



## REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLOS EM BÚFALOS DAS RAÇAS MURRAH, JAFARABADI E MEDITERRÂNEA, DO ESTADO DE SÃO PAULO<sup>1,2</sup>

RITA MARIA LADEIRA PIRES<sup>3</sup>, BENEDICTO DO ESPÍRITO SANTO DE CAMPOS<sup>4</sup> e SANAE KASAHARA<sup>5</sup>

**RESUMO** - As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foram analisadas em 50 exemplares de búfalos do rio ( $2n = 50$ ) criados no Estado de São Paulo, sendo 19 da raça Murrah, 17 da raça Jafarabadi e 14 da raça Mediterrânea. Nas três raças, as RONs estavam localizadas em seis pares de cromossomos, nas regiões teloméricas identificadas como 3p, 4p, 8q, 21q, 23q e 24q. Verificou-se que os números médios de RONs por célula não diferiram significativamente ( $p > 0,01$ ) em cada uma das raças de búfalos. Vários tipos de associações de RONs foram observados, sendo mais freqüente o de duas RONs localizadas em cromossomos acrocêntricos. O coeficiente de correlação entre o número de RONs por célula e o número de associações foi estatisticamente significativo ( $p < 0,01$ ) para cada raça. Os animais das três raças mostraram, predominantemente, o padrão +/- de marcação de RONs nos pares 3, 4 e 8, isto é, somente um dos homólogos de cada par apresentava RON geneticamente ativa. Nas raças Jafarabadi e Mediterrânea, o cromossomo 3 marcou mais freqüentemente enquanto o 8, menos, e na raça Murrah, um dos acrocêntricos pequenos era o mais freqüentemente marcado e o 4 foi o que marcou menos.

**Termos para indexação:** citogenética de búfalos, cromossomo, regiões organizadoras de nucléolos, RONs.

*NUCLEOLUS ORGANIZER REGIONS IN BUFFALOES OF MURRAH, JAFARABADI, AND MEDITERRANEAN BREEDS, FROM THE STATE OF SÃO PAULO*

**SUMMARY** - The nucleolus organizer regions (NORs) were studied in 50 river buffaloes ( $2n = 50$ ), from the State of São Paulo, being 19 Murrah, 17 Jafarabadi and 14 Mediterranean. In the three breeds, NORs were located in six chromosome pairs, on the telomeric regions identified as 3p, 4p, 8q, 21q, 23q, and 24q. The mean numbers of NORs per cell were not significantly different ( $p > 0.01$ ) among each breed of buffaloes. Several types of NORs associations occurred and the most frequently observed involved two NORs located in acrocentric chromosomes. The correlation coefficient between the number of NORs and the number of associations was statistically significant ( $p < 0.01$ ) for each breed. The animals of the three breeds showed predominantly the +/- NOR pattern for the pairs 3, 4 and 8, that is, only one of the homologues of each pair exhibited genetically active NOR. The frequency of NORs was highest for pair 3 and lowest for pair 8, in the Mediterranean and Jafarabadi breeds, while in Murrah, it was highest for one of the small acrocentric and lowest for pair 4.

**Index terms:** buffalo cytogenetics, chromosome, nucleolus organizer regions, NORs.

<sup>1</sup> Projeto IZ 034/88. Parte da Dissertação de Mestrado da primeira autora.

<sup>2</sup> Trabalho realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

<sup>3</sup> Seção de Reprodução e Inseminação Artificial, Instituto de Zootecnia (IZ).

<sup>4</sup> Seção de Estatística e Técnica Experimental, IZ.

<sup>5</sup> - Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP.



## INTRODUÇÃO

No estudo das regiões organizadoras de nucléolos em vários grupos de animais tem sido utilizada, predominantemente, a coloração pelo nitrato de prata como um procedimento simples e rápido para a visualização citológica das RONs ativas (GOODPASTURE e BLOOM, 1975; BLOOM e GOODPASTURE, 1976; HOWELL e BLACK, 1980).

O estudo das RONs assim identificadas tem mostrado uma grande variabilidade quanto ao número e localização bem como em relação à quantidade de DNA ribossômico contido nas mesmas, de tal modo que a caracterização cromossômica pode ser melhor detalhada com a técnica de impregnação pela prata.

A análise preliminar de RONs em búfalos do rio, da raça Murrah (*Bubalus bubalis* L.  $2n = 50$ ), revelou que as mesmas estavam localizadas nos telômeros de 5 pares de cromossomos (DI BERARDINO et al., 1979). Posteriormente, DI BERARDINO et al. (1981) encontraram 6 pares portadores de RONs e as localizaram nas regiões 3p, 4p, 8q, 21q, 23q e 24q, uma vez que esses autores utilizaram o bandeamento R após o tratamento pelo nitrato de prata.

Posteriormente, PRAKASH e BALAKRISHNAN (1992 e 1994), estudando as regiões organizadoras de nucléolos em búfalos das raças Meshana, Surti e também da raça Murrah, verificaram como sendo portadores de RONs os pares cromossômicos indicados por DI BERARDINO et al. (1981), com exceção de um par. As RONs foram localizadas nos braços longos dos cromossomos 6 no lugar dos cromossomos 8.

Com a padronização das bandas nos cariótipos do búfalo do rio pelo comitê coordenado por IANNUZZI (1994), ficou estabelecido, através da análise seqüencial com as técnicas de impregnação pelo nitrato de prata e de banda R, que as RONs estão localizadas, de fato, nos telômeros 3p, 4p, 8q, 21q, 23q e 24q.

No presente trabalho, são apresentados os dados relativos à variação das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) em búfalos do rio pertencentes às raças Murrah Jafarabadi e Mediterrânea criadas no Estado de São Paulo. Essa amostra é parte de um estudo mais amplo (PIRES, 1995) que teve como objetivo a caracterização cromossômica das três raças de búfalos, com as técnicas de bandas, e a obtenção de dados sobre a ocorrência de possíveis alterações cromossômicas em rebanhos do Estado de São Paulo.

## MATERIAL E MÉTODOS

As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foram analisadas em uma amostra de 50 búfalos do rio (*Bubalus bubalis* L.  $2n = 50$ ) procedentes de sete

plantéis de diferentes localidades do Estado de São Paulo. Dessa amostra, 19 pertenciam à raça Murrah, 17 à raça Jafarabadi e 14 à raça Mediterrânea. As metáfases foram obtidas através de cultura de linfócitos de sangue periférico, realizada de acordo com a técnica de MOORHEAD et al. (1960), com algumas modificações.

Para coloração das RONs, foi empregada a técnica de HOWELL e BLACK (1980) com algumas modificações. As lâminas foram submetidas a técnica, pelo menos 7 dias após seu preparo. Inicialmente, foram colocadas em solução de HCl 1N, a 60° C, por 3 minutos e secadas ao ar. Sobre cada lâmina, foi pingada uma gota de solução coloidal reveladora, contendo 1g de gelatina dissolvida em 50 ml de ácido fórmico, juntamente com duas gotas de solução de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) a 50%. As lâminas foram cobertas com lamínulas e incubadas a 60°C em banho-maria. O tempo ideal de incubação foi de aproximadamente 3 minutos, após o qual foram lavadas e coradas, por 30 segundos, em solução de Giemsa, a 3%, em tampão fosfato, PH 6,8.

Um mínimo de 6 e um máximo de 29 metáfases com pelo menos uma RON foram analisadas por animal, perfazendo uma amostra de 1.088 metáfases analisadas nas três raças. Os cromossomos de cada metáfase foram desenhados e contado o número de RONs e o de associações. Dentre os cromossomos portadores de RONs, foi possível identificar apenas os pertencentes aos pares 3, 4 e 8 através do tamanho e morfologia. Os demais cromossomos, pertencentes aos pares 21, 23 e 24, por serem acrocêntricos pequenos não foram identificados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de 1088 metáfases de búfalos das raças Murrah, Jafarabadi e Mediterrânea (*Bubalus bubalis* L.  $2n = 50$ ) com tratamento pelo nitrato de prata, confirmou a ocorrência de 6 pares de cromossomos organizadores de nucléolos. Embora não se tivesse empregado análise seqüencial dos cromossomos com a técnica de RONs e de bandas R, G ou Q, pode-se afirmar que a localização das RONs corresponde àquela indicada na padronização feita por IANNUZZI (1994). Os pares 3 e 4, identificados mesmo sem técnica de bandeamento, apresentam as RONs nos braços curtos enquanto que os demais que correspondem aos acrocêntricos 8, 21, 23 e 24 localizam-se nos braços longos.

Tal como acontece usualmente nos casos em que ocorrem múltiplas RONs, observou-se nos animais das três raças uma grande variação quanto ao número de RONs marcadas por metáfase em cada indivíduo (figura 1, Quadros 1, 2 e 3). Raramente ocorriam 12 RONs por



metáfase, o que corresponde ao número máximo de marcações possíveis. Somente o exemplar 306 da raça Mediterrânea (Quadro 3) apresentou em uma amostra de 28 células uma metáfase com 12 RONs e é interessante notar que, além dela, duas outras tinham 13 marcações. Nesse caso, aparecia uma RON adicional ativa, localizada em um cromossomo acrocêntrico pequeno não identificado. Não foi possível saber a origem da RON extra, devendo ser de ocorrência esporádica, já que foi observada em um único animal de uma amostra de 50 búfalos. Não está descartada, porém, a hipótese de que outros exemplares também apresentem essa RON adicional, a qual deve permanecer inativa na maior parte das suas células.

Dentro de cada uma das raças de búfalos, determinou-se o número médio de RONs por célula, para cada um dos exemplares (Quadros 1, 2 e 3). Na raça Murrah, o número médio de RONs por célula foi igual a  $7,48 \pm 0,07$ , tendo sido observadas de 4 a 11 RONs na amostra de 382 metáfases de 19 indivíduos (Quadro 1). Diferenças significativas nas médias de marcações só foram observadas, de acordo com o teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade, entre exemplares que apresentavam valores muito discrepantes entre si, isto é, valores médios de marcações abaixo de 6,88 e acima de 8,04. Na raça Jafarabadi, na qual foram observadas  $6,74 \pm 0,06$  RONs em uma amostra de 413 metáfases de 17 indivíduos (Quadro 2), diferenças significativas ocorreram entre animais que tinham números médios de RONs abaixo ou acima de 6,20 e 7,25, respectivamente. Na raça Mediterrânea, o número médio de RONs foi igual a  $7,31 \pm 0,09$  em uma amostra de 293 células pertencentes a 14 exemplares (Quadro 3). Diferenças significativas foram observadas entre os animais que apresentavam valores médios de RONs abaixo de 6,44 e acima de 8,09.

Os números médios de RONs observados nas raças Murrah (7,48), Mediterrânea (7,31) e Jafarabadi (6,74) não diferiram significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, de modo que não há diferenciação das três raças sob o ponto de vista do número de RONs que estão ativas nas células. DI BERARDINO et al. (1981) encontraram número médio de RONs por célula igual a 6,3 para animais da raça Murrah enquanto PRAKASH e BALAKRISHNAN (1992) observaram valores mais altos, isto é, 8,58 na raça Murrah, 9,13 na Surti e 9,25 na Meshana. Diferenças no número médio de RONs podem ser indicativas de que existem variações raciais, mas não se deve descartar a hipótese de serem decorrentes da técnica empregada para evidenciar RONs ou mesmo do critério de se considerar presença ou ausência de RONs quando se tem apenas leve marcação.

Os cromossomos portadores de RONs apareciam, freqüentemente, associados entre si em número de dois, três e até quatro cromossomos, acrocêntricos (A) ou submetacêntricos (S), em arranjos dos tipos AA, AS, SS, AAA, AAS, ASS e AAAS (figura 1, Quadros 1, 2 e 3). O tipo mais freqüente de associação de RONs nas três raças de búfalos foi o tipo AA seguido do tipo AS. As associações do tipo SS eram menos freqüentes, pois o número de submetacêntricos que são organizadores de nucléolos é menor do que o de acrocêntricos, isto é, quatro e oito respectivamente. Associações de três cromossomos envolviam, em geral, acrocêntricos (AAA), não tendo sido observada nenhuma célula, em nenhum animal, associação só entre submetacêntricos (SSS) entre as 1088 células analisadas. O tipo ASS foi encontrado em algumas células da raça Murrah. Já associações entre quatro cromossomos eram raras e só foram observadas nas raças Murrah e Jafarabadi, ambas do tipo AAAS.

A freqüência de associações de RONs por célula variava nos animais de cada raça. Na raça Murrah estava entre 0,05 e 1,24 (média de 0,52), na raça Jafarabadi, entre 0,16 e 0,88 (média de 0,41), enquanto na Mediterrânea, entre 0,10 e 0,96 (média de 0,43); porém, diferenças significativas foram observadas apenas entre alguns exemplares de cada amostra. As freqüências médias de associações de RONs das três raças não diferiram significativamente ( $p > 0,01$ ).

O coeficiente de correlação entre o número de RONs e o número de associações na mesma célula foi significativo apenas para um pequeno número de animais dentro de cada raça, porém, considerando a população total de células em cada amostra, o coeficiente de correlação entre essas duas variáveis foi significativo, a nível de 1% de probabilidade, isto é, quanto maior o número de RONs por célula, maior a probabilidade de associação. Esses resultados evidenciam que o número de metáfases analisadas por exemplar deve ter influenciado na determinação do coeficiente de correlação individual, porém, foi suficiente para a análise de cada grupo racial.

DI BERARDINO et al. (1981), estudando búfalos da raça Murrah, observaram o mesmo padrão de associações de RONs da nossa amostra. Havia maior freqüência de associações entre dois cromossomos bem como correlação significativa entre o número de RONs e o número de associações por célula, em apenas alguns animais. No entanto, ao contrário de nossos dados, considerando o grupo racial como um todo, os autores não encontraram correlação significativa entre esses dois parâmetros.



A distribuição e a freqüência das RONs nos pares cromossômicos 3, 4 e 8 foram determinadas em cada célula dos exemplares das três raças (Quadros 4, 5 e 6). Para os demais pares cromossômicos, que não são identificados individualmente 21, 23 e 24 foram considerados em conjunto para a determinação das freqüências de RONs. O par de cromossomos 3, 4 ou 8 foi considerado em homozigose positiva (+/+), se as RONs apareciam marcadas nos dois homólogos, em heterozigose (+/-), se havia apenas uma RON ativa e em homozigose negativa (-/-), se nenhum dos homólogos apresentasse RONs ativas. Para os pares 21, 23 e 24 não foram consideradas as distribuições de células +/+; +/- e -/-.

De modo geral, o padrão predominante para os três cromossomos era do tipo +/--. Em apenas um exemplar Murrah e um Mediterrâneo havia marcação do tipo +/+ significativamente maior para os cromossomos do par 8, isto é, os dois cromossomos desse par apresentaram marcação de RONs, em número significativo de células. Enquanto o padrão -/-, (ausência de marcação de RON nos homólogos do par), ocorria raramente nas células da maioria dos animais das raças Murrah e Mediterrânea, na raça Jafarabadi tal padrão apareceu em todas as células analisadas de cinco animais, com relação ao par 8 e em três animais com relação ao par 4, sendo que em um desses ocorreu tanto para o par 4 como para o par 8. Nas raças Murrah e Mediterrânea, o padrão -/- em todas as células ocorreu somente em um animal de cada raça e se referia aos pares 4 e 8.

PRAKASH e BALAKRISHNAN (1992), quando analisaram búfalos das raças Murrah, Surti e Meshana, encontraram animais sem marcações de RONs em homólogos de determinados pares, em todas as células analisadas. Na raça Murrah, isso foi mais freqüentemente observado para o par 4, seguido do par 3. Segundo os autores, não se sabe se diferenças na freqüência ou número de RONs oferece alguma vantagem para o indivíduo, raça ou espécie.

A freqüência de RONs foi calculada separadamente para os pares 3, 4 e 8, enquanto que para os demais, (acrocêntricos 21, 23 e 24) foi obtida a freqüência de RONs para o grupo. Na raça Murrah, as freqüências de marcação de RONs nos pares 3, 4 e 8 e no grupo dos acrocêntricos pequenos foram, respectivamente, 61, 50, 60 e 67% (Quadro 4). A análise do Qui-quadrado para todos os pares mostrou diferença significativa da distribuição da freqüência de RONs ( $\chi^2 = 76,62^{**}$ ). Demonstrou-se que os pares de acrocêntricos, individualmente, têm maior freqüência de RONs quando comparados com o par 3 ( $\chi^2 = 10,20^{**}$ ). Este por sua vez não difere do par 8 em freqüência de

marcação ( $\chi^2 = 0,07$ ) e o par 8 marca mais freqüentemente que o par 4 ( $\chi^2 = 16,94^{**}$ ). Na raça Jafarabadi foram, respectivamente, 80, 42, 27 e 62% (Quadro 5). A análise do Qui-quadrado para todos os pares mostrou diferença significativa na distribuição de RONs a nível de 1% de probabilidade ( $\chi^2 = 585,33^{**}$ ). Demonstrou-se maior freqüência de RONs para o par 3 quando comparado com os pares de acrocêntricos pequenos ( $\chi^2 = 90,24^{**}$ ) e estes em relação ao par 4 ( $\chi^2 = 106,83^{**}$ ). O par 4, por sua vez, tinha freqüência de marcação maior que a do par 8 ( $\chi^2 = 38,98^{**}$ ). Já na raça Mediterrânea, a freqüência de marcação para os mesmos pares foram, respectivamente, 73, 50, 42 e 67% (Quadro 6). A análise do Qui-quadrado para todos os pares mostrou diferença significativa da distribuição de freqüência de RONs ( $\chi^2 = 183,43^{**}$ ). Demonstrou-se maior freqüência de RONs para o par 3, quando comparado com os pares de acrocêntricos pequenos ( $\chi^2 = 10,28^{**}$ ). Esses, por sua vez, marcaram mais freqüentemente que o par 4 ( $\chi^2 = 51,70^{**}$ ) que tem, por outro lado, freqüência maior de RONs que o par 8 ( $\chi^2 = 7,92^{**}$ ). Pelos resultados obtidos pelo teste do Qui-quadrado pode-se concluir que nas raças Jafarabadi e Mediterrânea, o cromossomo 3 marca mais e o que marca menos é o 8, enquanto que na raça Murrah, um dos acrocêntricos pequenos (sem identificar qual) marca mais e o que marca menos é o cromossomo 4. PRAKASH e BALAKRISHNAN (1992) encontraram também para a raça Murrah menor freqüência de marcação de RONs para o cromossomo 4, mas quanto ao de maior freqüência, os autores encontraram o correspondente ao 8.

Comparando-se as freqüências de marcações de RONs entre as raças, para cada um dos pares portadores de RONs pelo teste do Qui-quadrado, demonstrou-se que existem diferenças significativas. Em relação ao par 3, verificou-se que os cromossomos desse par marcaram menos na raça Murrah que na raça Mediterrânea ( $\chi^2 = 23,64^{**}$ ) e, por sua vez, marcaram menos que na Jafarabadi ( $\chi^2 = 8,77^{**}$ ). Enquanto o par 4 mostrou freqüência de marcação semelhante nas raças Murrah e Mediterrânea ( $\chi^2 = 0$ ), esta é menor na Jafarabadi ( $\chi^2 = 13,54^{**}$ ). O par 8 marcou mais na raça Murrah que na raça Mediterrânea ( $\chi^2 = 179,24^{**}$ ) e nesta, por sua vez, mais do que na Jafarabadi ( $\chi^2 = 32,76^{**}$ ). Os três pares acrocêntricos pequenos, sem diferenciá-los individualmente, mostraram marcação de RONs em freqüências semelhantes nas raças Murrah e Mediterrânea ( $\chi^2 = 0,32$ ), porém diferindo da encontrada na Jafarabadi que apresentou menos marcação ( $\chi^2 = 14,73^{**}$ ).



Se considerarmos, finalmente, a totalidade das metáfases analisadas na amostra de animais das três raças e comparando-se as marcações nos pares 3, 4, 8 e acrocêntricos pequenos, verificou-se que os cromossomos do par 3 marcaram mais freqüentemente que os acrocêntricos ( $\chi^2 = 31,23^{**}$ ) e estes, por sua vez, marcaram mais do que o par 4 ( $\chi^2 = 231,36^{**}$ ) e estes mais do que o par 8 ( $\chi^2 = 7,36^{**}$ ).

Os nossos resultados sobre o padrão da marcação de RONs nos cromossomos homólogos, bem como as freqüências de marcação em cada um dos pares cromossômicos, apesar de algumas diferenças significativas, parecem refletir mais uma variação individual do que propriamente uma diferenciação racial no controle genético da atividade das regiões organizadoras de nucléolos.

### CONCLUSÕES

- As regiões organizadoras de nucléolos nas três raças estão localizadas nas regiões teloméricas de seis pares identificados como 3p, 4p, 8q, 21q, 23q e 24q.

- Na maioria dos exemplares o número médio de RONs por célula girava em torno de 6 a 8.

- Os cromossomos portadores de RONs apresentam diferentes tipos de associações, sendo o mais freqüente entre dois cromossomos acrocêntricos e o mais raro entre quatro cromossomos. O coeficiente de correlação entre o número de RONs por célula e o número de associações foi significativo para a raça como um todo.

- Para os pares 3, 4 e 8, considerando as distribuições das células segundo suas marcações +/-, +/- e -/-, o padrão +/- de modo geral era predominante.

- Quanto às freqüências de marcações de RONs, na raça Jafarabadi e Mediterrânea o cromossomo 3 marca mais e o 8 marca menos, enquanto que na raça Murrah, um dos acrocêntricos pequenos, sem identificar qual, marca mais e o que marca menos é o cromossomo 4.

- Embora significativas, as diferenças observadas em relação a alguns parâmetros de RONs são mais sugestivas de variações individuais no controle genético da atividade das regiões organizadoras de nucléolos do que diferenças raciais.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLOOM, S.E., GOODPASTURE, C. An improved technique for selective silver staining of nucleolar

organizer regions in human chromosomes. *Human Genet.*, New York, 34:199-206, 1976.

DI BERARDINO, D., et al. Nucleolus organizer regions in two species of Bovidae. *J. Hered.*, Washington, v. 70, n.1, p.47-50, 1979.

DI BERARDINO, D., et al. Ag-NORS variation and banding homologies in two species of Bovidae: *Bubalus bubalis* and *Bos Taurus*. *Can. J. Genet. Cytol.*, Ottawa, v.23, p.89-99, 1981.

GOODSPASTURE, C., BLOOM, S.E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*, Berlin, v.53, p.37-50, 1975.

HOWELL, W.M., BLACK, D.A. Controlled silver stained of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, Basel, v.36, p.1014-1015, 1980.

IANNUZZI, L. Standard karyotype of the river buffalo (*Bubalus bubalis* L. 2n = 50). *Cytogenet. Cell. Genet.*, Basel, v.67, p.102-113, 1994.

MOORHEAD, P.S., et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.*, New York, v.20, p. 613-616, 1960.

PIRES, R.M.L. Caracterização cromossômica de 3 raças de búfalos (*Bubalus bubalis*) do Estado de São Paulo. Rio Claro: UNESP, 1995. 117 f. Dissertação Mestrado em Ciências Biológicas.

PRAKASH, B., BALAKRISHNAN, C.R. Frequency distribution of silver-stained nucleolus organizer regions of chromosomes 3, 4 and 6 in three breeds on Indian buffaloes. *Indian J. Anim. Sci.*, New Delhi, v.62, n.6, p.566-570, 1992.

PRAKASH, B., BALAKRISHNAN, C.R. Association of nucleolus organizing chromosomes in Indian river buffaloes. *Indian J. Dairy Sci.*, New Delhi, v.47, n.5, p.377-381, 1994.

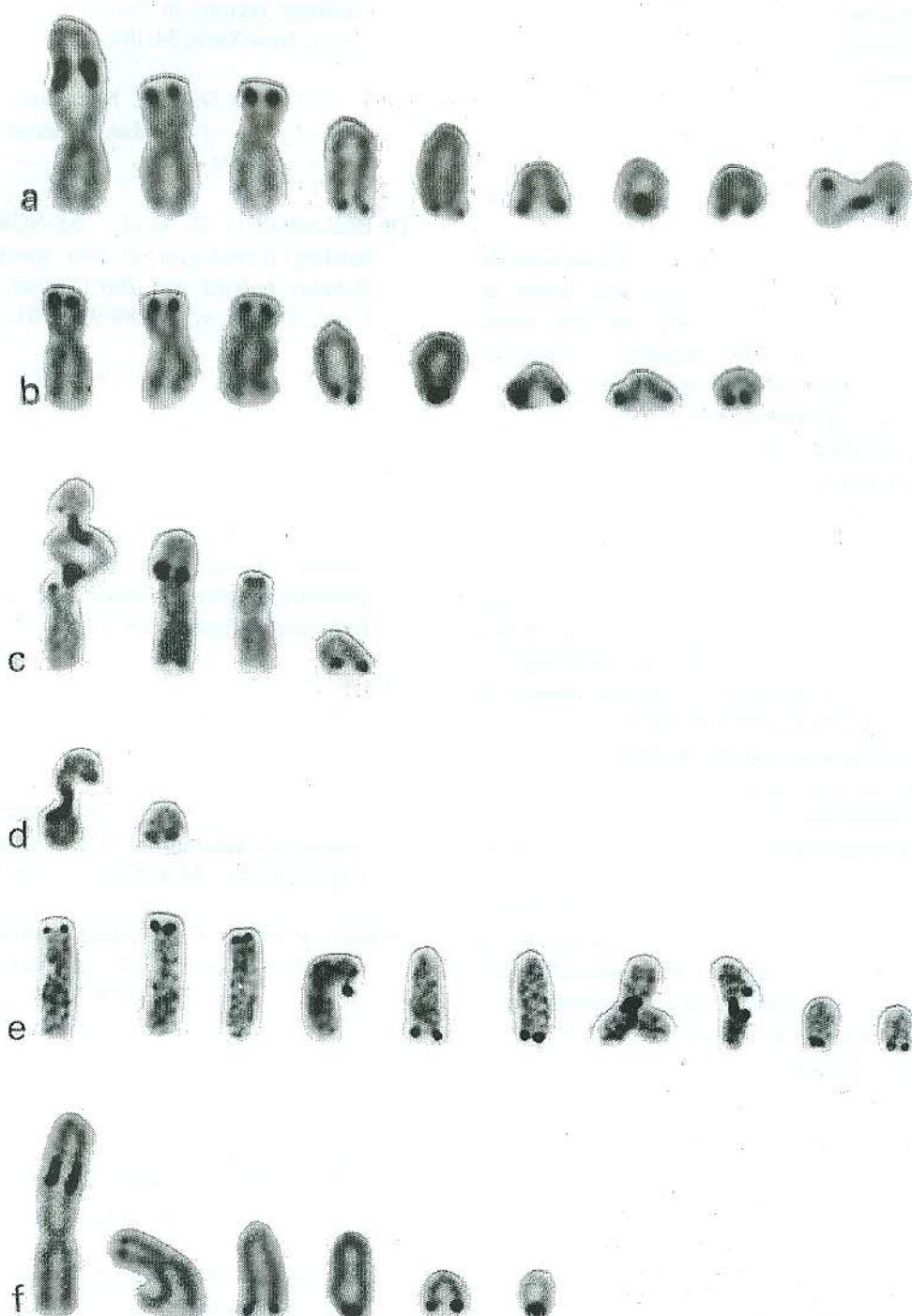


Figura 1. Cromossomos portadores de RONs nas raças Murrah (a e b), Jafarabadi (c e d) e Mediterrânea (e e f).  
a. 11 RONs e duas associações entre dois cromossomos; b. 8 RONs; c. 8 RONs e duas associações entre quatro e dois cromossomos, respectivamente; d. 3 RONs e uma associação entre dois cromossomos; e. 13 RONs e duas associações entre três e dois cromossomos respectivamente; f. 7 RONs e uma associação entre dois cromossomos.



Quadro 1. Número de RONs, associação entre RONs e coeficientes de correlação em 19 búfalos da raça Murrah

Animal	Nº de células	RONs por célula				(r)	Tipos de associações nucleolares								
		$\bar{X} \pm EP$	Teste de Tukey <sup>X</sup>	Int.	Per.		AA	2 crom.	AS	SS	AAA	3 crom.	AAS	ASS	4 crom.
1070	25	8,76 ± 0,26	a	6 - 11	0,88	0,07	7	10	2	2			1		
182	25	8,28 ± 0,20	a	7 - 11	0,88	0,33	8	11	2				1		
1902	25	8,24 ± 0,20	ab	6 - 10	0,64	0,19	8	6	2						
142	25	8,16 ± 0,26	abc	5 - 10	0,56	0,14	9	3			2				
140	25	8,04 ± 0,26	abcd	5 - 10	1,24	0,26	18	10				1	1	1	
1645	25	7,96 ± 0,20	abcd	5 - 10	0,72	0,09	8	6		2	2				
1727	6	7,83 ± 0,31	abcde	7 - 9	0,16	0,76	1								
1101	10	7,80 ± 0,36	abcde	6 - 10	0,20	0,09		2							
1801	25	7,72 ± 0,18	abcde	6 - 10	0,32	0,02	4	3			1				
1675	25	7,64 ± 0,21	abcde	6 - 10	0,48	0,31	8	1		2				1	
1808	6	7,33 ± 0,36	abcdef	6 - 9	0,33	0,60			1	1					
1657	25	7,12 ± 0,16	bcd	6 - 9	0,56	0,25	7	5	1			1			
17	18	6,94 ± 0,20	cdef	6 - 8	0,05	0,30	1								
1904	27	6,92 ± 0,15	def	6 - 9	0,26	0,04	5	1				1			
195	17	6,88 ± 0,33	def	4 - 9	0,35	0,51*	3	3							
1633	19	6,63 ± 0,26	ef	5 - 9	0,10	0,11		2							
133	25	6,44 ± 0,15	ef	5 - 8	0,48	0,08	6	4		1	1				
1081	19	6,26 ± 0,27	ef	5 - 9	0,31	0,06	2	4							
1589	10	5,50 ± 0,27	f	4 - 6	0,20	0,31**	2								
Total	382	7,48 ± 0,07		4 - 11	0,52	0,29**	97	71	9	11	5	4	1		

<sup>\*</sup> = p < 0,05<sup>\*\*</sup> = 0,01

X = média

EP = erro padrão

r = coeficiente de correlação

^ = médias seguidas por letras distintas diferem entre si (p &lt; 0,01)

Int. = intervalo

crom. = cromossomo

Per. = porcentual médio de associações por célula

A = acrocêntrico

S = submetacêntrico

Quadro 2. Número de RONs, associação entre RONs e coeficiente de correlação, em 17 búfalos da raça Jafarabadi

Animal	Nº de células	RONs por célula				(r)	Tipos de associações nucleolares								
		$\bar{X} \pm EP$	Teste de Tukey <sup>X</sup>	Int.	Per.		AA	2 crom.	AS	SS	AAA	3 crom.	AAS	ASS	4 crom.
82	26	7,65 ± 0,15	a	6 - 9	0,88	0,00	11	9			2		1		
696	26	7,61 ± 0,26	a	5 - 10	0,50	0,09	3	9			1				
15	25	7,32 ± 0,26	ab	4 - 10	0,44	0,41*	5	5	1						
227	27	7,25 ± 0,23	abc	5 - 9	0,59	0,29	10	5							
49	25	7,08 ± 0,15	abcd	6 - 8	0,44	0,34	2	5	3	1					
64	19	7,00 ± 0,29	abcd	5 - 10	0,31	0,65**		5							
260	26	7,00 ± 0,24	abcd	5 - 9	0,38	0,56**	3	4	2						
359	27	6,63 ± 0,14	abcde	6 - 8	0,18	0,41*	2	3							
242	25	6,60 ± 0,14	abcd	5 - 8	0,36	0,25	7			2					
482	20	6,60 ± 0,22	abcde	4 - 8	0,30	0,22	1	5							
364	26	6,46 ± 0,17	abcde	5 - 8	0,27	0,11	2	4			1				
150	15	6,40 ± 0,23	abcde	5 - 8	0,47	0,08	3	4							
153	25	6,36 ± 0,19	bcde	4 - 8	0,72	0,03	9	7		1	1				
641	25	6,32 ± 0,21	bcde	4 - 8	0,16	0,07	2		2						
361	25	6,20 ± 0,22	cde	4 - 8	0,32	0,27	6	1			1				
371	25	6,16 ± 0,28	de	4 - 9	0,32	0,60*	2	6							
426	26	5,69 ± 0,21	e	3 - 7	0,35	0,11	5	1	1	2					
Total	413	6,74 ± 0,06		3 - 10	0,41	0,28**	73	73	11	5	8				1

<sup>\*</sup> = p < 0,05<sup>\*\*</sup> = 0,01

X = média

EP = erro padrão

r = coeficiente de correlação

^ = médias seguidas por letras distintas diferem entre si (p &lt; 0,01)

Int. = intervalo

crom. = cromossomo

Per. = porcentual médio de associações por célula

A = acrocêntrico

S = submetacêntrico

Quadro 3. Número de RONs, associações entre RONs e coeficiente de correlação em 14 búfalos da raça Mediterrânea

Animal	Nº de células	RONs por célula				(r)	Tipos de associações nucleolares							
		$\bar{X} \pm EP$	Teste de Tukey <sup>X</sup>	Int.	Per.		AA	2 crom.	AS	SS	AAA	3 crom.	AAS	
173	25	8,84 ± 0,20	a	7 - 11	0,96	0,57**	11	11	1	1				
306	28	8,25 ± 0,36	ab	6 - 13	0,68	0,41*	10	4	1	3	1			
194	26	8,15 ± 0,30	ab	5 - 11	0,42	0,11	4	4	1	2				
99	11	8,09 ± 0,34	abc	6 - 10	0,54	0,58	1	3		1	1			
144	20	7,65 ± 0,28	abc	6 - 10	0,35	0,12	2	3	2					
182	18	7,61 ± 0,29	abc	6 - 10	0,44	0,39	1	6			1			
53	20	7,50 ± 0,33	abc	6 - 11	0,10	0,35	1							
170	9	7,22 ± 0,43	abcd	4 - 8	0,55	0,01	2	2	1					
131	28	7,10 ± 0,24	bcd	4 - 9	0,28	0,17	2	5	1					
107	10	7,00 ± 0,33	bcd	5 - 9	0,20	0,00	1				1			
111	23	7,00 ± 0,18	bcd	6 - 9	0,22	0,13	2	3						
79	29	6,44 ± 0,15	cd	5 - 8	0,34	0,27	7	2			1			
100	25	5,84 ± 0,14	d	5 - 7	0,24	0,23	3	2	1					
341	21	5,71 ± 0,24	d	4 - 9	0,67	0,37	4	8		1	1			
Total	293	7,31 ± 0,09		4 - 13	0,43	0,29**	51	53	8	10	5			

<sup>\*</sup> = p < 0,05<sup>\*\*</sup> = 0,01

X = média

EP = erro padrão

r = coeficiente de correlação

^ = médias seguidas por letras distintas diferem entre si (p &lt; 0,01)

Int. = intervalo

crom. = cromossomo

Per. = porcentual médio de associações por célula

A = acrocêntrico

S = submetacêntrico



Quadro 4. Distribuição e freqüência dos cromossomos 3, 4, 8 e acrocêntricos com RONs, da raça Murrah

Animal	Pares de cromossomos	Nº de cromossomos c/ RONs	Freqüência de RONs	Número de células com RONs <sup>1</sup>			X <sup>2</sup> Correlação de Levene <sup>o</sup>
				+/+	+-	-/-	
140	3	26	0,52	2	22	1	13,787**
	4	38	0,76	14	10	1	0,149
	8	25	0,50	0	25	0	24,000**
	21, 23, 24	112	0,75	-	-	-	-
142	3	33	0,66	9	15	1	2,530
	4	27	0,54	6	15	4	0,878
	8	25	0,50	0	25	0	24,000**
	21, 23, 24	119	0,79	-	-	-	-
133	3	23	0,46	0	23	2	17,299**
	4	20	0,40	0	20	5	10,483**
	8	29	0,58	5	19	1	7,297**
	21, 23, 24	89	0,59	-	-	-	-
1081	3	20	0,53	1	18	0	14,495**
	4	24	0,63	7	10	2	0,207
	8	19	0,50	0	19	0	18,000**
	21, 23, 24	56	0,49	-	-	-	-
182	3	34	0,68	9	16	0	5,134*
	4	28	0,56	4	20	1	9,104**
	8	37	0,74	12	13	0	2,811
	21, 23, 24	108	0,72	-	-	-	-
1657	3	46	0,92	21	4	0	0,139
	4	21	0,42	0	21	4	12,414**
	8	36	0,72	11	14	0	3,467
	21, 23, 24	75	0,50	-	-	-	-
1904	3	27	0,50	0	27	0	26,000**
	4	0	0,00	0	0	27	0,000
	8	30	0,56	4	22	1	10,769**
	21, 23, 24	130	0,80	-	-	-	-
1902	3	34	0,68	9	16	0	5,134**
	4	32	0,64	7	18	0	7,403**
	8	38	0,76	13	12	0	2,253
	21, 23, 24	102	0,68	-	-	-	-
1070	3	44	0,88	19	6	0	0,381
	4	38	0,76	13	12	0	2,253
	8	30	0,60	7	16	2	2,458
	21, 23, 24	107	0,71	-	-	-	-
1081	3	27	0,54	2	23	0	17,299**
	4	21	0,42	1	19	5	7,297**
	8	24	0,48	2	20	3	8,477**
	21, 23, 24	121	0,81	-	-	-	-
1645	3	30	0,60	5	20	0	10,483**
	4	27	0,54	2	23	0	17,299**
	8	46	0,92	21	4	0	0,139
	21, 23, 24	96	0,64	-	-	-	-
1675	3	26	0,52	1	24	0	20,382**
	4	26	0,52	2	22	1	13,787**
	8	31	0,62	6	19	0	8,826**
	21, 23, 24	108	0,72	-	-	-	-
17	3	18	0,50	0	18	0	17,000**
	4	27	0,75	9	9	0	1,744
	8	9	0,25	0	9	9	1,744
	21, 23, 24	71	0,66	-	-	-	-
1589	3	8	0,40	0	8	2	3,818
	4	1	0,05	0	1	9	0,000
	8	14	0,70	4	6	0	1,484
	21, 23, 24	32	0,53	-	-	-	-
1727	3	7	0,58	1	5	0	2,381
	4	5	0,42	0	5	1	2,381
	8	12	1,00	6	0	0	0,000
	21, 23, 24	23	0,64	-	-	-	-
1101	3	17	0,85	7	3	0	0,199
	4	14	0,70	4	6	0	1,484
	8	11	0,55	1	9	0	5,891*
	21, 23, 24	36	0,60	-	-	-	-
1633	3	19	0,50	0	19	0	18,000**
	4	14	0,37	1	12	6	2,090
	8	27	0,71	9	9	1	0,302
	21, 23, 24	66	0,58	-	-	-	-
1808	3	10	0,83	4	2	0	0,111
	4	4	0,33	0	4	2	1,071
	8	10	0,83	5	0	1	11,111**
	21, 23, 24	20	0,56	-	-	-	-
195	3	18	0,53	2	14	1	6,596*
	4	15	0,44	0	15	2	9,825**
	8	9	0,26	1	7	9	0,013
	21, 23, 24	75	0,74	-	-	-	-
Amostra	3	467	0,61	92	283	7	118,781**
	4	382	0,50	70	242	70	26,969**
	8	462	0,60	107	248	27	48,609**
	21, 23, 24	1546	0,67	-	-	-	-

<sup>1</sup> = Para os pares 21, 23 e 24 não foram considerados as distribuições das células +/+,-/+ e -/- \* = p < 0,05 \*\* = p < 0,01 ° = LEVENE (1949)



Quadro 5. Distribuição e freqüência dos cromossomos 3, 4, 8 e acrocêntricos com RONs em búfalos da raça Jafarabadi

Animal	Pares de cromossomos	Nº de cromossomos c/ RONs	Freqüência de RONs	Número de células com RONs <sup>1</sup>			$\chi^2$ Correlação De Levene <sup>o</sup>	
				+/+	+/-	-/-		
82	3	47	0,90	21	5	0	0,231	
	4	26	0,50	1	24	1	17,769**	
	8	0	0,00	0	0	26	0,000	
	21, 23, 24	126	0,81	-	-	-	-	
359	3	45	0,83	18	9	0	0,945	
	4	27	0,50	2	23	2	12,668**	
	8	0	0,00	0	0	27	0,000	
	21, 23, 24	107	0,66	-	-	-	-	
364	3	48	0,92	22	4	0	0,133	
	4	28	0,54	2	24	0	18,254**	
	8	24	0,46	0	24	2	18,254**	
	21, 23, 24	68	0,44	-	-	-	-	
696	3	42	0,81	16	10	0	1,307	
	4	36	0,69	10	16	0	4,762*	
	8	24	0,46	3	18	5	3,625	
	21, 23, 24	96	0,62	-	-	-	-	
260	3	47	0,90	21	5	0	0,231	
	4	20	0,38	0	20	6	9,577**	
	8	25	0,48	0	25	1	21,368**	
	21, 23, 24	90	0,58	-	-	-	-	
242	3	45	0,90	20	5	0	0,242	
	4	25	0,50	2	21	2	10,881**	
	8	0	0,00	0	0	25	0,000	
	21, 23, 24	95	0,63	-	-	-	-	
541	3	35	0,70	10	15	0	4,235*	
	4	23	0,46	1	21	3	11,247**	
	8	0	0,00	0	0	25	0,000	
	21, 23, 24	100	0,67	-	-	-	-	
426	3	34	0,65	11	12	3	0,000	
	4	0	0,00	0	0	26	0,000	
	8	0	0,00	0	0	26	0,000	
	21, 23, 24	114	0,73	-	-	-	-	
153	3	49	0,98	24	1	0	0,000	
	4	0	0,00	0	0	25	0,000	
	8	19	0,38	0	19	6	8,826**	
	21, 23, 24	91	0,61	-	-	-	-	
049	3	44	0,88	19	6	0	0,381	
	4	35	0,70	10	15	0	4,235*	
	8	24	0,48	0	24	1	20,382**	
	21, 23, 24	74	0,49	-	-	-	-	
150	3	21	0,70	6	9	0	2,400	
	4	19	0,63	4	11	0	4,503*	
	8	5	0,17	0	5	10	0,467	
	21, 23, 24	51	0,57	-	-	-	-	
15	3	37	0,74	12	13	0	2,811	
	4	23	0,46	4	15	6	0,878	
	8	15	0,30	0	15	10	4,235*	
	21, 23, 24	108	0,72	-	-	-	-	
64	3	32	0,84	13	6	0	0,544	
	4	24	0,63	6	12	1	2,090	
	8	15	0,39	0	15	4	7,470**	
	21, 23, 24	62	0,54	-	-	-	-	
227	3	43	0,80	16	11	0	1,584	
	4	18	0,33	1	16	10	2,697	
	8	32	0,59	5	22	0	12,109**	
	21, 23, 24	103	0,64	-	-	-	-	
482	3	30	0,75	10	10	0	1,966	
	4	18	0,45	1	16	3	6,987**	
	8	13	0,33	0	13	7	4,222*	
	21, 23, 24	71	0,59	-	-	-	-	
371	3	44	0,88	19	6	0	0,381	
	4	0	0,00	0	0	25	0,000	
	8	15	0,30	0	15	10	4,235*	
	21, 23, 24	95	0,63	-	-	-	-	
361	3	21	0,42	0	21	4	12,414**	
	4	24	0,48	0	24	1	20,382**	
	8	14	0,28	0	14	11	3,467	
	21, 23, 24	96	0,64	-	-	-	-	
Todos os animais		3	664	0,80	258	148	7	7,577**
		4	346	0,42	44	258	111	32,837**
		8	225	0,27	8	209	196	31,371**
		21, 23, 24	1547	0,62	-	-	-	-

<sup>1</sup> = Para os pares 21, 23 e 24 não foram considerados as distribuições das células +/+,-/+ e -/-\* =  $p < 0,05$    \*\* =  $p < 0,01$ 

° = LEVENE (1949)



Quadro 6. Distribuição e freqüência dos cromossomos 3, 4, 8 e acrocêntricos com RONs em búfalos da raça Mediterrânea

Animal	Pares de cromossomos	Nº de cromossomos c/ RONs	Freqüência de RONs	Número de células com RONs <sup>1</sup>			$\chi^2$	Correlação de Levene <sup>o</sup>
				+/+	+/-	-/-		
131	3	47	0,84	20	7	1	0,250	
	4	30	0,54	7	16	5	0,477	
	8	16	0,29	2	12	14	0,029	
	21, 23, 24	106	0,63	-	-	-	-	
194	3	37	0,71	13	11	2	0,003	
	4	20	0,38	5	10	11	1,121	
	8	40	0,77	14	12	0	2,115	
	21, 23, 24	115	0,74	-	-	-	-	
173	3	41	0,82	16	9	0	1,054	
	4	30	0,60	5	20	0	10,483**	
	8	22	0,44	0	22	3	14,667**	
	21, 23, 24	128	0,85	-	-	-	-	
360	3	33	0,59	5	23	0	12,938**	
	4	30	0,54	8	14	6	0,005	
	8	42	0,75	18	6	4	5,735*	
	21, 23, 24	126	0,75	-	-	-	-	
341	3	33	0,79	12	9	0	1,364	
	4	21	0,50	0	21	0	20,000**	
	8	8	0,19	2	4	15	3,713	
	21, 23, 24	58	0,46	-	-	-	-	
170	3	16	0,89	7	2	0	0,067	
	4	16	0,89	7	2	0	0,067	
	8	9	0,50	0	9	0	8,000**	
	21, 23, 24	24	0,44	-	-	-	-	
182	3	29	0,81	11	7	0	0,879	
	4	17	0,47	2	13	3	3,184	
	8	15	0,42	1	13	4	3,778	
	21, 23, 24	76	0,70	-	-	-	-	
79	3	37	0,64	8	21	0	8,829**	
	4	13	0,22	0	13	16	2,206	
	8	24	0,41	1	22	6	8,673**	
	21, 23, 24	113	0,65	-	-	-	-	
100	3	34	0,68	9	16	0	5,134*	
	4	26	0,52	1	24	0	20,382**	
	8	0	0,00	0	0	25	0,000	
	21, 23, 24	86	0,57	-	-	-	-	
99	3	16	0,73	5	6	0	1,250	
	4	11	0,50	0	11	0	10,000**	
	8	13	0,59	3	7	1	0,801	
	21, 23, 24	49	0,74	-	-	-	-	
111	3	28	0,61	5	18	0	8,905**	
	4	22	0,48	3	16	4	3,180	
	8	16	0,35	1	12	10	1,031	
	21, 23, 24	97	0,70	-	-	-	-	
144	3	35	0,88	15	5	0	0,319	
	4	24	0,60	4	16	0	8,261**	
	8	15	0,38	0	15	5	6,650**	
	21, 23, 24	79	0,66	-	-	-	-	
107	3	11	0,55	1	9	0	5,891*	
	4	9	0,45	0	9	1	5,891*	
	8	9	0,45	1	7	2	1,314	
	21, 23, 24	41	0,68	-	-	-	-	
53	3	35	0,88	16	3	1	2,686	
	4	24	0,60	5	14	1	3,764	
	8	18	0,45	1	16	3	6,987**	
	21, 23, 24	73	0,61	-	-	-	-	
Todos os Animais	3	432	0,73	146	146	4	23,730**	
	4	293	0,50	47	199	47	37,270**	
	8	245	0,42	44	157	92	2,902	
	21, 23, 24	1171	0,67	-	-	-	-	

<sup>1</sup> = Para os pares 21, 23 e 24 não foram considerados as distribuições das células +/+,-/+ e -/-. \* =  $p < 0,05$    \*\* =  $p < 0,01$ 

° = LEVENE (1949)