

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

VANUSA LILIAN CAMARGO DE LIMA

PINTURA CROMOSSÔMICA MULTIDIRECIONAL NO GENOMA DE *Synallaxis frontalis* (PASSERIFORMES, FURNARIIDAE)

**SÃO GABRIEL
2017**

VANUSA LILIAN CAMARGO DE LIMA

**PINTURA CROMOSSÔMICA MULTIDIRECIONAL NO GENOMA DE SYNALLAXIS
FRONTALIS (PASSERIFORMES, FURNARIIDAE)**

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

Orientadora: Dra. Analía Del Valle
Garnero

**SÃO GABRIEL
2017**

**Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .**

732p LIMA, VANUSA LILIAN CAMARGO DE LIMA
PINTURA CROMOSSÔMICA MULTIDIRECIONAL NO GENOMA DE
Synallaxis frontalis (PASSERIFORMES, FURNARIIDAE) /
VANUSA LILIAN CAMARGO DE LIMA LIMA.
44 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do
Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2017.
"Orientação: Analía Del Valle Garnero".

1. Aves. 2. Passeriformes. 3. cariótipo. 4. número
diploide. 5. rearranjos intracromossômicos. I. Título.

VANUSA LILIAN CAMARGO DE LIMA

PINTURA CROMOSSÔMICA MULTIDIRECIONAL NO GENOMA DE *Synallaxis frontalis* (PASSERIFORMES, FURNARIIDAE)

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

Dissertação defendida e aprovada em: 24,março de 2017.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Analía Del Valle Garnero
Orientadora
(Unipampa)



Dr. Marícia Fantinel D'Avila
(UFSM)



Prof. Dr. Alberto Sergio Fenocchio
(UNaM)

A minha "irmandade"

AGRADECIMENTO

Primeiramente tenho a agradecer minha MÃE minha “mamis poderosa” ela que me ensinou que educação isso ninguém tira de você, sempre me disse tu podes ser o que você quiser independente de suas origens, céu é o limite. PAI agradeço a ti todos os ensinamentos que você teve na escola da vida, aprendi muito e continuo a aprender. OBRIGADA “schula”. Irmãos Jeferson, Claudedir Junior e Everton, meus malas, a vida seria tão sem graça sem a companhia de vocês. Natiele Brasil e Jofre Camargo, primos-irmãos, meus primeiros alunos de Ciências, obrigada sempre. Minha segunda família João, Soilamar, Bruno e meu amado afilhado Daniel Strieder, isso também é para vocês que sempre acompanharam minha caminhada.

Todo o trabalho só foi possível pela confiança e ensino da minha orientadora Dra. Analía Del Valle Garnero, “chefa” obrigada pelos ensinamentos, avisos, puxões de orelha. Quero ser como a sra. quando crescer. Muito Obrigada!!. Professor Ricardo Gunski, “chefe” obrigada pelos ensinamentos, conselhos, por apoiar-me sempre que necessário. Professor Fabiano Torres, obrigada por sempre estar disposto a ensinar algo.

Kretschmer, ohhhh Kretschmer, obrigada por estar sempre disposto a me ensinar, todo o incentivo, levarei comigo teus ensinamentos.

Thays Oliveira, Natasha Bertocchi, Marcelo De Souza, Tiago Degrandi, Suziane Barcellos e Alice Lemos colegas deixo meu obrigada por estarem sempre dispostos a colaborar.

Geferson Metz, Rocio Cañon, Maicon Schu, Fernanda Poll, Soraia Lemos amigos o caminho fica mais fácil quando se tem com quem compartilhar as alegrias e tristezas.

Aos colegas de Laboratórios vizinhos que indiretamente me ajudaram, com atenção, disposição, idéias e café. LPA, APIPAMPA, NEVA, obrigada pessoal. Nosso melhor técnico Adriano de Paula, obrigada pelas dicas e incentivo sempre disposto, não tinha tempo feio para preparar alguma coisa. Obrigada!!

“Nós lutamos. É assim que vencemos. E é assim que morremos.”

Ragnar/Vikings

RESUMO

Durante o processo evolutivo os cariótipos das espécies se transformaram seguindo princípios nem sempre conhecidas, gerando uma imensa diversidade cromossômica. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo compreender a evolução cariotípica de uma espécie da família Furnariidae, *Synallaxis frontalis*, popularmente conhecido como Petrim. A metodologia utilizada para alcançarmos nosso objetivo foi a citogenética clássica (coloração com giemsa e bandeamento C) e molecular (Hibridização *in situ* fluorescente) de sondas do gene ribossomal 18S e sondas cromossômicas de *Gallus gallus* (GGA) e *Leucopternis albicollis* (LAL). A coloração com giemsa permitiu inferirmos que a espécie estudada apresenta um típico cariótipo para os passeriformes, com 82 cromossomos, sendo a maioria deles microcromossomos. Entretanto observou-se a presença de heteromorfismos na morfologia do primeiro e terceiro pares autossômicos. O bandeamento C demonstrou que a heterocromatina constitutiva está localizada principalmente nas regiões centromérica/pericentromérica dos macrocromossomos e microcromossomos e, em praticamente todo o cromossomo sexual W. Os sítios ribossomais foram encontrados em um par de microcromossomos, assim como a maioria das espécies basais. A pintura cromossômica com sondas de GGA mostrou que os cromossomos ancestrais 1 e 2 estão fissionados, enquanto que a hibridização dos cromossomos correspondentes ao GGA 3-10 mostraram o mesmo padrão proposto para o suposto ancestral das aves. As hibridizações com sondas de LAL confirmaram os resultados obtidos com GGA e permitiram a identificação de vários rearranjos intracromossômicos no cromossomo 1 (GGA1q) e no cromossomo 3 (GGA2q). As inversões no cromossomo 1 de *Synallaxis frontalis* foram similares às inversões já descritas para passeriformes, entretanto, esta espécie apresentou uma inversão extra, responsável pelo heteromorfismo neste cromossomo. De forma similar, no cromossomo 3, a inversão encontrada também foi responsável pelo heteromorfismo. Essas informações são importantes para melhor compreender a organização genômica e evolução cromossômica das aves, especialmente para a subordem Suboscines.

Palavras chave: Aves, Passeriformes, cariótipo, número diploide, rearranjos intracromossômicos.

ABSTRACT

During the evolutionary process the karyotypes of the species were transformed following system not always known, generating an immense chromosomal diversity. Thus the present work aimed to understand the karyotype evolution of a species of the Furnariidae family, *Synallaxis frontalis*, popularly known as Petrim. The methodology used to reach our aim was classical cytogenetics (Giemsa and C-banding) and molecular (fluorescence *in situ* hybridization) with 18S ribosomal gene probes and chromosome probes of *Gallus gallus* (GGA) and *Leucopternis albicollis* (LAL). The Giemsa staining allowed us to infer that the species studied presented a typical karyotype for birds, with 82 chromosomes, most of them microchromosomes. However, the presence of heteromorphisms in the morphology of the first and third autosomal pairs was observed. C-banding demonstrated that constitutive heterochromatin is located primarily in the centromeric/pericentromeric regions of macrochromosomes and microchromosomes and in practically the entire size of the W chromosome. The ribosomal sites were found in a pair of microchromosomes, as in the most of the basal species. The chromosome painting with GGA probes showed that the ancestral chromosomes 1 and 2 are fissioned, whereas the hybridization of the chromosomes corresponding to the GGA 3-10 showed the same standard proposed for the supposed ancestor of the birds. Hybridizations with LAL probes confirmed the results obtained with GGA and allowed the identification of several intrachromosomal rearrangements on chromosome 1 (GGA1q) and chromosome 3 (GGA2q). The inversions on chromosome 1 of *Synallaxis frontalis* were similar to the inversions already described for Passeriformes, however, this species presented an extra inversion, responsible for the heteromorphism in this chromosome. Similarly, on chromosome 3, the inversion found was also responsible for heteromorphism. This information is important to better understand the genomic organization and chromosomal evolution of birds, particularly for Suboscine.

Key words: Birds, Passeriformes, karyotype, diploid number, intrachromosomal rearrangements.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1 – Cariótipo do galo doméstico (*Gallus gallus*) exemplificando o tipo bimodal da maioria das aves analisadas citogeneticamente. (Adaptação de SHIBUSAWA et al., 2004) 14

Figura 2 – Mapa de homologia entre os macrocromossomos de *Gallus gallus* (2n=78) e *Leucopternis albicollis* (2n=66). Fonte: DE OLIVEIRA et al., 2010. 17

Figura 3 – Esquema representando o cariótipo ancestral hipotético das Aves (macrocromossomos). (Adaptação de GRIFFIN et al., 2007).. 18

Capítulo 1

Figura 1 – Metaphases and partial karyotype of female *Synallaxis frontalis*: Giemsa (A) and C-banding (B) sequential staining. The arrows indicate the Z and W chromosomes..... 26

Figura 2 – Metaphase chromosomes of *Synallaxis frontalis* with 18S rDNA (red). Chromosomes were counterstained with DAPI (blue).... 27

Figura 3 – Representative FISH experiments using *Gallus gallus* GGA (A-D) probes on metaphase chromosomes of *Synallaxis frontalis* (SFR). Chromosomes were counterstained with DAPI (blue), and probes detected with Cy3 (red). Probes used are indicated in the lower right corner of the images..... 28

Figura 4 – Representative FISH experiments using *Leucopternis albicollis* LAL (A-F) probes on metaphase chromosomes of *Synallaxis frontalis* (SFR). Chromosomes were counterstained with DAPI (blue), and probes detected with Cy3 (red). Probes used are indicated in the lower right corner of the images.... 29

Figura 5 – Homology map comparing the syntenic groups of *Synallaxis frontalis* to *Gallus gallus* (botton) and *Leucopternis albicollis* (right).... 30

Figura 6 - Schematic diagram showing pericentric inversion responsible for the heteromorphism observed in pair 1 from individual female of *Synallaxis frontalis* (SFR1), considering results obtained in FISH experiments using LAL probes..... 31

Figura 7 - Rearrangements observed in *Synallaxis frontalis* (SFR) PAK 2 (GGA2), giving origin to SFR3 and SFR7 in three male and in one female. First of all, a centric fission gave rise to two telocentric pairs (A). A pericentric inversion in SFR3 (PAK2q) changed its morphology to acrocentric (B). A second pericentric inversion originated the heteromorphic element in pair 3, which corresponded to a submetacentric chromosome (C)..... 31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol

NORs – Regiões organizadoras de nucléolo

FISH – Hibridização *in situ* fluorescente

SFR- *Synallaxis frontalis*

GGA- *Gallus gallus*

LAL- *Leucopternis albicollis*

PAK- Putative Ancestral Karyotype

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.2 Importância da citogenética em aves.....	14
1.2 Genes Ribossomais.....	15
1.3 Pintura cromossômica em aves	16
1.4 Família Furnariidae	16
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.1 Objetivos específicos	20
3 CAPÍTULO 1 - Multidirectional chromosome painting in the genome of <i>Synallaxis frontalis</i> (Passeriformes, Furnariidae) reveals high chromosomal reorganization, involving fissions and inversions	21
3.1 Abstract.....	22
3.2 INTRODUCTION	23
3.3 MATERIAL AND METHODS.....	24
3.3.1 Samples and Chromosome Preparations.....	24
3.3.2 Classical Cytogenetics	25
3.3.3 Fluorescent <i>in situ</i> hybridization	25
3.4 RESULTS	25
3.4.1 Classical Cytogenetics	25
3.4.2 FISH experiments.....	26
3.5 DISCUSSION.....	32
4 CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

A Classe Aves é o grupo taxonômico com o maior número de espécies entre os vertebrados, possuindo aproximadamente 10.000 espécies, estando presentes em todos os ambientes. Apesar dessa grande diversidade poucos dados sobre a citogenética desta classe são conhecidos e menos de 14% das espécies de aves foram estudadas citogeneticamente (SANTOS; GUNSKI, 2006). Um dos motivos de ter poucos trabalhos citogenéticos é que as aves apresentam algumas peculiaridades quanto aos seus cromossomos, como o elevado número diploide e a presença de microcromossomos, tornando difícil a análise.

O número cromossômico mais encontrado em espécies de Aves frequentemente é 80 cromossomos (CHRISTIDIS, 1990; GUNSKI et al., 2000; KRETSCHMER et al., 2014; NISHIDA-UMEHARA et al., 2007). Um exemplo de um cariótipo típico de aves é observado no galo doméstico (*Gallus gallus*) (Figura 1). Por este motivo e por interesses econômicos, esta espécie é a mais bem conhecida citogeneticamente e seus dados são frequentemente utilizados em comparações citogenéticas. Entretanto, há algumas exceções, como, por exemplo, em Falconiformes e Psittaciformes, em que o número diploide geralmente é inferior a 70 cromossomos (DE OLIVEIRA et al., 2010). Por outro lado, algumas ordens são caracterizadas por apresentar números diploides elevados, tais como os Piciformes, principalmente representantes da família Ramphastidae, que geralmente apresentam mais do que 100 cromossomos (CASTRO et al., 2002).

Em relação ao sistema de cromossomos sexuais, os machos são homogaméticos (ZZ) e as fêmeas heterogaméticas (ZW), diferentemente dos mamíferos (XY/XX) macho e fêmea respectivamente. (GRAVES; SHETTY, 2001). O cromossomo Z é altamente conservado em relação ao seu tamanho sempre relacionado em tamanho com os macrocromossomos, entretanto, em poucas exceções, tais como nos Piciformes, o cromossomo Z é o maior do genoma, provavelmente devido ao acúmulo de sequências repetitivas (DE OLIVEIRA et al., 2017). Apesar da conservação do tamanho do cromossomo Z nas aves, estes são bastante variáveis na posição do centrômero, provavelmente devido à ocorrência de rearranjos intracromossômicos, frequentes nestes cromossomos (DOS SANTOS et al., 2015; NANDA et al., 2008;). Por outro lado, o cromossomo W é bastante variável

em tamanho e morfologia (CORREIA et al., 2009; GUNSKI et al., 2000; NIETO et al., 2012).

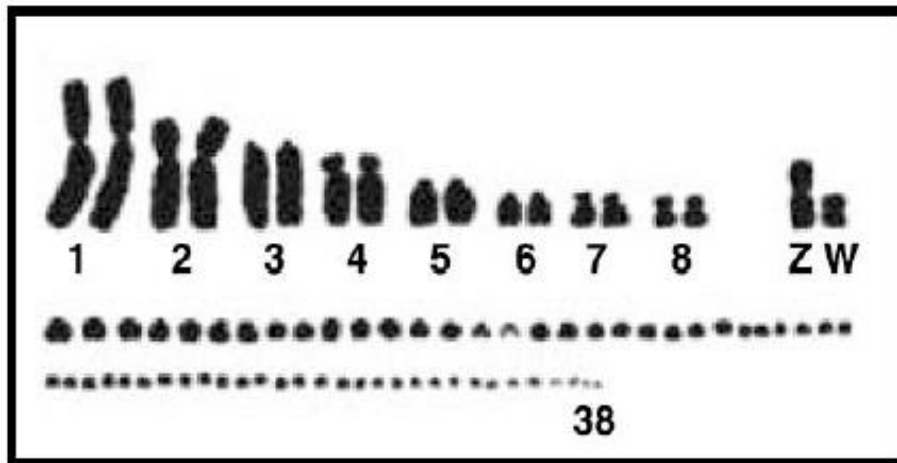


Figura 1. Cariótipo do galo doméstico (*Gallus gallus*) exemplificando o tipo bimodal da maioria das aves analisadas citogeneticamente. (Adaptação de SHIBUSAWA et al., 2004).

1.1 Importância da citogenética em aves

A utilização de técnicas de bandeamento cromossômico contribui significativamente na detecção e interpretação dos rearranjos, constituindo uma ferramenta importante para estabelecer relações cariotípicas entre espécies (CORREIA et al., 2009), assim como para a compreensão da função dos rearranjos cromossômicos na especiação (SANTOS; GUNSKI, 2006). Porém poucas espécies de aves apresentam dados de bandeamentos dificultando assim a compreensão da estrutura que envolve a diferenciação cromossômica.

Para o estudo do cariótipo de aves utiliza-se a citogenética clássica como base, para determinar número diploide, constrições primárias e secundárias assim como localizar a heterocromatina constitutiva (bandeamento C), regiões organizadoras do nucléolo (NORs), etc. Auxiliando não unicamente na identificação dos pares cromossômicos, mas também a desvendar os processos que levaram a grande diversidade cariotípica atual (CORREIA et al., 2009). Com os avanços nas

técnicas de citogenética molecular, como a hibridização *in situ* fluorescente, especialmente das sondas cromossômicas, é possível compreender a evolução cariotípica de uma forma mais precisa do que com a citogenética clássica (DE OLIVEIRA et al., 2005).

Na aplicação da técnica de Bandeamento C é possível detectar as regiões ricas em heterocromatina constitutiva, estas que na maioria dos casos localizam-se na região centromérica (KRETSCHMER et al., 2014). Entretanto, algumas espécies apresentam padrões diferenciados, tais como marcações intersticiais (CORREIA et al., 2009) ou acúmulo de grandes blocos heterocromáticos, como por exemplo, sétimo par de *Saltator similis* (Thraupidae) (DOS SANTOS et al., 2015). A utilização de sondas dos genes ribossomais permite a identificação e visualização das NORs (Regiões Organizadoras do Nucléolo), podendo estar ativa ou não. Os genes ribossomais são abundantes no genoma dos eucariotos, apresentando funções estruturais e catalíticas. As sondas rDNA 18S já foram utilizadas em *Gallus gallus*, esses genes foram localizados em um par de microcromossomos (LADJALI-MOHAMMEDI et al., 1999). Em *Elaenia spectabilis* foram observados dois pares de microcromossomos (KRETSCHMER et al., 2015).

1.2 Genes Ribossomais

Para o funcionamento de uma célula, é necessário a expressão dos genes ribossomais, responsáveis pela organização dos ribossomos. Os genes de rRNA em eucariotos estão organizados *in tandem* e todos os organismos apresentam pelo menos um par de cromossomos contendo esses genes (HESLOP-HARRISON, 2000).

As regiões ribossomais podem ser evidenciadas nos cromossomos metafásicos, com a técnica de Ag-NOR (HOWELL; BLACK, 1980) pela qual visualizam-se os sítios que estiveram ativos na interfase anterior a obtenção dos cromossomos. Entretanto, com sondas ribossomais específicas para os genes ribossomais é possível visualizar todos os sítios em seu estado ativo ou não.

Em espécies de aves basais (Paleognathas) e em *Gallus gallus* é encontrado apenas um par de microcromossomos contendo os sítios ribossomais (LADJALI-MOHAMMEDI et al., 1999). Contudo, na ordem Passeriformes, observou-se que o número de sítios ribossomais pode variar entre as espécies, até mesmo em espécies

do mesmo gênero. Por exemplo, no gênero *Turdus* foi observada a variação de dois pares de microcromossomos em *Turdus albicollis* e três pares de microcromossomos com sítios de rDNA em *Turdus rufiventris* (KRETSCHMER et al., 2014). Na família Furnariidae, apenas duas espécies foram analisadas pela impregnação com nitrato de prata: *Sittasomus griseicapillus* e *Lepidocolaptes angustirostris*, onde foi encontrado um par de macromossomos contendo as NORs, diferentemente das espécies Paleognathas, provavelmente devido alguma translocação ou fusão de um macromossomo com o microcromossomo ancestral que possuía os sítios de rDNA (BARBOSA et al., 2013). Por outro lado, em Suboscines, apenas *Elaenia spectabilis* (Tyroniidae) foi analisada através de hibridização de sondas ribossomais, sendo encontrado dois pares de sítios ribossomais em microcromossomos (KRETSCHMER et al., 2015).

1.3 Pintura cromossômica em aves

As técnicas citogenéticas clássicas são limitadas para analisar os cromossomos de aves devido ao tamanho pequeno dos macromossomos quando comparados com mamíferos e o considerável número de microcromossomos, assim a pintura cromossômica comparativa tem possibilitado a superação de limitações impostas pelas características do cariótipo (DE OLIVEIRA et al., 2006, NANDA et al., 2006).

Até o momento foram utilizadas sondas cromossômicas derivadas de quatro espécies de aves: *Gallus gallus* (Galliformes), *Burhinus oedicephalus* (Charadriiformes), *Leucopternis albicollis* (Accipitriformes) e *Gyps fulvus* (Accipitriformes) (DE OLIVEIRA et al., 2010; NIE et al., 2009; 2015; SHETTY et al., 1999).

A pintura cromossômica com sondas de *G. gallus*, por ser o primeiro conjunto descrito (SHETTY et al., 1999), foi utilizada com maior frequência, e demonstrou uma elevada conservação dos macromossomos, além de revelar segmentos homeólogos entre espécies distantes filogeneticamente. A partir das hibridizações com sondas de *G. gallus* em espécies Paleognatas, foi constatada a conservação da maioria dos macromossomos de *G. gallus*, com exceção do cromossomo 4, que marca dois pares distintos em espécies de Paleognatas e na maioria das espécies Neognatas (Galloanseres + Neoaves). Assim, foi proposto um possível cariótipo

ancestral das aves, que apresentaria a conservação dos cromossomos GGA1-3, 5-9, enquanto que o cromossomo GGA4 representaria dois pares (4 e 10 ancestrais). O cromossomo GGA4 teria se fusionado com o GGA10 na linhagem dos Galliformes e de forma independente em poucas espécies de Neoaves (GRIFFIN et al., 2007) (Figura 2).

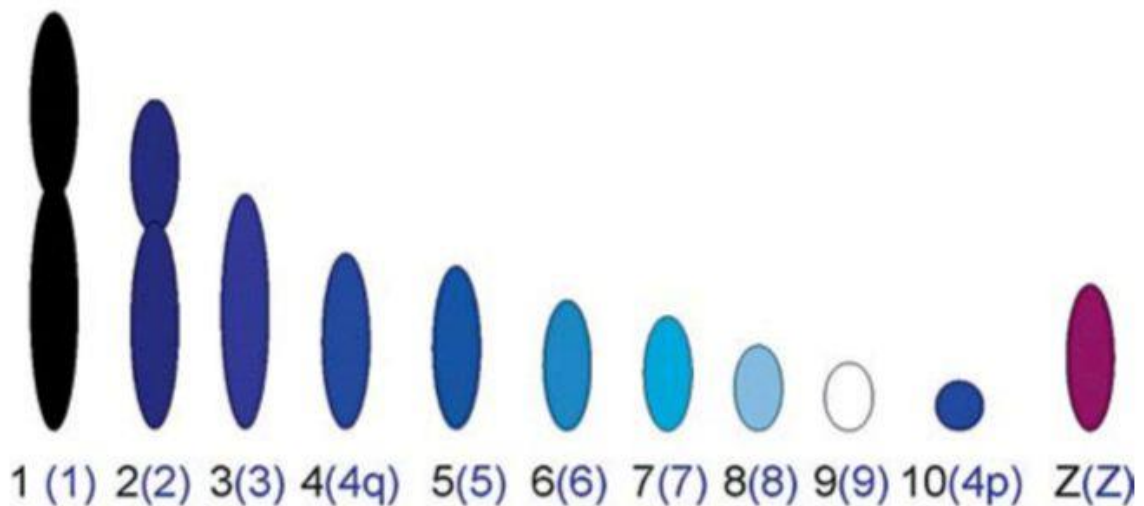


Figura 2. Esquema do suposto cariótipo ancestral (macrochromossomos) das Aves ($2n=80$), ortólogo com *Gallus gallus* ($2n=78$). A única diferença está na fusão dos cromossomos 4 e 10 ancestral. Fonte: GRIFFIN et al. (2007).

As sondas cromossômicas de *G. gallus* apresentam algumas limitações, principalmente na detecção de rearranjos intracromossômicos. Entretanto, com o advento das sondas de *Leucopternis albicollis* (DE OLIVEIRA et al., 2010), foi ultrapassada essa limitação. Isto por que, nesta espécie ocorreram várias fissões dos macrochromossomos (Figura 3). Assim, pode-se hibridizar cada um dos segmentos originados nestas fissões de forma independente, o que permite a identificação de rearranjos intracromossômicos, tais como inversões. De fato, foram observadas várias inversões, paracêntricas e pericêntricas em espécies da ordem Passeriformes (DOS SANTOS et al., 2015; 2017; KRETSCHMER et al., 2014; 2015).

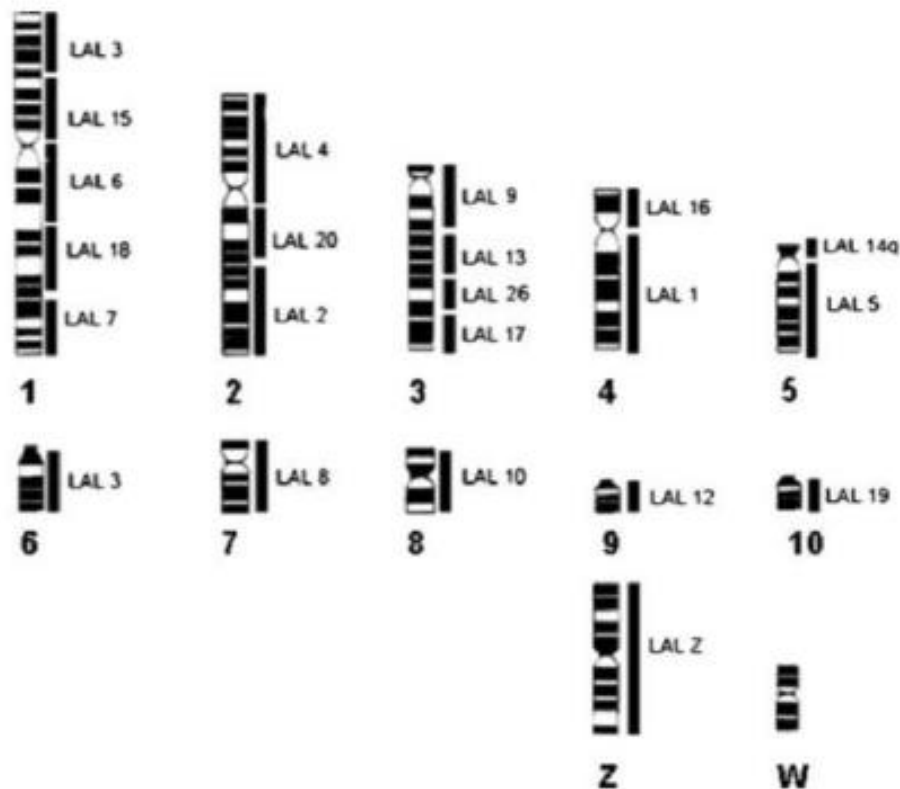


Figura 3: Mapa de homologia entre os macrocromossomos de *Gallus gallus* ($2n=78$) e *Leucopternis albicollis* ($2n=66$). Fonte: DE OLIVEIRA et al. (2010).

A pintura cromossômica em Passeriformes iniciou-se com sondas derivadas de *G. gallus* no trabalho de GUTTENBACH et al. (2003) em que foi realizada a hibridização dos cromossomos GGA 1 ao GGA 9 em nove espécies, entre elas, *Turdus merula* (Turdidae). Posteriormente, outros trabalhos foram surgindo, como por exemplo, a pintura em *Fringilla coelebs* (Fringilidae), *Turdus iliacus* (Turdidae) (DERJUSHEVA et al., 2004), *Parus major* e *Periparus ater* (Paridae) (NANDA et al., 2011), *Taeniopygia guttata* (Estrilidae) e *Serinus canaria* (Fringilidae) (DOS SANTOS et al., 2017).

Em todas as espécies de Passeriformes estudadas até o momento foi observado a fissão do cromossomo 1 ancestral, dessa forma, provavelmente esta fissão ocorreu no último ancestral em comum para todos os Passeriformes. Em relação ao GGA4, apenas *Sylvia atricapilla* (Sylviidae) não apresenta o caractere ancestral (hibridizando em dois pares distintos, que corresponderiam aos cromossomos 4 e 9 ancestrais) (NANDA et al., 2011). Assim, em *Sylvia atricapilla*, pode ter ocorrido de independente a mesma fusão observada na linhagem dos

Galliformes. Recentemente, um conjunto de sondas diferente, de *Leucopternis albicollis* tem sido utilizado em trabalhos de citogenética molecular em espécies de Passeriformes (DOS SANTOS et al., 2015; 2017; KRETSCHMER et al., 2014; 2015;). Estes trabalhos não só confirmaram os resultados já obtidos com sondas de *Gallus gallus*, mas também permitiram a identificação de várias inversões cromossômicas, principalmente no cromossomo que corresponde ao GGA1q. Estas inversões foram encontradas em nas sete espécies de Passeriformes analisadas com sondas de *Leucopternis albicollis* (7 espécies) (DOS SANTOS et al., 2015; 2017; KRETSCHMER et al., 2014; 2015).

Dessa forma, parece claro que o último ancestral em comum para todos os Passeriformes apresentava essa complexa reorganização cromossômica. Entretanto, são necessários mais estudos, principalmente em espécies mais basais para a ordem Passeriformes, tais como espécies da família Furnariidae.

1.4 Família Furnariidae

Na Classe Aves a ordem Passeriformes é a que apresenta a maior diversidade, compreendendo cerca de 50% do total de aves (SIBLEY; MONROE, 1993). A ordem possui 45 famílias, ocupando a maioria dos biomas terrestres (BARKER et al., 2002). Os Passeriformes estão divididos em duas subordens Oscines e Suboscines. Suboscines é o grupo com anatomia e comportamentos mais primitivos, no qual estão classificados os furnarídeos, sendo os Oscines considerados os mais altamente especializados (IRESTEDT et al., 2002).

Os furnarídeos estão entre as famílias de maior riqueza de espécies da região Neotropical, apresentando um total de 236 espécies (REMSEN, 2003). No Brasil ocorrem em torno de 102 espécies de acordo com o Comitê de Registros Ornitológicos (2005). As aves pertencentes a este grupo destacam-se pela homogeneidade e a sua diversidade de habitat ocupada pelos furnarídeos é bastante ampla, podendo ocorrer desde regiões montanhosas a florestas, planícies e desertos, entre outros. A quantidade de ambiente ocupada denota alta versatilidade ecológica (REMSEN, 2003). A família está dividida em três subfamílias Sclerurinae, Dendrocolaptinae e Furnariinae, esta última apresenta maior riqueza de espécies (IRESTEDT et al., 2002).

Os dados citogenéticos para a família Furnariidae são escassos.

Até o momento encontra-se apenas duas espécies da subfamília Dendrocolaptinae descritas, *Sittasomus griseicapillus* e *Lepidocolaptes angustirostris* (BARBOSA et al., 2012). Além disso, *Elaenia spectabilis* é a única espécie da subordem Suboscines estudada pelas técnicas de citogenética molecular, enquanto que para os Oscines, 15 espécies foram analisadas. Isto reforça a importância deste trabalho para a citogenética de aves, especialmente para Passeriformes e Suboscines.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Identificar e compreender e os rearranjos cromossômicos ocorridos ao longo da evolução cariotípica da espécie *Synallaxis frontalis* (Aves, Passeriformes, Furnariidae).

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a morfologia cromossômica e o número diploide de *S. frontalis*.
- *Determinar* o padrão de bandeamento C para a espécie em estudo;
- Identificar a localização dos sítios ribossomais 18S;
- Identificar as homologias cromossômicas utilizando sondas cromossomo-específicas de *Gallus gallus* e *Leucopternis albicollis* (GGA e LAL);
- Estabelecer relações cariotípicas que possam contribuir para a taxonomia da família Furnariidae, bem como para o melhor entendimento das relações filogenéticas entre outras famílias da ordem Passeriformes.

3 CAPÍTULO 1

Multidirectional chromosome painting in the genome of *Synallaxis frontalis* (Passeriformes, Furnariidae) reveals high chromosomal reorganization, involving fissions and inversions

Manuscrito formatado para o periódico Biological Journal of the Linnean Society

Multidirectional chromosome painting in the genome of *Synallaxis frontalis* (Passeriformes, Furnariidae) reveals high chromosomal reorganization, involving fissions and inversions

Short title: Karyotype description of *Synallaxis frontalis*

3.1 Abstract

In this work we performed comparative studies using chromosome painting with probes derived from *Gallus gallus* (GGA) and *Leucopternis albicollis* (LAL) in a species of the order Passeriformes, suborder Suboscine, Furnariidae family. The species under analysis was *Synallaxis frontalis*, a bird exclusively neotropical, popularly known as Petrim. *S. frontalis* presented 82 chromosomes, consistent with the proposed for birds, with a large number of microchromosomes and few pairs of macrochromosomes. We found differences in the chromosome morphologies in the first autosome pair in females and in the third pair in males. One of the homologous chromosomes presented a short arm (p) higher than its homologue. On the distribution of constitutive heterochromatin was analyzed by C-banding were found a difference between one pair and his homologue. 18S rDNA probes hybridize to one pair of microchromosomes. Hybridization of the GGA probes showed synteny in the majority of ancestral macrochromosomes, except for GGA1 and GGA2, which hybridized in different pairs. The LAL probes confirmed the occurrence of intrachromosomal rearrangements in the chromosomes corresponding to GGA1, as previously proposed for species from the order Passeriformes. In addition, LAL probes revealed that pericentric inversions were responsible for variations in the morphology of the first and third pair described above. Altogether, the analysis of our data on chromosome painting and the data published in other species from Passeriformes allowed us to confirm the fission and inversions in the GGA1q chromosome as chromosomal signatures for Passeriformes. The information described here is important to better understand the organization and chromosome evolution in the Furnariidae family and in the order Passeriformes, since the *S. frontalis* is the most basal species analyzed so far. Our aim is to contribute to a better understanding of the karyotype evolution of Class Aves.

Keywords: Birds; Suboscines; Cytogenetics; Chromosomal rearrangements.

3.2 INTRODUCTION

Passeriformes (passerines) corresponds to the largest and most diverse order of birds, with approximately 5,700 species, which represents almost 60% of all living birds (Ericson *et al.*, 2014). It is divided in two suborders: Oscines (songbirds), which comprises 776 genera and approximately 80% of all species from Passeriformes, and Suboscines (vocal non-learners), with 284 genera (Selvatti *et al.*, 2015). Among the Suboscines, the Furnariidae family (ovenbirds and woodcreepers) stands out for its exceptional diversification and ecological adaptation (Chesser *et al.*, 2004; Moyle *et al.*, 2009). Among its three subfamilies, Furnariinae is the richest in number of species (Irestedt *et al.*, 2002; Remsen *et al.*, 2016).

Because of its great diversity and number, Passeriformes is the order with the highest number of species analyzed by classical cytogenetics (Santos & Gunski 2006). Most species showed diploid numbers ranging between 76-80 chromosomes, although there are exceptions, such as the *Platyrinchus mystaceus*, a Suboscine species belonging to the Platyrinchidae family, which has 60 chromosomes (Gunski *et al.*, 2000; Santos and Gunski, 2006; Correia *et al.*, 2009).

Among the Furnariidae, only two species have been cytogenetically described - *Sittasomus griseicapillus* and *Lepidocolaptes angustirostris*, both with $2n=82$ (Barbosa *et al.*, 2013). Besides information concerning diploid number and chromosome morphology, the analyses by classical cytogenetic detected examples of chromosomal polymorphisms in some species of Passeriformes, such as in *Saltator similis* (dos Santos *et al.*, 2015) and in *Zonotrichia albicollis* (Thomas *et al.*, 2008). In addition, the polymorphism found in this latter species was positively associated to some plumage and behavior variations (Thomas *et al.*, 2008), corroborating the fact that chromosomal alterations may have important effects in the genome function, aside from revealing important phylogenetic markers.

Considering the use of molecular cytogenetic approaches, the suborder Oscines represents the group with the higher number of species analyzed by chromosome painting, with a 15 species (Guttenbach *et al.*, 2003; Derjusheva *et al.*, 2004; Itoh & Arnold, 2005; Nanda *et al.*, 2011; Kretschmer *et al.*, 2014; dos Santos *et al.*, 2015; dos Santos *et al.*, 2017). On the other hand, only one species of Suboscines was studied by molecular cytogenetics, *Elaenia spectabilis* (Tyrannidae) (Kretschmer *et al.*, 2015).

Most of these species were compared using only whole chromosome probes of *Gallus gallus* (GGA) (Guttenbach *et al.*, 2003; Derjusheva *et al.*, 2004; Itoh & Arnold, 2005; Nanda *et al.*, 2011). The results have shown that most syntenic groups found in the putative avian ancestral karyotype (PAK) proposed by Griffin *et al.* (2007), with the exception of PAK1 (GGA1), which was found fissioned in two pairs in all these species, representing a synapomorphy for Passeriformes. Furthermore, seven out of 16 species from Passeriformes, including the Suboscine *E. spectabilis*, were analyzed by the use of whole chromosome probes of two different species – GGA and *Leucopternis albicollis* (LAL), an Accipitridae with $2n=66$, in which syntenic groups corresponding to PAK pairs 1, 2, 3, 5 corresponds to 2-5 different pairs each (de Oliveira *et al.*, 2010, Kretschmer *et al.*, 2014; 2015; dos Santos *et al.*, 2015; 2017). This approach revealed that in addition to the centric fission, chromosome pairs corresponding to PAK1p and PAK1q were reshuffled through a series of paracentric and pericentric inversions, in both Oscine and Suboscine species, suggesting these rearrangements had occurred early in the history of Passeriformes, before the split in two suborders (Kretschmer *et al.*, 2014; 2015; dos Santos *et al.*, 2015; 2017). This tendency for the occurrence of intrachromosomal rearrangements, such as inversions, has been confirmed by data from genome sequencing in species from Passeriformes (Frankl *et al.*, 2015).

Taking into account that species belonging to the genus *Synallaxis* (Subfamily Furnariinae) show a higher diversification when compared to other Furnariidae, probably due to the shift in the nesting habits, to the expansion of their habitats for open areas (Irested *et al.*, 2009) and also because there are only a few species of this family with karyotypical description, the aim of this study was to describe, at the first time, the karyotype of *Synallaxis frontalis* (Furnariidae, Furnariinae), using classical and molecular cytogenetics, with whole chromosome probes of GGA and LAL.

3.3 MATERIAL AND METHODS

3.3.1 Samples and Chromosome Preparations

The experiments followed protocols approved by the ethics committee (CEUA-Universidade Federal do Pampa, no. 026/2012, SISBIO 33860-3 and 44173-1). Five specimens of *Synallaxis frontalis* (SFR), two male and three female, were caught in

São Gabriel, Rio Grande do Sul State, Brazil, within the natural area of Universidade Federal do Pampa. Skin biopsies were used for fibroblast cultures according to Sasaki *et al.* (1968), and chromosomes were obtained by standard protocols using colcemid and fixation with Carnoy fixative.

3.3.2 Classical Cytogenetics

Diploid number and chromosome morphology were determined by the analysis of at least 20 metaphases per individual, conventionally stained with Giemsa. C-banding (Ledesma *et al.*, 2002) was used to analyze the distribution of blocks of constitutive heterochromatin. Chromosomes were ordered following size and centromere position, according to Ladjali-Mohammedi *et al.* (1999).

3.3.3 Fluorescent *in situ* hybridization

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) experiments were performed with whole chromosome probes from two different species – *Gallus gallus* (pairs GGA1-GGA10, and *Leucopternis albicollis* (LAL), homolog to GGA 1 (LAL 3, 6, 7, 15 and 18), GGA 2 (LAL 2, 4 and 20), GGA 3 (LAL 9, 13, 17 and 26), GGA 4 (LAL 1 and 16), GGA 5 (LAL 5) and GGA 6 (LAL 3) (de Oliveira *et al.*, 2010). Both sets were obtained by flow cytometry at Cambridge Resource Centre for Comparative Genomics (Cambridge, United Kingdom), and labeled by DOP-PCR, using biotinylated nucleotides. Hybridization, stringency washes and detection were performed according to de Oliveira *et al.* (2010). Slides were analyzed using a fluorescence microscope (Zeiss Imager Z2) and images were captured using the software Axiovision 4.8 (Zeiss, Germany).

3.4 RESULTS

3.4.1 Classical Cytogenetics

We found a $2n=82$ in *Synallaxis frontalis*, with 11 pairs of macrochromosomes, including the Z and the W chromosomes, and 30 pairs of microchromosomes (Figure 1 A-B). Pairs 1 and 3 showed heteromorphism due to the length of their short arms (Figure 1). Hence, chromosomes of pair 1 were submetacentric and acrocentric in three females captured, while in the two males captured this pair was acrocentric. Additionally, chromosomes of pair 3 were acrocentric in females, while in three males

we found them heteromorphous (acrocentric and submetacentric). Pair 2 was acrocentric, while pairs 4-8 and the Z chromosome were submetacentric in all individuals. The W chromosome were metacentric (Figure 1).

C-banding showed that blocks of constitutive heterochromatin are located in the centromeric region of autosomes and in the Z. The W chromosome is C-positive in almost all its length (Figure 1 B and C).

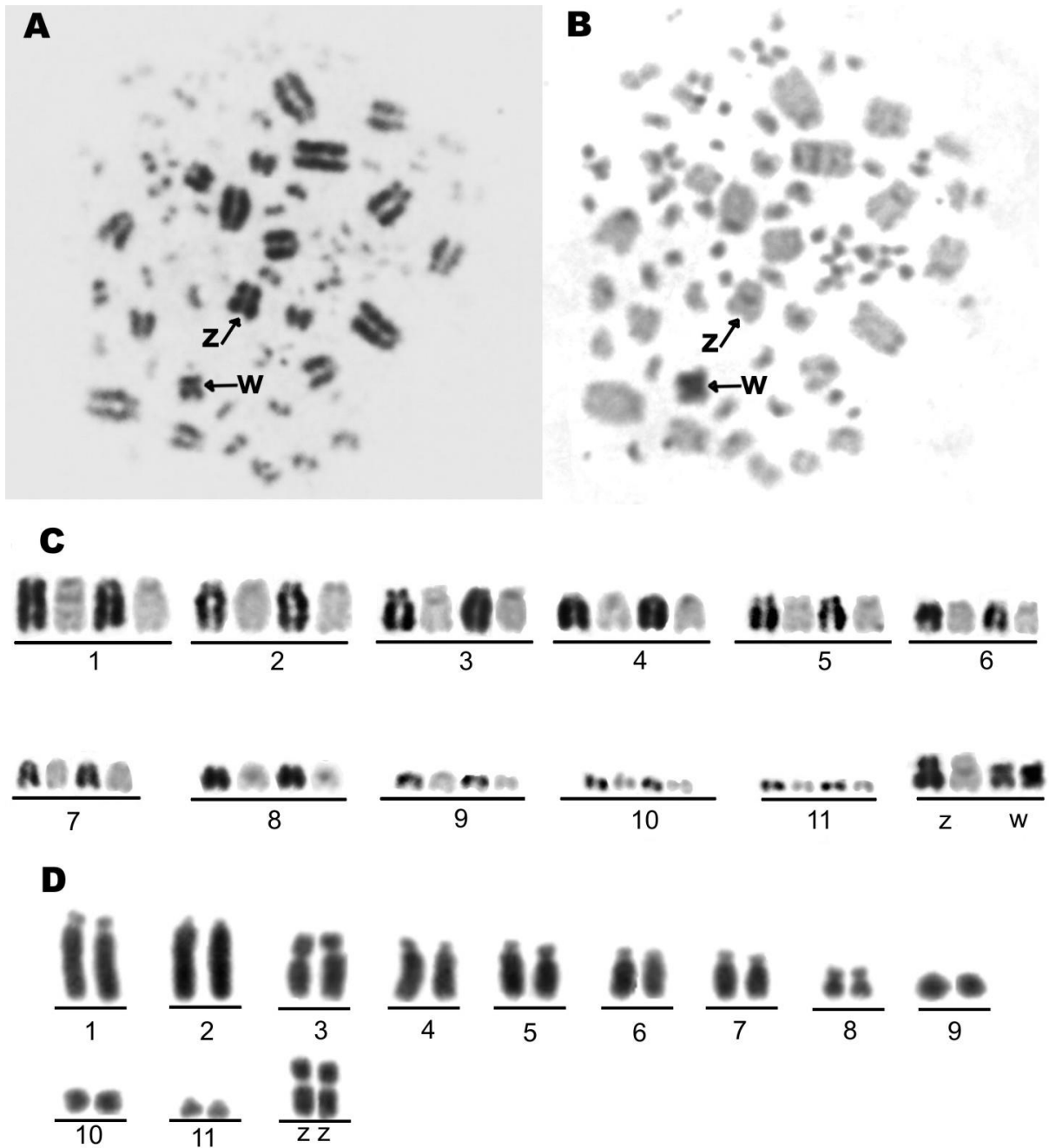


Figure 1. Metaphases and partial karyotype of female *Synallaxis frontalis*: Giemsa (A) and C-banding (B) sequential staining. The arrows indicate the Z and W

chromosomes. (C) Partial karyotype of female *Synallaxis frontalis* Partial karyotype of male *Synallaxis frontalis*(D).

3.4.2 FISH experiments

18S rDNA were found in a pair of microchromosome for this species in metaphases from *S. frontalis* (Figure 2).

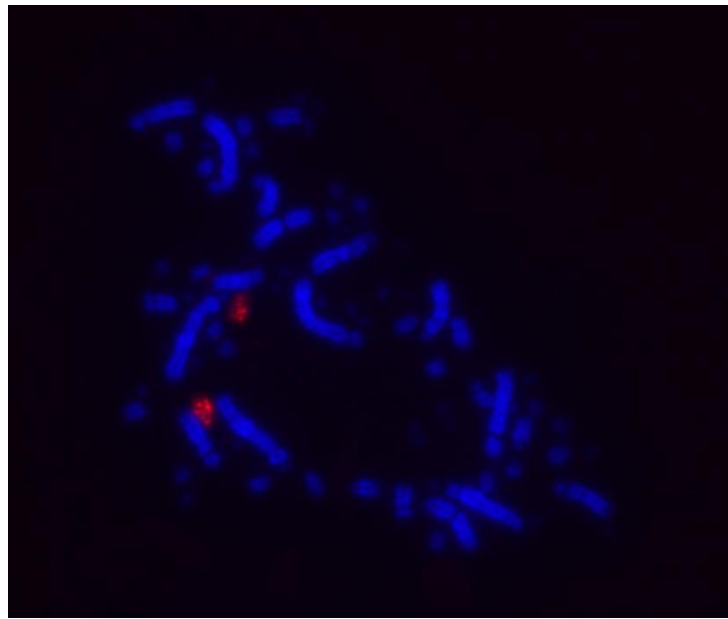


Figure 2: Metaphase chromosomes of *Synallaxis frontalis* with 18S rDNA (red). Chromosomes were counterstained with DAPI (blue).

GGA whole chromosome probes showed that most syntenic groups found in the putative avian ancestral karyotype (PAK) were conserved in SFR, except for GGA 1 and GGA 2, which were fissioned in two pairs each SFR1 and SFR5 and SFR3/SFR7 (Figure 3, 4 and 5). LAL probes confirmed the results observed with GGA probes (Figures 4), and, in addition, revealed that pericentric inversions were responsible for the heteromorphism observed in pairs SFR1 and SFR3 (Figures 6 and 7). Paracentric and pericentric inversions in pairs corresponding to GGA1q were also detected by LAL probes. Homology map, comparing SFR, GGA and LAL chromosomes is showed in figure 5.

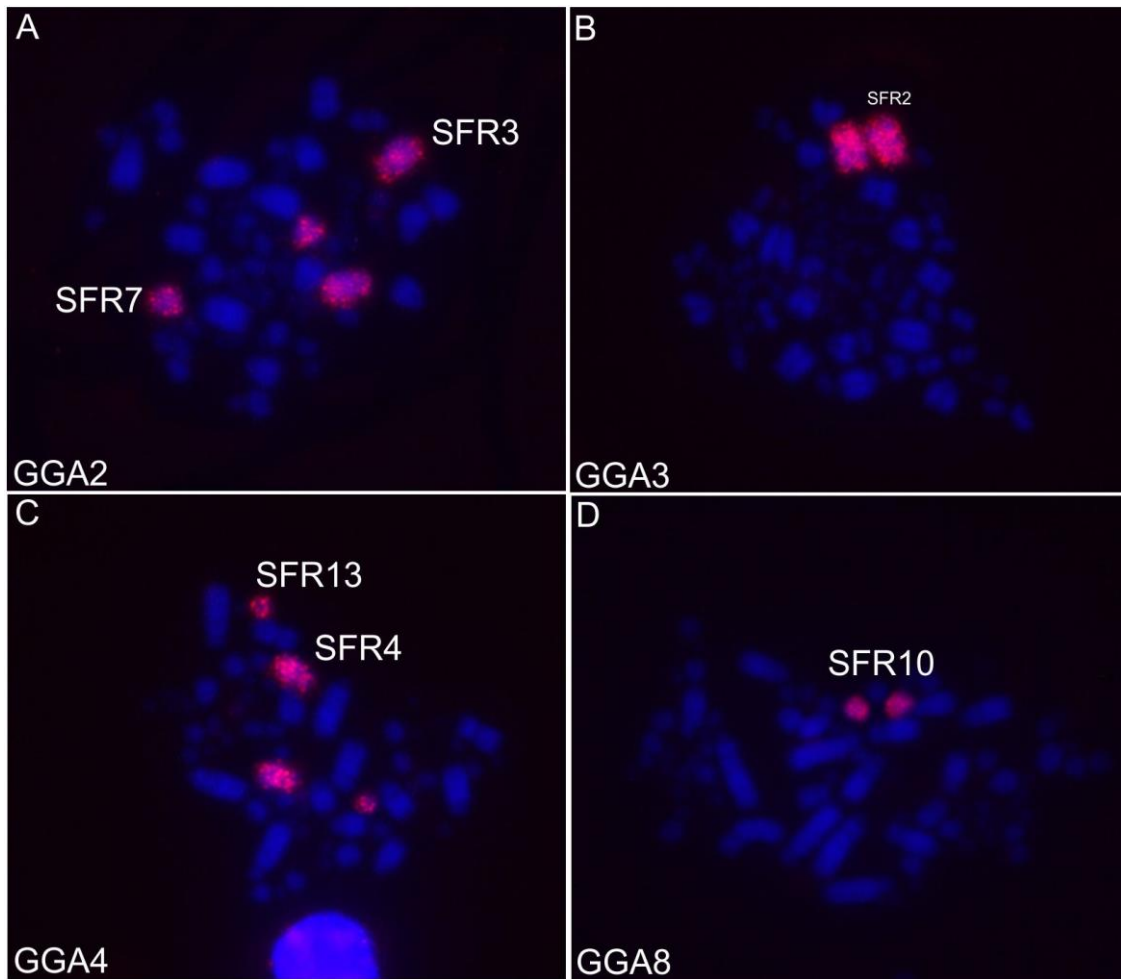


Figure 3. Representative FISH experiments using *Gallus gallus* GGA (A-D) probes on metaphase chromosomes of *Synallaxis frontalis* (SFR). Chromosomes were counterstained with DAPI (blue), and probes detected with Cy3 (red). Probes used are indicated in the lower right corner of the images.

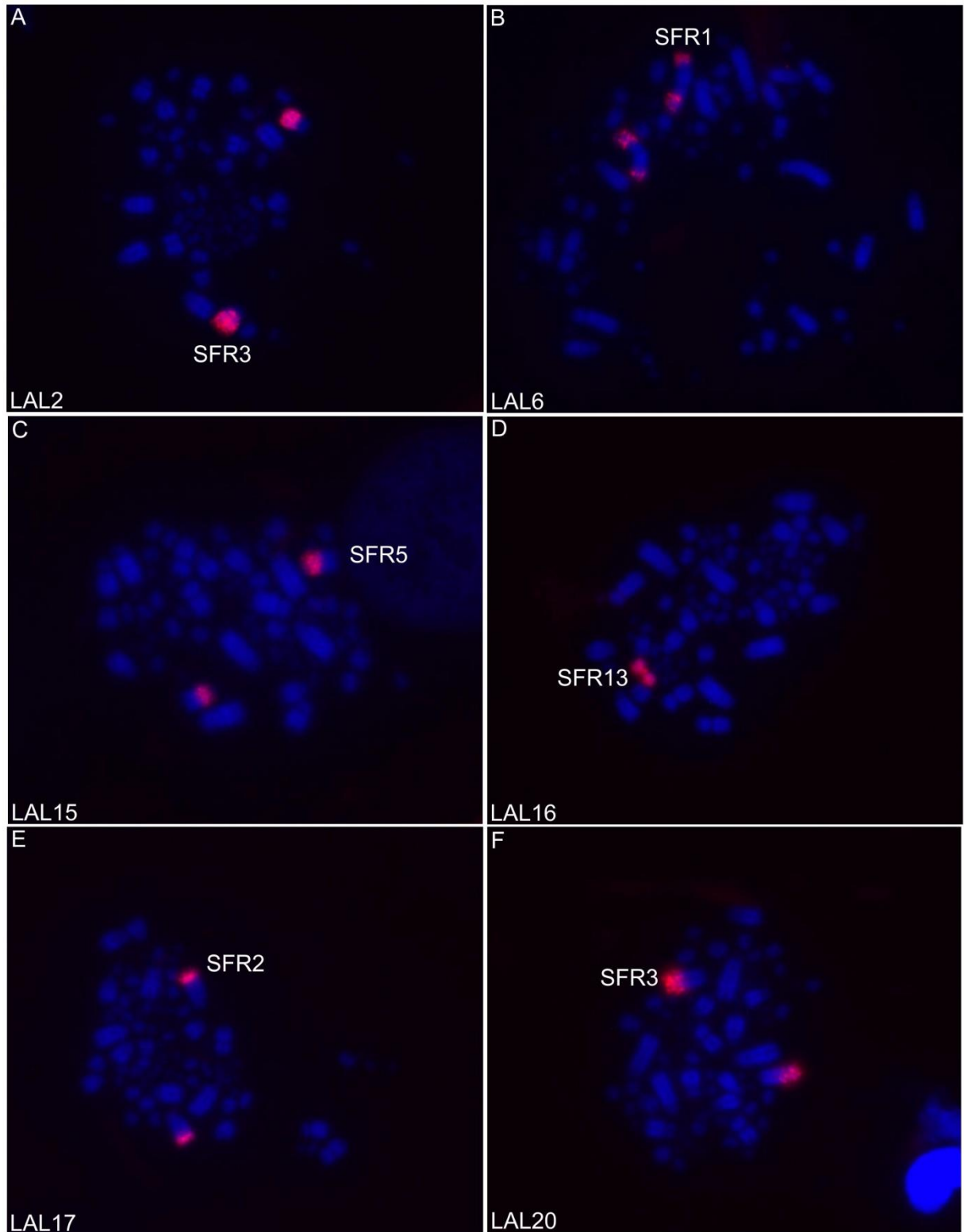


Figure 4. Representative FISH experiments using *Leucopternis albicollis* LAL (A-F) probes on metaphase chromosomes of *Synallaxis frontalis* (SFR). Chromosomes were counterstained with DAPI (blue), and probes detected with Cy3 (red). Probes used are indicated in the lower right corner of the images.

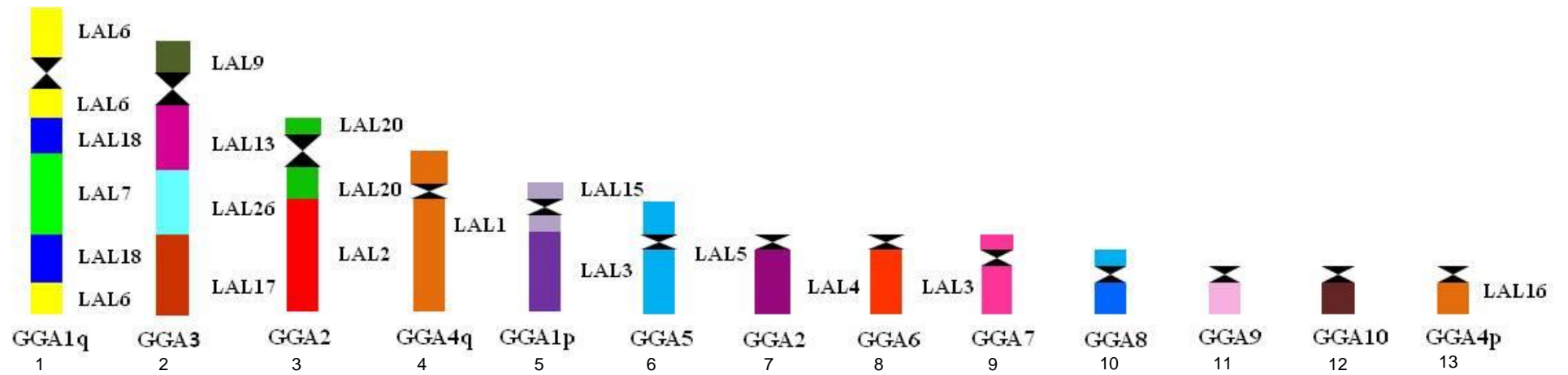


Figure 5. Homology map comparing the syntenic groups of *Synallaxis frontalis* to *Gallus gallus* (bottom) and *Leucopternis albicollis* (right).

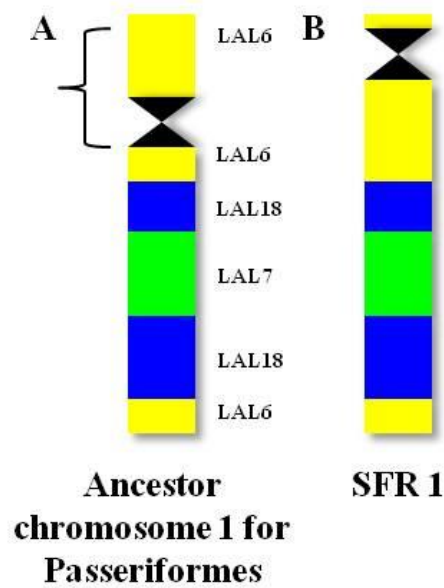


Figure 6. Schematic diagram showing pericentric inversion responsible for the heteromorphism observed in pair 1 from individual female of *Synallaxis frontalis* (SFR1), considering results obtained in FISH experiments using LAL probes.

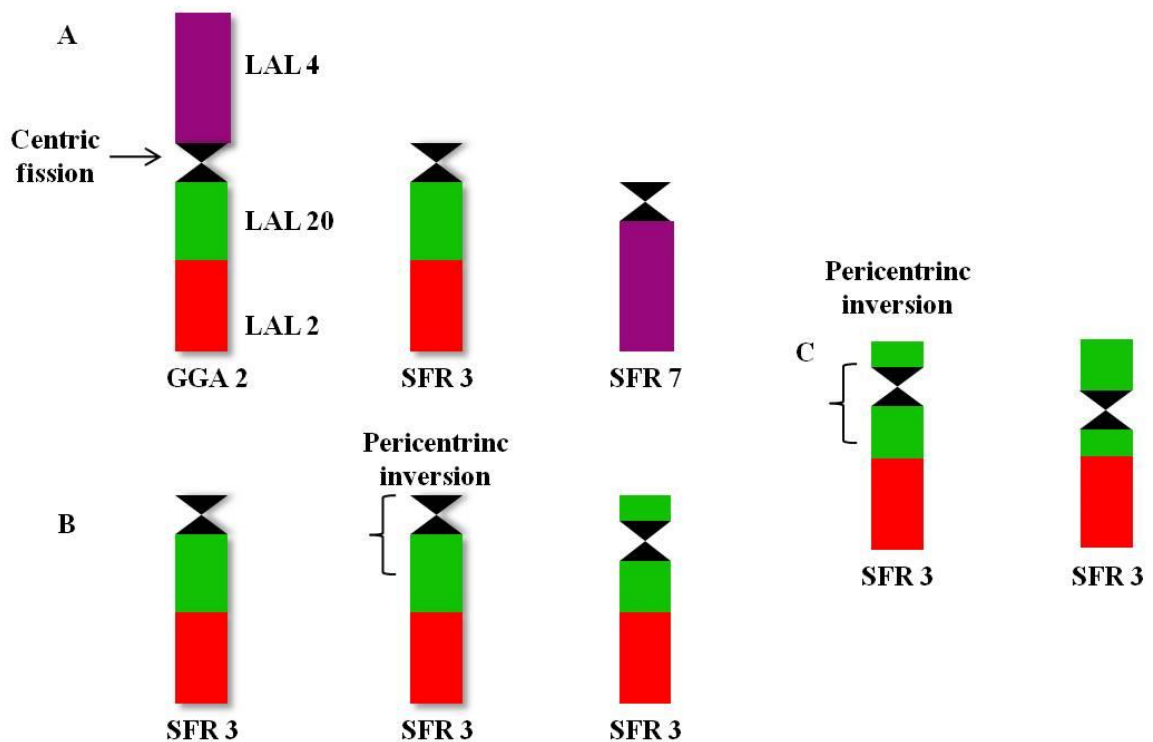


Figure 7. Rearrangements observed in *Synallaxis frontalis* (SFR) PAK 2 (GGA2), giving origin to SFR3 and SFR7 in three female and in two male. First of all, a centric fission gave rise to two telocentric pairs (A). A pericentric inversion in SFR3 (PAK2q) changed its morphology to acrocentric (B). A second pericentric inversion originated

the heteromorphic element in pair 3, which corresponded to a submetacentric chromosome (C).

3.5 DISCUSSION

The genome of *S. frontalis* is organized into 82 chromosomes. This chromosomal organization is typical for the Class Aves and for the order Passeriformes (Gunski *et al.*, 2000; Santos & Gunski, 2006; Kretschmer *et al.*, 2014). The only two species of the Furnariidae family described cytogenetically until this moment, *Sittasomus griseicapillus* and *Lepidocolaptes angustirostris* also present the same diploid number found in *S. frontalis*, however, with variations in the morphologies of some macrochromosomes (Barbosa *et al.*, 2013). The sexual Z chromosome of *S. frontalis* is submetacentric, unlike the acrocentric morphology found for *S. griseicapillus*, and *L. angustirostris*. The variation of the morphology of this chromosome is common, even in species of the same family, as observed in species of the Tyrannidae family (Gunski *et al.*, 2000; Kretschmer *et al.*, 2015), probably due to the presence of repetitive sequences in this chromosome (Nanda *et al.*, 2002). The W chromosome is metacentric in *S. frontalis*, as well as in *S. griseicapillus* and *L. angustirostris*. The karyotype of the *S. frontalis* population analyzed showed interesting morphological variations between the first and third pairs, where one chromosome is submetacentric and the other acrocentric for both pairs. We will call these variations of heteromorphisms, since it is necessary to analyze a larger sample number to be called polymorphisms. Heteromorphisms in autosomal chromosomes are not exclusive to *S. frontalis*, since they have been reported in species of the Emberizidae family (genera *Zonotrichia* and *Junco*), as well as for the sexual Z chromosome of the species *Saltator similis* (Thraupidae) (Shields, 1973; de Lucca, 1985; Thomas *et al.*, 2008; dos Santos *et al.*, 2015).

In relation to the C-banding pattern in *S. frontalis*, we observed signals in the centromere region of most autosomal chromosomes and the Z chromosome, while the W chromosome is practically all heterochromatic. In the two species described (*S. griseicapillus* and *L. angustirostris*) of the Furnariidae family, the C-banding was not performed and thus it is not possible to make a comparison within the family. No interstitial signals were detected. The signals pattern found for *S. frontalis* is the most frequent in Passeriformes, as can be visualized in species in the genus *Turdus* and

Saltator (Kretschmer *et al.*, 2014; dos Santos *et al.*, 2015). In addition 18S rDNA was preserved in the one smaller microchromosome pair. In *Gallus gallus* it is located 9p (McPherson *et al.*, 2014). In the two species of Furnariidae studied by Barbosa *et al.* (2013) the ribosomal site is located in the first autosomal pair.

Most of the ancestral macrochromosomes were conserved as whole chromosomes in the *S. frontalis* genome, as evidenced by the hybridizations of *G. gallus* macrochromosomes. Only the first two pairs (GGA1 and GGA2) were not conserved, due to the occurrence of fissions and correspond to the SFR1 and SFR5, SFR3 and SFR7 pairs, respectively. The fission of the chromosome 1 ancestral was found in all the species of the order Passeriformes studied until the moment (17 species) (Guttenbach *et al.*, 2003; Derjusheva *et al.*, 2004; Itoh & Arnold, 2005; Nanda *et al.*, 2011; Kretschmer *et al.*, 2014; 2015; dos Santos *et al.*, 2015; 2017). Probably this characteristic is shared by all Passeriformes, since it was found for species of the suborder Oscines (15 species) and Suboscines (2 species, including *S. frontalis*). The presence of this characteristic in the genome of *S. frontalis* is very important for the confirmation of this hypothesis, since only one species of Suboscines suborder had been studied by chromosome painting, and now we can verify that this characteristic is shared between two species of different families, Tyrannidae and Furnariidae (Kretschmer *et al.*, 2015). In addition, the Furnariidae family is more basal than the Tyrannidae family (Selvatti *et al.*, 2015).

Unlike the fission of the GGA1 chromosome, the fission of the GGA2 chromosome had not yet been described for species of the order Passeriformes. This rearrangement is probably shared with two other species of the Furnariidae family described by Barbosa *et al.* (2013), because these species present the first two pairs of autosomes of very similar size, a fact also observed in *S. frontalis*. Two species of the Formicariidae family (Furnariidae sister group) also present the first two pairs of very similar size, so the fission of the GGA2 chromosome may be a characteristic shared by the species of Parvorder Furnariida (Ledesma *et al.*, 2002; Selvatti *et al.* 2015). This similarity in size between the first two pairs was not observed in the species of Passeriformes analyzed by chromosome painting until the moment, reinforcing the idea of fission of chromosome 2 in other species of Furnariidae and Formicariidae (Guttenbach *et al.*, 2003; Derjusheva *et al.*, 2004; Itoh & Arnold, 2005; Nanda *et al.*, 2011; Kretschmer *et al.*, 2014; 2015; dos Santos *et al.*, 2015; 2017).

The chromosome painting in species of different families of Parvorder Furnariida is necessary to confirm this hypothesis.

Hybridizations with LAL probes also allowed the identification of the mechanism that led to heteromorphisms in the first pair in females and in the third pair in males individuals analyzed. Both heteromorphisms originated from pericentric inversions or changing the position of the centromere. We have assumed that the mechanism was pericentric inversion, since several *in silico* studies have demonstrated a high frequency of this type of rearrangement in bird species (Volker *et al.*, 2010; Skinner & Griffin, 2012). Thus, an extra inversion occurred in the region corresponding to LAL6 (GGA1q) (Fig. 6) in one of the homologous chromosomes of the first pair in females individuals, in addition to the three inversions common to all Passeriformes. Similarly, in individuals with heteromorphisms in the third pair, there was one of the homologous chromosomes of the third pair, in the segment corresponding to LAL20 (GGA2q) (Fig. 7).

In addition to the *in silico* analysis, which has demonstrated several intrachromatid rearrangements in bird species, *in situ* studies with *L. albicollis* probes have also allowed to identify some of these rearrangements, especially in the GGA1q chromosome in Passeriformes (Kretschmer *et al.*, 2014; 2015; dos Santos *et al.*, 2015; 2017). Here, we have identified inversions already proposed for the Passeriformes (GGA1p and q) and the inversions responsible for the heteromorphisms in the first and third pairs. However, the rearrangement of the chromosome that corresponds to GGA1q is more complex than we initially imagined. In 2014, Kretschmer and colleagues first described three inversions on chromosome two (GGA1q) in two species of the genus *Turdus* (Oscines). In 2015, the same three inversions were detected in *Elaenia spectabilis* (Suboscines) (Kretschmer *et al.*, 2015). After the publication of the work with *E. spectabilis*, dos Santos *et al.* (2015) and dos Santos *et al.* (2017) also detected the reorganization of chromosome 2 (GGA1q) in two species of the genus *Saltator* (Oscines), in *Taeniopygia guttata* and in *Serinus canaria* but slightly different from the species *Turdus* and *E. spectabilis*. The main difference is that the block corresponding to LAL 18 is conserved integrally in the four species described (dos Santos *et al.*, 2015; 2017), whereas in *Turdus* and *E. spectabilis*, this region is broken in two blocks. The most likely explanation would be the occurrence of independent rearrangements in both Oscines and Suboscines, since a block of LAL 18 appears in *Saltator*, in *Taeniopygia guttata* and in *Serinus*

canaria (Oscines) and *Synallaxis* (Suboscines) while two blocks appear in *Turdus* (Oscines) and *Elaenia* (Suboscines). However, we still can't affirm which of these characters was in the last common ancestor of the Passeriformes, perhaps it is the pattern observed in *S. frontalis*, since it is the most basal species of the order Passeriformes studied to date, but other individuals of the Furnariidae family must be analyzed to reject the hypothesis of independent rearrangement. Although, with the current information, we can assume the ancestral genome of the Passeriformes already presented a complex reorganization of the chromosomes corresponding to the GGA1q, we only need to confirm if it is the one observed in *S. frontalis*, *Saltator*, *Taeniopygia guttata* and in *Serinus canaria* or in *Turdus* and *Elaenia*.

The high frequency of rearrangements in the chromosomes corresponding to GGA1 is probably due to the presence of repetitive sequences, since these sequences can cause chromosomal instability (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006). Future studies on this species could address this issue, for example, by mapping repetitive sequences of the microsatellite type. The conventional analysis with Giemsa in other individuals of *S. frontalis* would also be interesting in order to verify if these heteromorphisms are fixed in the population sampled and in other populations.

In addition, it would be interesting to analyze the effect of these heteromorphisms for the carriers, since for *Zonotrichia albicollis* it was proposed that the heteromorphisms caused changes in behavior and plumage (Thomas *et al.*, 2008).

In this way our results demonstrate that besides the fissions already proposed for passeriform. The inversions also played an important role in the karyotype evolution of the Furnariidae family.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the members of the Research Group "Animal Genetic Diversity" of the Federal University of Pampa. CAPES for the granting of the scholarship, SISBIO for the license to sample the copies and for the Pro-Rectorry of Research (PROPESQ-UNIPAMPA) for the financial contribution through notices of Support to Research Groups. We are also grateful to the members of the Laboratory of Tissue Culture and Cytogenetics of the Evandro Chagas Institute (Ananindeua, PA, Brazil) for technical and financial support.

REFERENCES

- Barbosa MO, da Silva RR, Correia VCS, dos Santos LP, Garnero ADV, Gunski RJ. 2013.** Nucleolar organizer regions in *Sittasomus griseicapillus* and *Lepidocolaptes angustirostris* (Aves, Dendrocolaptidae): Evidence of a chromosome inversion. *Genetics and Molecular Biology* **36**: 70–73.
- Chesser RT. 2004.** Molecular systematics of New World suboscine birds. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **32**: 11–24.
- Correia VCS, Garnero ADV, dos Santos LP, Rodrigues RR, Barbosa MO, Gunski RJ. 2009.** Alta similaridade cariotípica na família Emberezidae (Aves: Passeriformes). *Journal of Biosciences* **25**: 99–111.
- de Lucca EJ, Rocha GT. 1985.** Chromosomal polymorphism in *Zonotrichia capensis* (Passeriformes, Aves). *Brazilian Journal of Genetics* **8**:71-78.
- Derjusheva S, Kurganova A, Haberman F, Gaginskaia E. 2004.** High chromosome conservation detected by comparative chromosome painting in chicken, pigeon and passerine birds. *Chromosome Research* **12**: 715–723.
- de Oliveira EHC, Tagliarini MM, Rissino JD, Pieczarka JC, Nagamachi CY, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA. 2010.** Reciprocal chromosome painting between white hawk (*Leucopternis albicollis*) and chicken reveals extensive fusions and fissions during karyotype evolution of Accipitridae (Aves, Falconiformes). *Chromosome Research* **18**: 349–355.
- dos Santos MS, Kretschmer R, Silva FAO, Ledesma MA, O'brien PCM, Ferguson-Smith, MA, Garnero ADV, de Oliveira EHC, Gunski RJ. 2015.** Intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus *Saltator* (Thraupidae, Passeriformes) and the occurrence of heteromorphic Z chromosomes. *Genetica* **143**: 535–543.
- dos Santos MS, Kretschmer R, Frankl-Vilches C, Bakker A, Gahr M, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA, de Oliveira EHC. 2017.** Comparative Cytogenetics between Two Important Songbird, Models: The Zebra Finch and the Canary. *PLoS ONE* **12**(1): e0170997. doi:10.1371/journal.pone.0170997
- Ericson PGP, Klopstein S, Irestedt M, Nguyen JMT, Nylander JAA. 2014.** Dating the diversification of the major lineages of Passeriformes (Aves). *BMC Evolutionary Biology* **14**:8.

- Griffin DK, Robertson LBW, Tempest HG, Skinner BM. 2007.** The evolution of the avian genome as revealed by comparative molecular cytogenetic. *Cytogenetic and Genome Research* **117**: 64–77.
- Gunski RJ, Cabanne GS, Ledesma MA, Garnero, ADV. 2000.** Análisis cariotípico de siete especies de tiránidos (Tyrannidae). *El Hornero* **15(2)**: 103–109.
- Guttenbach M, Nanda I, Feichtinger W, Masabanda JS, Griffin DK, Schmid M. 2003.** Comparative chromosome painting of chicken autosomal paints 1–9 in nine different bird species. *Cytogenetic and Genome Research* **103**: 173–184.
- Itoh Y, Arnold AP. 2005.** Chromosomal polymorphism and comparative painting analysis in the zebra finch. *Chromosome Research* **13**: 47–56.
- Irestedt M, Fjeldså J, Dalén L, Ericson, PGP. 2009.** Convergent evolution, habitat shifts and variable diversification rates in the ovenbird-woodcreeper family (Furnariidae). *BMC Evolutionary Biology* **9**: 268.
- Irestedt M, Fjeldså J, Johansson US, Ericson PGP. 2002.** Systematic relationships and biogeography of the tracheophone suboscines (Aves: Passeriformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **23**: 499-512.
- Kretschmer R, Gunski RJ, Garnero ADV, Furo IdO, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA, de Oliveira EHC. 2014.** Molecular cytogenetic characterization of multiple intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus *Turdus* (Turdidae, Passeriformes). *PLoS ONE* **9**: e103338.
- Kretschmer R, de Oliveira EHC, dos Santos, MS, Furo IDO. O, Brien, PCM, Ferguson-Smith MA, Garnero ADV, Gunski, RJ. 2015.** Chromosome mapping of the large elaenia (*Elaenia spectabilis*): evidence for a cytogenetic signature for passeriform birds? *Biological Journal of the Linnean Society* **115**: 391–398.
- Ladjali-Mohammed K, Bitgood JJ, Tixier-Boichard M, Ponce de Leon FA. 1999.** International System for Standardized Avian Karyotypes (ISSAK): standardized banded karyotypes of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Cytogenetics and Cell Genetics* **86**: 271–276.
- Ledesma MA, Garnero ADV, Gunski RJ. 2002.** Análise do cariótipo de duas espécies da família Formicariidae (Aves, Passeriformes). *Ararajuba* **10**:15-19.
- Moyle RG, Chesser RT, Brumfield RT, Tello JG, Marchese DJ, Cracraft J. 2009.** Phylogeny and phylogenetic classification of the antbirds, ovenbirds, woodcreepers, and allies (Aves: Passeriformes: Furnariides). *Cladistics* **25**:386–405.

- Nanda I, Schrama D, Feichtinger W, Haaf T, Scharl M, Schmid M. 2002.** Distribution of telomeric (TTAGGG)_n sequences in avian chromosomes. *Chromosoma* **111**: 215–227.
- Nanda I, Benisch P, Fetting D, Haaf T, Schmid M. 2011.** Synteny conservation of chicken macrochromosomes 1–10 in different Avian lineages revealed by cross-species chromosome painting. *Cytogenetic and Genome Research* **132**: 165–181.
- Remsen JV Jr, Areta JI, Cadena CD, Jaramillo A, Nores M, Pacheco JF, Pérez-Emán J, Robbins MB, Stiles FG, Stotz DF, Zimmer KJ.** Version [date]. A classification of the bird species of South America. American Ornithologists' Union. <http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.html>. Accessed June 2016.
- Ruiz-Herrera A, Castresana J, Robinson TJ. 2006.** Is mammalian chromosomal evolution driven by regions of genome fragility? *Genome Biology* **7**:R115.
- Santos LP, Gunski RJ. 2006.** Revisão de dados citogenéticos sobre a avifauna brasileira. *Revista Brasileira de Ornitologia* **14(1)**: 35–45.
- Sasaki M, Ikeuchi T, Makino SA. 1968.** Feather pulp culture for avian chromosomes with notes on the chromosomes of the peafowl and the ostrich. *Experientia* **24**:1923–1929.
- Selvatti AP, Gonzaga LP, Russo CAM. 2015.** A Paleogene origin for crown passerines and the diversification of the Oscines in the New World. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **88**: 1–15.
- Shields GF. 1973.** Chromosomal polymorphism common to several species of *Junco* (Aves). *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **15**: 461–471.
- Skinner BM, Griffin DK. 2012.** Intrachromosomal rearrangements in avian genome evolution: evidence for regions prone to breakpoints. *Heredity* **108**: 37–41.
- Thomas JW, Cáceres M, Lowman JJ, Morehouse CB, Short ME, Baldwin EL, Maney DL, Martin CL. 2008.** The chromosomal polymorphism linked to variation in social behavior in the white-throated sparrow (*Zonotrichia albicollis*) is a complex rearrangement and suppressor of recombination. *Genetics* **179(3)**: 1455–1468.
- Volker M, Backstrom N, Skinner BM, Langley EJ, Bunzey SK, Ellegren H, Griffin DK. 2010.** Copy number variation, chromosome rearrangement, and their

association with recombination during avian evolution. *Genome Research* **20**: 503–511.

Warren WC, Clayton DF, Ellegren H, Arnold AP, Hillier LW, Künstner A, Searle S, White S, Vilella AJ, Fairley S, Heger A, Kong L, Ponting CP, Jarvis ED, Mello CV, Minx P, Lovell P, Velho TAF, Ferris M, Balakrishnan CN, Sinha S, Blatti C, London SE, Li Y, Lin YC, George J, Sweedler J, Southey B, Gunaratne P, Watson M, Nam K, Backström N, Smeds L, Nabholz B, Itoh Y, Whitney O, Pfenning AR, Howard J, Völker M, Skinner BM, Griffin DK, Ye L, McLaren WM, Flicek P, Quesada V, Velasco G, Lopez-Otin C, Puente XS, Olender T, Lancet D, Smit AFA, Hubley R, Konkel MK, Walker JA, Batzer MA, Gu W, Pollock DD, Chen L, Cheng Z, Eichler EE, Stapley J, Slate J, Ekblom R, Birkhead T, Burke T, Burt D, Scharff C, Adam I, Richard H, Sultan M, Soldatov A, Lehrach H, Edwards SV, Yang SP, Li XC, Graves T, Fulton L, Nelson J, Chinwalla A, Hou S, Mardis ER, Wilson RK. 2010. The genome of a songbird. *Nature* **464**: 757–762.

4. CONCLUSÃO

Synallaxis frontalis, espécie da família Furnariidae, foi estudada por meio de técnicas de bandeamento C, sondas de sequências repetitivas 18S rDNA além da aplicação de sondas cromossômicas de *Gallus gallus* (GGA) e *Leucopternis albicollis* (LAL). A espécie apresentou $2n= 82$, número similar ao encontrado para as duas espécies do grupo já estudadas e corrobora com o número diploide frequentemente encontrado para espécies da ordem Passeriformes e para a Classe Aves. Entretanto encontramos diferenças quanto à morfologia do primeiro e terceiro pares, evidenciadas pelo bandeamento C.

A distribuição dos sítios de rDNA 18S mostrou um par de microcromossomos contendo essas sequências, diferentemente das duas espécies da subfamília Dendrocolaptinae já estudadas, em qual foram encontrados os sítios ribossomais no primeiro par de cromossomos autossômicos. Portanto, em *Synallaxis frontalis* os sítios ribossomais mantiveram-se conservados em um par de microcromossomos, pois esta característica também foi encontrada em *Gallus gallus* e em espécies basais.

A evolução cariotípica para a ordem Passeriformes conservou grupos sintênicos, assim diferenciando-se do cariótipo ancestral hipotético das aves pela fissão cêntrica do primeiro e segundo pares. As hibridizações com sondas de LAL permitiram a identificação do mecanismo (inversões pericêntricas) que levou ao heteromorfismo do primeiro e terceiro pares de *Synallaxis frontalis*.

Este trabalho também evidenciou a importância da pintura cromossômica para melhor compreender aspectos evolutivos em nível cromossômico em uma espécie Furnariidae, podendo assim identificar o papel dos rearranjos cromossômicos durante o processo de especiação, bem como as sinapomorfias para a ordem Passeriformes.

REFERÊNCIAS

- CORREIA, C.V.S. et al. Alta similaridade cariotípica na família Emberezidae (Aves: Passeriformes). **Journal of Biosciences**, v. 25, n. 2, p. 99–111. 2009.
- CHRISTIDIS, L. Animal Cytogenetics. **Chordata** 3, v. 4, p. 1990, 1990.
- CASTRO, M. S., S. M. Recco-Pimentel e G. T. Rocha Karyotypic characterization of Ramphastidae (Piciformes, Aves). **Genetics and Mol. Biol.** 25:147-150. 2002
- DE OLIVEIRA EHC, Tagliarini M.M, Rissino J.D, Pieczarka J.C, Nagamachi C.Y, O'Brien P.C.M, Ferguson-Smith M.A.. Reciprocal chromosome painting between white hawk (*Leucopternis albicollis*) and chicken reveals extensive fusions and fissions during karyotype evolution of Accipitridae (Aves, Falconiformes). **Chromosome Research** 2010
- DOS SANTOS MS, Kretschmer R, Silva FAO, Ledesma MA, O'brien PCM, Ferguson-Smith, MA, Garnero ADV, de Oliveira EHC, Gunski RJ. Intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus *Saltator* (Thraupidae, Passeriformes) and the occurrence of heteromorphic Z chromosomes. **Genetica** 143: 535–543. 2015.
- GUNSKI, R.J. et al. Análisis cariotípico de siete especies de tiránidos (Tyrannidae). **El Hornero** v.15, n. 2, p. 103–109. 2000.
- GUTTENBACH, M. et al. Comparative chromosome painting of chicken autosomal paints 1–9 in nine different bird species. **Cytogenetic and Genome Research** v.103, p. 173–184. 2003.
- HESLOP-HARRISON, J.S. RNA, genes, genomes and chromosomes: repetitive DNA sequences in plants. **Chromosomes Today** v. 13, p. 45–56. 2000.
- HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** v. 36, p.1014-1015. 1980.
- IRESTEDT, M. et al. Systematic relationships and biogeography of the tracheophone suboscines (Aves: Passeriformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution** v. 23, p. 499-512. 2002.
- ITOH, Y.; ARNOLD, A.P. Chromosomal polymorphism and comparative painting analysis in the zebra finch. **Chromosome Research** v.13, p. 47–56. 2005.

- KRETSCHMER, R. et al. Molecular cytogenetic characterization of multiple intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus *Turdus* (Turdidae, Passeriformes). **PloS one** v.9, n. 7, p. e103338. 2014.
- LADJALI-MOHAMMEDI, K. et al. International System for Standardized Avian Karyotypes (ISSAK): standardized banded karyotypes of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Cytogenetics and Cell Genetics** v.86, p. 271–276. 1999.
- LEDESMA, M.Aa; GARNERO, A.D.V.; GUNSKI, R.J. Análise do cariótipo de duas espécies da família Formicariidae (Aves, Passeriformes). **Ararajuba** v.10, p.15-19. 2002.
- MARSHALL GRAVES, J. A.; SHETTY, S. Sex from W to Z: Evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. **Journal of Experimental Zoology** v. 290, n. 5, p. 449–462. 2001.
- NANDA, I. et al. Synteny conservation of chicken macrochromosomes 1–10 in different Avian lineages revealed by cross-species chromosome painting. **Cytogenetic and Genome Research** v. 132, p. 165–181. 2011.
- NIE, W. et al. Avian comparative genomics: reciprocal chromosome painting between domestic chicken (*Gallus gallus*) and the stone curlew (*Burhinus oedicephalus*, Charadriiformes)-an atypical species with low diploid number. **Chromosome Research** v. 17, n. 1, p. 99–113. 2009.
- NIE, W. et al. Multidirectional chromosome painting substantiates the occurrence of extensive genomic reshuffling within Accipitriformes. *BMC Evolutionary Biology*, v.15, 205. 2015.
- NISHIDA-UMEHARA, C., Tsuda, Y., Ishijima, J., Ando, J., Fujiwara, A., Matsuda, Y., & Griffin, D. K.. The molecular basis of chromosome orthologies and sex chromosomal differentiation in palaeognathous birds. **Chromosome Research : An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology**, 15(6), 721–342007.
- REMSEN, J.V. Family Furnariidae (Ovenbirds). In del Hoyo, J; Elliot, A, Christie, D.A. (eds) Handbook of birds of the world. V. 8. Broadbillis to Tapaculos. Barcelona, Lynx Edicions. pp 162-357. 2003.
- SIBLEY, C.G.; AHLQUIST, J.E. Phylogeny and classification of birds: a study in molecular evolution. 1990

SANTOS, L.P.; GUNSKI, R.J. Revisão de dados citogenéticos sobre a avifauna brasileira. *Revista Brasileira de Ornitologia* 14(1): 35–45. 2006.

ANEXO A

Protocolo Banda C segundo LEDESMA; GARNERO; GUNSKI (2002) com modificações. Primeiramente, as melhores metáfases foram fotografadas em coloração com Giemsa.

Remover o óleo de imersão com o auxílio de Xilol e o Giemsa com Fixador (3:1), e então, as lâminas são submetidas ao bandeamento C:

Incubar a lâmina em HCl 0,2 N à temperatura ambiente por 15 minutos;

Lavar em água destilada;

Mergulhar a lâmina em Hidróxido de Bário (50%) à 40 °C por 17 minutos;

Mergulhar a lâmina em HCl 0,01 N à temperatura ambiente por 2 minutos;
lavar em água destilada;

Incubar em 2 x SSC à 60 °C por 1 hora;

Corar com Giemsa por 9 minutos;

Analisar em microscópio óptico.

OBS: Melhores resultados foram obtidos com lâminas envelhecidas por três a sete dias à temperatura ambiente.

ANEXO B

Protocolo da Hibridização *in situ* fluorescente segundo DE OLIVEIRA et al. (2010) com modificações

Pingar uma gota da preparação cromossômica no centro da lâmina (15 μ L);

Pepsinizar a lâmina por 3min;

Lavar em 2 x SSC por 5min;

Incubar a 65°C estufa por 1h;

Desnaturar a lâmina em Formamida 70% a 73°C por 1min e 30s;

Parar a desnaturação com etanol 70% gelado por 4min;

Desidratar a lâmina em séries de Etanóis: Etanol 70% a temperatura ambiente por 4min, Etanol 90% a temperatura ambiente por 2min e Etanol 100% a temperatura ambiente por 4min;

Secar a lâmina em temperatura ambiente;

Pingar sobre a lâmina 15 μ L de tampão de hibridização contendo a sonda previamente desnaturada (10min a 73°C e 30 minutos na estufa a 37°C);

Colocar uma lamínula sobre a lâmina;

Selar a lamínula na lâmina com a utilização de cola plástica; Incubar na estufa a 37°C por 72h;

Retirar a lamínula;

Lavar duas vezes em Formamida (50%) por 5min a 44°C;

Lavar duas vezes em 2xSSC a 44°C por 5min;

Colocar 100 μ L de solução de detecção em cada lâmina;

Cobrir com papel para filme;

Colocar na estufa a 37°C por 30min;

Lavar duas vezes a lâmina em Tween por 5min;

Pingar 10 μ L de DAPI sobre a lâmina;

Colocar uma lamínula sobre a lâmina;

Vedar a lamínula com esmalte natural;

Observar em microscópio de fluorescência.

OBS: Os passos gerais utilizados para os experimentos com sondas ribossomais das sequências 18S são muito similares aos utilizados para sondas cromossômicas. Entretanto, é necessário o tratamento com RNase antes da

pepsinização e a incubação para hibridização das sondas é *overnight* e não por 72 horas.