Degrandi, at the address above, e-mail: tdegrandi@hotmail.com

### **4.1 Abstract**

In this study we identified the nucleolus organizer chromosomes of river (Baio type) and swamp (breed Carabao) buffaloes and their respective F1 crossbreed. Metaphases were obtained from lymphocytes cultures of the 21 buffaloes and NORs were identified with silver stain and 18S rDNA FISH. The river buffaloes showed  $2n=50$  and six pairs carrying NORs (3p, 4p, 6, 21, 23 and 24) while the swamp type showed  $2n=48$  and five pairs (4p, 6q, 20, 22 and 23). In the crossbreed F1 was observed  $2n=49$  and 11 chromosomes carrying NORs, indicating expression of both parental and the formation of five pairs plus the NORs of 4p of river buffalo, according to homology. The tandem fusion between chromosomes 4p and 9 from river buffaloes is responsible for the reduced NORs and diploid number and the formation of chromosome 1 in swamp buffaloes. The results presented here would contribute to the understanding of evolutionary aspects among buffaloes subspecies and their hybridization event.

**Key-words:** association, *Bubalus bubalis*, ribosome, FISH.

**Running title:** Buffaloes's active NORs, telomeric distribution and 18S

## 4.2 INTRODUCTION

Nucleolus organizer regions (NORs) consist of chromosomal sites of the active genes 18S, 5.8S and 28S coding for ribosomal RNA. These genes are characterized by being arranged in tandem within the DNA molecule in multiple copies per genome and can be present in one or more chromosomes, varying its telomeric, interstitial or centromeric position (Hsu et al. 1975; Künzel and Schubert 1990). Such regions or sites can be observed directly on chromosome preparations, using silver nitrate impregnation, as described in Howell and Black (1980), which label the active NORs or by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) probes made from its specific sequence allowing identification of all chromosomes bearing it, even the ones not being active (Hsu et al. 1975).

The family Bovidae, which includes cattle, goat, sheep and buffaloes, is characterized by showed 10 sites chromosomal with NORs conserved among species (Di Bernardino et al. 1985; Di Meo et al. 1991; Di Meo et al. 1993). For domestic buffaloes was observed differences in the number of chromosomes bearing NORs, which for buffalo river (*Bubalus bubalis bubalis*)  $2n=50$ , are present in six chromosome pairs (3p, 4p, 6, 21, 23 and 24) and for swamp buffaloes (*Bubalus bubalis Kerebau*)  $2n=48$  in five pairs (4p, 6, 20, 22 and 23) (Hilmi and Bongso 1983; Iannuzzi et al. 1996; Tanaka et al. 2000).

The difference in the number of NORs between river and swamp buffaloes, was deeply studied, and it is linked directly to the tandem fusion event between chromosomes 4p and 9 river type. The fusion event had several consequences: the loss of NORs present in the short arm of chromosome 4, the inactivation of the centromere of chromosome 9, the junction of euchromatin with heterochromatin, the formation of chromosome 1 large metacentric and the reduction of the diploid number in swamp buffaloes (Di Bernardino and Iannuzzi 1981; Bongso and hilmi 1982; Iannuzzi et al. 1996; Tanaka et al. 1999; Tanaka et al. 2000). In addition, the first 5 pairs of chromosomal bribraquials of buffaloes had its origin from centric fusions (1;27, 2;23, 8;19, 5;28 and 16;29) of cattle chromosomes (Iannuzzi et al. 2003, Di Meo et al. 2008). Thus, the NOR present on the short arm of chromosome 4 buffalo river is the only shared with cattle and was maintained during the fusion of chromosomes 5:28 NOR carrier (Di Bernardino et al. 1981).

Despite differences between karyotypes from river and swamp buffaloes, these animals are not reproductively isolated with a F1 crossbreed ( $2n=49$ ) viable and fertile. Thus

the aim of this study was to identify the chromosomes bearing NORs in the river and swamp buffaloes and in its crossbreed F1 using silver staining and FISH 18S techniques.

### **4.3 MATERIALS AND METHODS**

#### **4.3.1 Samples and cell culture**

It was analyzed 10 specimens belonging to Baio type (buffalo river), 10 Carabao breed (buffalo swamp) and one female from F1 between them  $2n=49$ . For this purpose, blood samples were taken and peripheral lymphocyte culture was performed to obtain cells in metaphase, according to Moorhead et al., 1960. Briefly, cell culture was performed under aseptic conditions using 1 ml of peripheral blood in 10 ml of RPMI 1640 culture medium supplemented with 20% fetal bovine serum, 0.05 ml penicillin/streptomycin and 0.1 ml of phytohemagglutinin. After 71hs cells were treated with 0.01 ml of 0.05% colchicine for one hour, following with hypotonic solution of 0.75 M KCl for 20 minutes and fixed with 3:1 methanol and acetic acid solution.

#### **4.3.2 Ag-NORs analysis**

To the establishment of individual chromosome number chromosome preparations were analyzed in conventional Giemsa staining. It was observed approximately 40 metaphases per specimen. Representative metaphases were photographed and selected for identification of chromosomal NORs through the technique of staining with silver nitrate according to the procedure of Howell and Black, 1980.

#### **4.3.3 FISH ribosomal sequence 18S**

Gene probe 18S were generated from sequence 45S *Bubalus bubalis*, available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI accession number JN412502.1) for use in the technique of Fluorescence Hybridization In Situ (FISH). The 18S probe was produced by polymerase chain reaction-PCR using primers for 18S Forward: TAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT AGC ATA TGC; Reverse: GTT CAC CTA CGG AAA CCT TGT TAC

GAC TT. To label the probe it was added to the PCR dinucleotide dUTP labeled with Cy3, keeping it protected from light. The chromosome preparations were stained with DAPI, and the fluorescent images were observed and photographed with an OLIMPUS BX53 microscope.

#### **4.3.4 FISH Telomeric sequence**

For the localization of the telomérica sequence was utilized the iniciadores: Forward 5'-(TTTAGGG)<sub>5</sub>-3' and reverse 5'-(CCCTAA)<sub>5</sub>-3' in the reaction of the PCR using dUTP-CY3 for labeled.

### **4.4 RESULTS**

#### **4.4.1 Sequential analysis of Giemsa and Ag-NOR**

Buffaloes Baio type had 2n=50, and NORs were observed in the telomeric region of six pairs of chromosomes (3p, 4p, 6, 21, 23 and 24) (Figure 1), while for Carabao breed it was observed 2n=48 and NORs at five pairs (4p, 6, 20, 22 and 23) (Figure 2). For the F1 crossbreed it was observed 2n=49, 11 chromosomes carrying NORs expressed (Figure 3).

18S FISH analysis

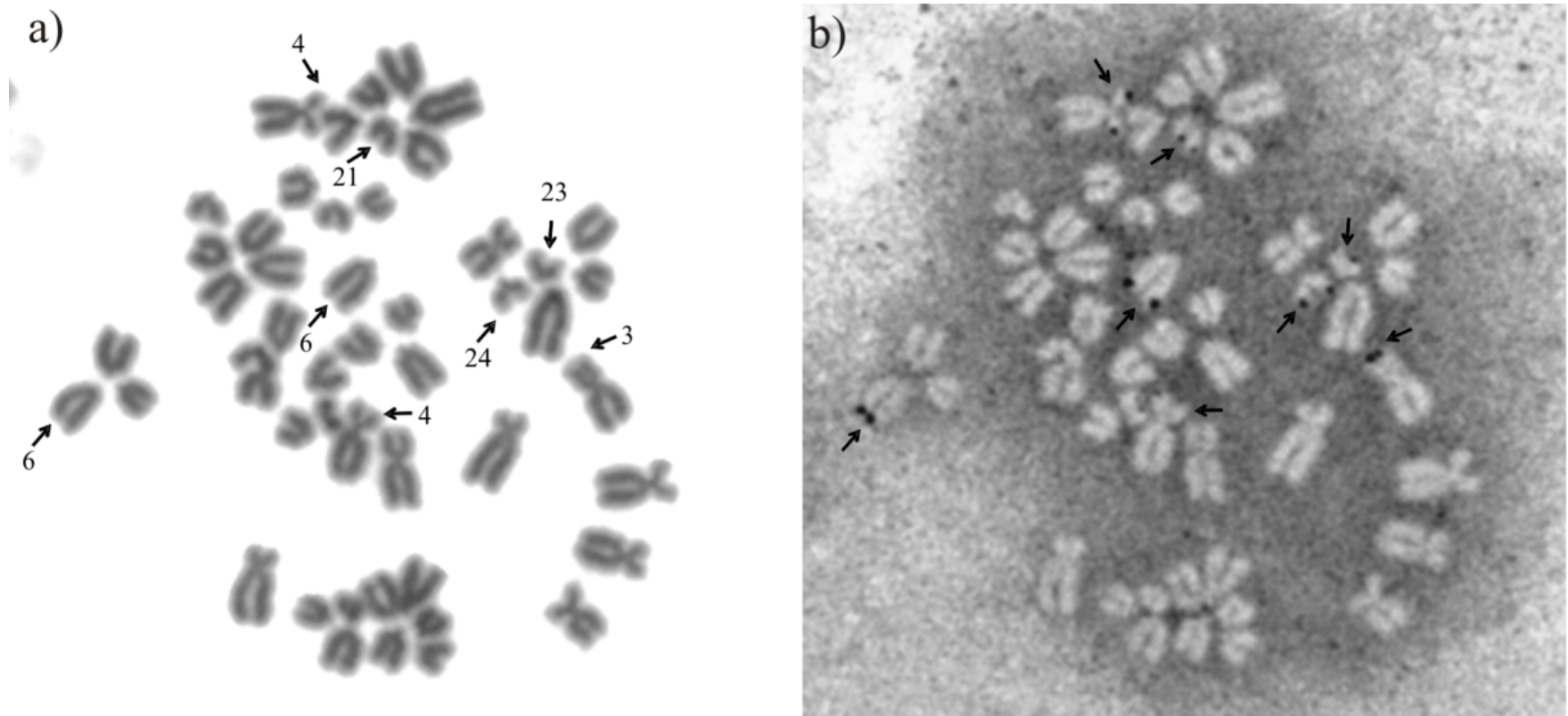
#### **4.4.2 18S FISH analysis**

The analysis of Fluorescence in Situ Hybridization using 18S ribosomal probe, confirmed the divergence in the number of NORs observed between buffaloes with silver staining. For the animals of Baio type 12 signals were observed in the pairs (3p, 4p, 6, 21, 23 and 24) (Figure 4a) and 10 signals for the Carabao breed pairs (4p, 6, 20, 22 and 23) (Figure 4b). For the F1 hybrid it was observed 11 signals (Figure 4c) corresponding to their parental.

#### **4.4.3 Telomeric FISH analysis**

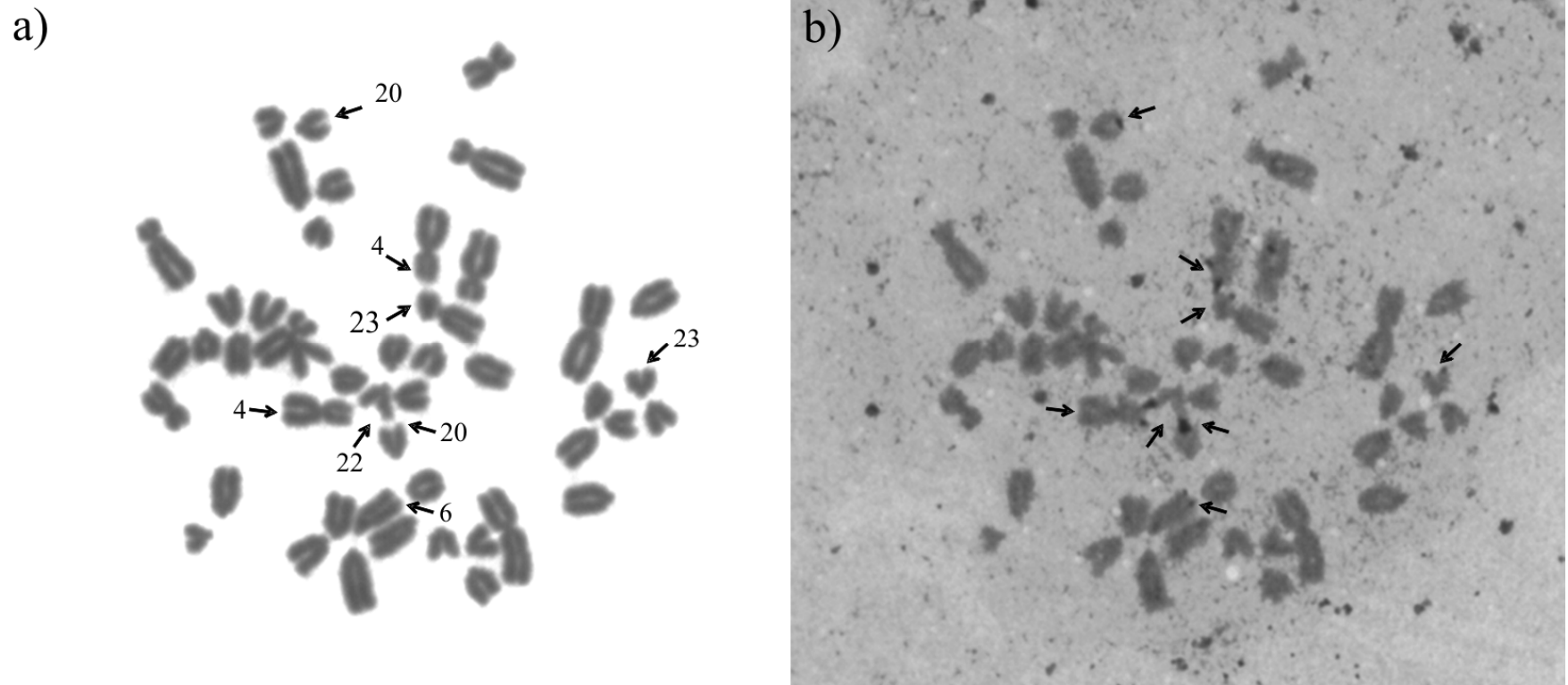
The telomeric sequence was observed in telomeres of all meta/submetacentric and telocentrics chromosomes (Figure 5), the latter also show telomeric sequence adjacent to the

centromere. In addition, the chromosome 1 do not show telomeric sequence in the fusion position 4p;9.

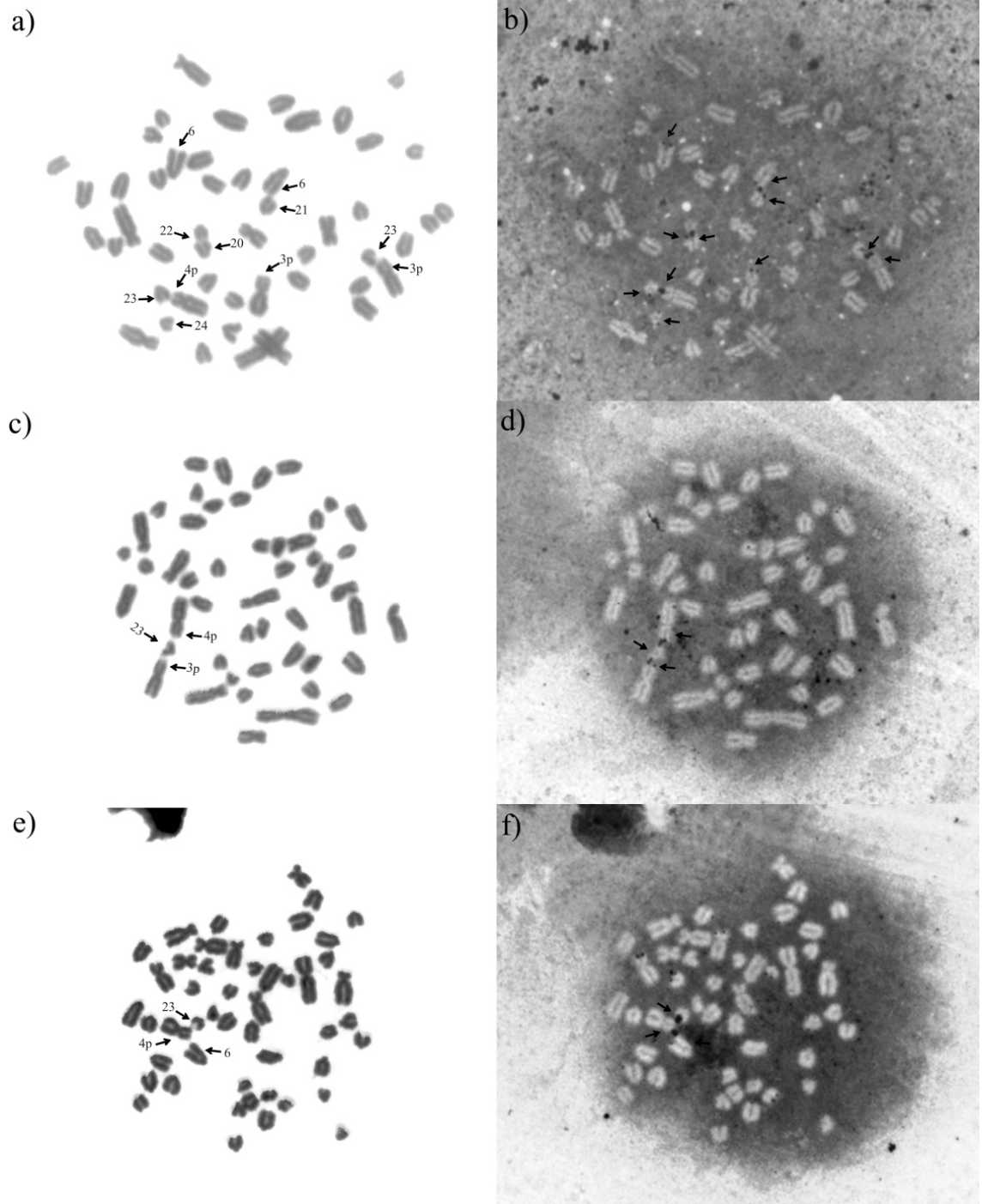


**Figure 1:** Sequential analysis of Giemsa/Ag-NOR in one female of Baio type  $2n=50$ ; The arrows point to the NORs in the telomérica position of chromosomes 3p, 4p, 6, 21, 23 and 24. In addition, it is observed expression of the homologous 4 e 6 pairs.

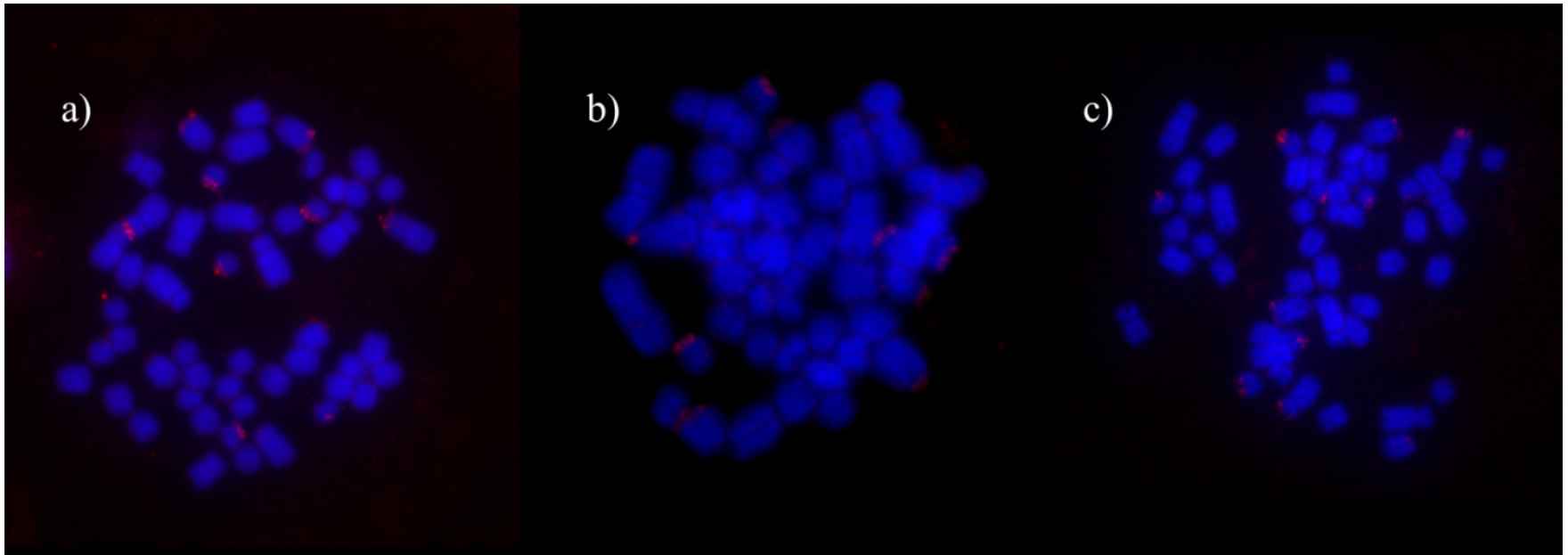




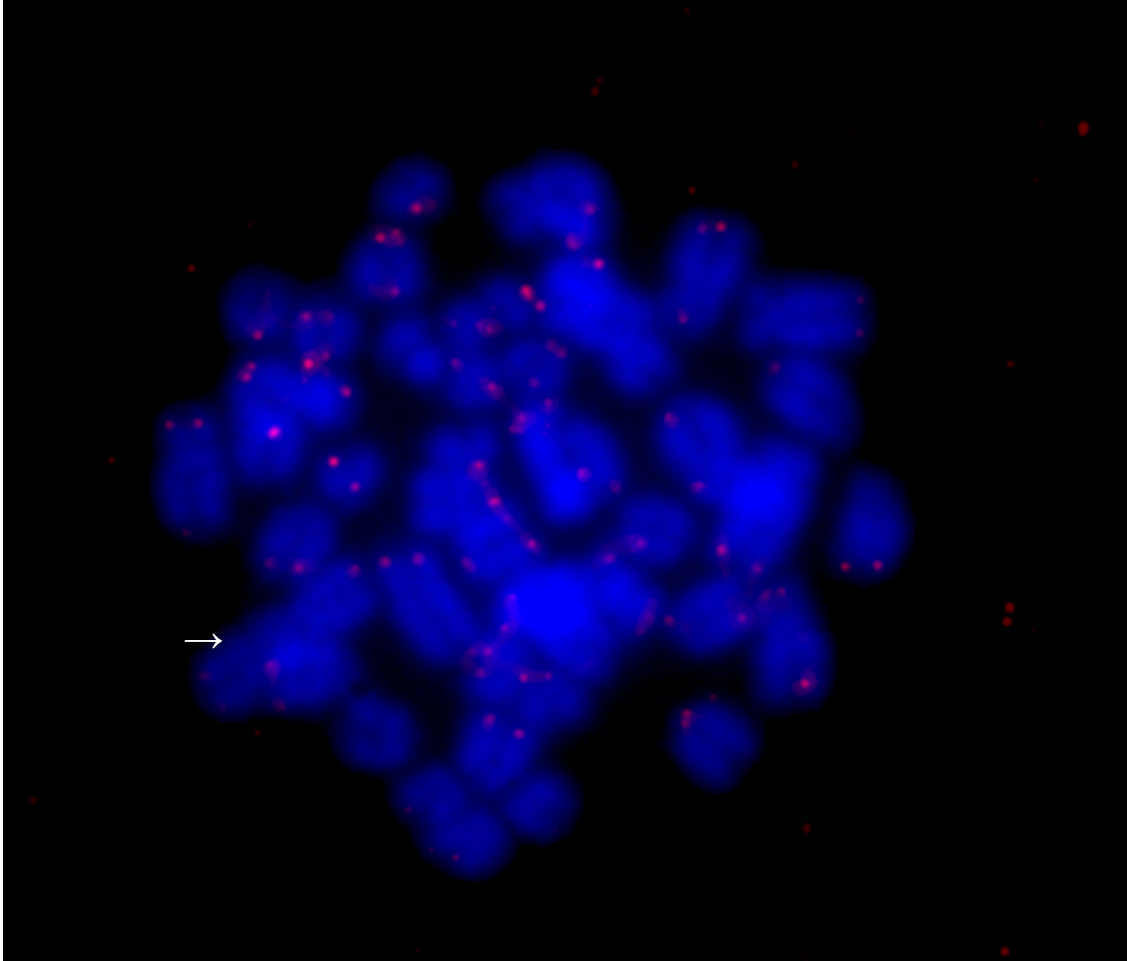
**Figure 2:** Sequential analysis of Giemsa/Ag-NOR in one representative male from the Carabao breed  $2n=48$ ; The arrows point to NORs in the telomeric position of the chromosomes 4p, 6, 20, 22 and 23. In addition it is observed the expression of the homologous 4p, 20 e 23 and a triple association among chromosomes 4p, 20, 22 and a double association between chromosomes 4p and 23.



**Figure 3:** Sequential analysis of Giemsa/Ag-NOR in one representative female from crossbred F1 with  $2n=49$  chromosomes; In b, it is observed 11 chromosomes being expressed. Eight of these are presented in association as indicated by the arrows\*; In d, 5 chromosomes are expressed and one triple association is observed among 3p e 4p e 23; In f, it is observed 7 chromosomes expressed, being three chromosomes associated in 4p, 6 and 23.



**Figure 4:** Metaphases stained with DAPI (blue) in FISH analysis with 18S probe (signals red) in three cytotypes the buffaloes: a) Baio type  $2n=50$ , 12 signals; b) Carabao breed  $2n=48$ , 10 signals and c) crossbreed  $2n=49$ , 11 signals.



**Figure 5:** FISH analysis showing the telomeric sequence of a representative metaphase of one female crossbreed with  $2n=49$  chromosomes. The chromosomes are stained with DAPI (blue) and the telomeric probes are the red signals in the telomeres of met/submetacentric and telocentric chromosomes. The arrow points to the position of tandem fusion (4p;9) of chromosome 1 from swamp buffaloes which do not show telomeric sequence.

## 4.5 DISCUSSION

Buffaloes type Baio are typical river buffaloes (*B. bubalis bubalis*) with  $2n=50$  and the Carabao breed is the only representative of swamp buffaloes (*B. bubalis Kerebau*), with  $2n = 48$ . The 18S FISH analysis confirms the location of telomeric NORs of pairs (3p, 4p, 6, 21, 23 and 24) in the karyotype of the river type and the chromosomes pairs (4p, 6q, 20, 22 and 23q) from swamp type. These observation is in agreement with Iannuzzi et al. (1996) but partially disagree with Di Berardino et al. (1981) and Hilmi and Bongso (1983). The latter, studying Murrah buffaloes, showed NORs on chromosome 8, corresponding to 6 in this work, this discrepancy may have its origin in the difficulty of correct identification of these chromosomes, since they have similar size and morphology.

For the buffaloes crossbreed F1 with  $2n=49$ , there are 11 chromosomes carrying NORs, which is the maximum number observed for these samples, corresponding to a member of each chromosome pair from their parents: river buffalo (3p, 4p, 6, 21, 23 and 24) and swamp buffalo (4p, 6, 20, 22 and 23). This result was confirmed using 18S ribosomal probe (Figure 4c). According to the chromosomal homologies among buffaloes, in the crossbreed F1 occurs the formation of five pairs plus the NORs of the chromosome 4p in the river type (Table 1).

The divergence in the number of NORs observed among buffaloes is linked directly with the tandem fusion event between chromosomes 4p and 9 of ancestral karyotype of river buffalo  $2n=50$ . This event was responsible for the reduction to 48 in the chromosome number of swamp buffaloes and the formation of the large metacentric chromosome 1, also for the loss of one site NORs present in the short arm of ancestor chromosome 4p in agreement with Tanaka et al. (2000). In addition, it was observed a reordering of some pairs during the assembly of the karyotype  $2n = 48$ , whereas the merged chromosome 4p;9 identified as a large metacentric complement from swamp buffalo occupies the first position on the karyotype. Accordingly, the NORs from chromosome 3p of river karyotype changes to position 4 in swamp karyotype as well as chromosomes 21, 23 and 24 become 20, 22 and 23, respectively.

Such fact when neglected, results in erroneous comparison among karyotypes and consequently the establishment of NORs homology (Table 1). This could justify why Hilmi and Bongso (1983) described swamp buffaloes showing NORs in the chromosomes 3p, 8, 21, 23 and 24. The correct identification of chromosome pairs is crucial not only for the

establishment of homeology of NORs between river and swamp buffaloes but also for comparison with other species, such as cattle, sheep, goat and Tamaraw buffalo (Table 1).

**Table 1:** Chromosome homeology containing NORs of different Bovidae species and crossbreed buffaloes.

| Group           | 2n |                    | Chromosomes |    |    |         |       |  |
|-----------------|----|--------------------|-------------|----|----|---------|-------|--|
| River buffalo   | 50 | 3p 4p              | 6           | 21 | 23 | 24      |       |  |
| Swamp buffalo   | 48 | 4p *               | 6           | 20 | 22 | 23      |       |  |
| Tamaraw buffalo | 46 | 5p                 | 7           | 19 | 21 | 22      |       |  |
| Crossbreed F1   | 49 | 3p 4p <sup>a</sup> | 6           | 21 | 23 | 24      |       |  |
| Cattle          | 60 |                    | 28 3        |    | 27 | 6 11 22 |       |  |
| Sheep           | 60 |                    | 25 1p       |    |    | 6       | 2q 3p |  |
| Goat            | 60 |                    | 28 3        |    |    | 6       | 2 5   |  |

According to Di Berardino et al. (1985), Di Meo et al. (1991), Di Meo et al. (1993), Iannuzzi et al. (1996), Tanaka et al. (2000). \* NORs lost during tandem fusion 4p;9 from ancestor karyotype of river buffalo, <sup>a</sup> NORs belonging a river type that do not present homology in the crossbreed.

The G banding studies indicated that the first five pairs bibraquials of river buffaloes are homologous to chromosomes (1;27, 2;23, 8;19, 5;28 and 16;29) of the cattle, which had centric fusion throughout evolution. Thus, we conclude that the NORs present on chromosome 4p buffalo river has homeology on chromosome 28 cattle being preserved. In a second fusion event (4;9) the NORs was lost resulting in the divergence of number among buffaloes agreeing with Di Berardino et al. (1981).

The NORs of chromosome number 6 of both buffaloes (Iannuzzi et al. 1996) is the only one shared among species of the Bovidae family (Table 1), homologous to chromosome 3 of cattle (Di Berardino et al. 1985), 1p of sheep (Di Meo et al. 1,991), 3 of goat (Di Meo et al. 1,993) and 7 from tamaraw buffalo (Tanaka et al. 2000).

In this work different chromosomes were observed in associations NORs for both, river and swamp buffaloes, and also in the crossbread F1, a similar result found by Iannuzzi et al. (1996), which tributes it to the great number of chromosomes carrying the ribosomal genes in these animals. However, related to the large number of active NORs per cell, this observation is uncommon, for example, for humans no more than three or four of the five pairs of chromosomes which carry these genes are expressed.

#### 4.6 Funding

This work was supported by a scholarship grant from Coordination of Improving Senior Staff (CAPES) to TMG; and grants from Federal University of Pampa (Ed. GP 2011 and 2012, PROPESQ/UNIPAMPA) and Brazilian Agricultural Research Corporation (Code SEG 01.06.01.06.00.04, EMBRAPA).

#### 4.7 Acknowledgements

Especial thanks to Rafael Kretschmer, Fabiano Pimentel Torres and Adriana Koslovski Sassi for the technical support.

#### 4.8 REFERENCES

- Bongso TA, Hilmi M. 1982. Chromosome banding homologies of a tandem fusion in river, swamp and crossbred buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Can J Genet Cytol.* 24:661-613.
- Di Berardino D, Iannuzzi L, Bettini TM, Matassino D. 1981. Ag-NORs variation and banding homologies in two species of Bovidae: *Bubalus bubalis* and *Bos taurus*. *Can J Genet Cytol.* 23:89-99.
- Di Berardino D, Lioi MB, Iannuzzi L. 1985. Identification of nucleolus organizer chromosomes in cattle (*Bos taurus* L.) by sequential silver staining + RBA banding. *Caryologia*, 38:95-102.
- Di Meo GP, Perucatti A, Floriot S, Hayes H, Schibler L, Incarnato D, Di Berardino D, Williams J, Crihiu E, Eggen A, Iannuzzi L. 2008. An extended river buffalo (*Bubalus bubalis*, 2n = 50) cytogenetic map: assignment of 68 autosomal loci by FISH-mapping and R-banding and comparison with human chromosomes. *Chromosome Res.* 16: 827-837.
- Di Meo GP, Iannuzzi L, Ferrara L and Rubino R. 1991. Identification of nucleolus organizer chromosomes in goat (*Capra hircus*). *Caryologia.* 44: 309-316.

Di Meo GP, Iannuzzi L, Perucati A, Ferrara L. 1993. Identification of nucleolus organizer chromosomes in sheep (*Ovis aries* L.). *Cytobios.* 75:183-190.

Hilmi M, Bongso TA. 1983. Nucleolus organizer regions in the chromosomes of river, swamp and crossbred buffaloes [Malaysia]. *Philipp J Vet Anim Sci.* 9:269-270.

Howell WM, Black DA. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one step method. *Experientia.* 36:1014-1015.

Hsu TC, Sperito SE, Pardue ML. 1975. Distribution of 18-28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma* 53:25-36.

Iannuzzi L, Di Meo GP, Perucatti A, Schibler L, Incarnato D. 2003. The river buffalo (*Bubalus bubalis*,  $2n = 50$ ) cytogenetic map: assignment of 64 loci by fluorescence in situ hybridization and R-banding. *Cytogenet Genome Res.* 102: 65-75.

Iannuzzi L, Di Meo GP, Perucatti A. 1996. Identification of nucleolus organizer chromosomes and frequency of active NORs in river buffalo (*Bubalus bubalis* L.) *Caryologia* 49: 27-34.

Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res.* 20:613-616.

Shubert I, Künzel G. 1990. Position dependent NOR activity in barley. *Chromosoma* 99:352-359.

Tanaka K, Matsuda Y, Masangkay JS, Solis CD, Anunciado RVP, Kuro-O M, Namikawa T. 2000. Cytogenetic analysis of the Tamaraw (*Bubalus mindorensis*): a comparison of R-banded karyotype and chromosomal distribution of centromeric satellite DNAs, telomeric sequence, and 18s-28s rRNA genes with domestic water buffaloes. *J Hered.* 9:117-121.

Tanaka K, Matsuda Y, Masangkay JS, Solis CD, Anunciado RVP and Namikawa T. 1999. Characterization and chromosomal distribution of satellite DNA sequences of the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *J Hered.* 90: 418-422.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os animais do tipo Baio pertencem ao grupo conhecido como búfalos de rio caracterizados por apresentar  $2n=50$ , enquanto que os animais da raça Carabao,  $2n=48$ , são típicos búfalos de pântano.

A hibridização entre búfalos de rio e de pântano é viável e seu produto é fértil, sendo a F1 identificada apenas por características citogenéticas tais como:  $2n=49$ , pareamento entre os cromossomos 1 do citótipo de pântano 4 e 9 de rio e presença de 11 sítios cromossômicos para as NORs.

O híbrido F1 quando realizado o retrocruzamento produz animais com  $2n=48$ , 49, ou 50, tal fato indica a produção de gametas viáveis  $n= 24$  ou 25. Apesar disso, a meiose em híbridos segue padrões de segregação mendeliana, sendo assim os animais descendentes de F1 híbridos, com cariótipos  $2n=48$  e 50 apesar de possuírem valores diplóides e morfologia cromossômica típica de seus parentais, devem ser olhados com atenção, pois, descendem de híbridos F1. Sendo assim estes podem ser identificados apenas com marcadores moleculares tais como os locus microssatélites ou genes mitocondriais.

As regiões organizadoras do nucléolo no tipo Baio encontram-se em seis pares cromossômicos e na raça Carabao em cinco. Estas diferenças não interferem na formação do híbrido, podendo ainda lhe conferir vantagens visto as diferentes origens destes sítios que podem ser expressos frequentemente.

Os resultados obtidos neste trabalho possibilitaram uma maior compreensão sobre os processos que envolvem o fenômeno da hibridação entre búfalos de rio e de pântano. Além disso, também forneceram parâmetros essenciais para o programa de conservação genética, especialmente para o manejo reprodutivo dos animais, onde foram excluídos os animais descendentes de híbridos do programa. Assim sendo, as análises citogenéticas passaram a ser uma ferramenta para seleção dos animais no programa antes do encaminhamento reprodutivo, selecionando reprodutores livres de alterações cromossômicas.

## 6 REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M.S.; EGITO, A.A.; PAIVA, S.R.; MARQUES, J.R.F.; CASTRO, S.T.R.; COSTA, M.R.; MARIANTE, A.S. **Conservação e caracterização de búfalos no Brasil: Uma revisão da literatura**. Documentos EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia Brasília-DF 2006.
- BERARDINO, D.I.; IANNUZZI, L.; BETTINI, T.M.; MATASSINO, D. **Ag-NORs variation and banding homologies in two species of Bovidae: *Bubalus bubalis* and *Bos taurus***. Can. J. Genet. Cytol. 23: 89-99, 1981.
- BONGSO, T.A.; HILMI, M. **Chromosome banding homologies of a tandem fusion in river, swamp, and crossbred buffaloes (*Bubalus bubalis*)**. Can. J. Genet. Cytol. 24: 667-673, 1982.
- DEGRANDI, T.M.; REIMCHE, R.B.; MARQUES, J.R.F.; GUNSKI, R.J. **Cytogenetic characterization of swamp (*B. bubalis kerebau*) and river (*B. bubalis bubalis*) buffaloes and respective progeny**. Ver. Vet. UNNE. 21: 358-162, 2010.
- EGITO A.A.; MARIANTE A.S.; ALBUQUERQUE M.S.M. **Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais**. Arch. Zootec. 51: 39-52, 2002.
- 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.
- HARISAH M.; AZMI T.I.; HILMI M.; VIDYADARAN M.K.; BONGSO T.A.; NAVA Z.M.; MOMONGAN V.; BASRUR P.K. **Identification of crossbred buffalo genotypes and their chromosome segregation patterns**. Genome. 32: 999-1002, 1989.
- MARIANTE, A.S. **Conservação de Recursos Genéticos Animais: uma questão de bom senso**. In: 30a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Anais. Rio de Janeiro. 175-182, 1993.

MARQUES, J.R.F.; COSTA, M.R.; EGITO, A.A.; MARIANTE, A.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.; COSTA, M.R.; CAMARGO J.R.N.C.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; MARQUES, L.C.; AGUIAR, J.F. **Conservação e melhoramento dos recursos genéticos animais da Amazônia brasileira.** In: X CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA - João Pessoa - PB. Perfil profissional e demanda de mercado. ABZ UFPB/CCA - EMBRAPA CAPRINOS. 1: 1-14, 2008.

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