

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

**CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA
TYRANNIDAE (AVES, PASSERIFORMES)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RAFAEL KRETSCHMER

**São Gabriel
2014**

RAFAEL KRETSCHMER

**CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA
TYRANNIDAE (AVES, PASSERIFORMES)**

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

Orientador: Dr. Ricardo José Gunski

**São Gabriel
2014**

Kretschmer, Rafael.

Citogenética clássica e molecular em espécies da Família Tyrannidae (Aves, Passeriformes)/Rafael Kretschmer – São Gabriel, 26/02/2014. 57p.

Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Pampa, 2014.

Orientação: Dr. Ricardo José Gunski.

1. Cariótipo ancestral, 2. Número diplóide, 3. Rearranjos cromossômicos, 4. Macrochromossomos, 5. microchromossomos.

RAFAEL KRETSCHMER

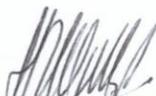
**Citogenética clássica e molecular em espécies da Família Tyrannidae
(Aves, Passeriformes)**

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

Área de concentração: Genética

Dissertação defendida e aprovada em: 26 de fevereiro de 2014.

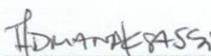
Banca examinadora:



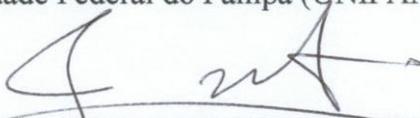
Prof. Dr. Ricardo José Gunski
Orientador
Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)



Prof. Dr. Elgion Lucio da Silva Loreto
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)



Prof. Dr. Adriana Koslovski Sassi
Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)



Prof. Dr. Analía del Valle Garnero
Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

Dedico à minha família, especialmente aos meus pais, os quais sempre me deram estímulo e apoio para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTO

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Ricardo José Gunski e a professora Dr^a. Analía del Valle Garnero por acreditar em minha capacidade, pela paciência, compreensão, pelos conselhos, por apoiar-me sempre que necessário e principalmente pelo incentivo para que seguisse a carreira acadêmica;

Ao professor Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira, pela amizade e orientação durante o estágio no Instituto Evandro Chagas – Ananindeua/PA, o qual foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Márcio Severo de Freitas, pela amizade e por estar presente nas horas boas e ruins;

A CAPES pela bolsa concedida;

Ao SISBIO pela autorização para a amostragem dos espécimes estudados neste trabalho;

Aos colegas e amigos, pelo incentivo e por sempre estarem dispostos a colaborar, em especial Ana Paula de Bairro Lucho, Vanusa Lilian Camargo e Tiago Marafiga Degrandi;

A todos os integrantes do grupo de Diversidade Genética Animal: Letiane Nascimento da Ponte, Marcelo Santos de Souza, Julianne Munhoz e Thays Duarte de Oliveira.

LISTA DE FIGURAS

1 Introdução Geral

- Figura 1 – Cariótipo parcial de um exemplar macho (a) e de um exemplar fêmea (b) da espécie *Furnarius rufus* (Furnariidae, Passeriformes) (a). Note a significativa diferenciação morfológica entre os cromossomos Z e W..... 15
- Figura 2 – Esquema do suposto cariótipo ancestral 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). 17
- Figura 3 – Mapa de homologia entre os macrocromossomos de *Gallus gallus* (2n=78) e *Leucopternis albicollis* (2n=66). Fonte: DE OLIVEIRA *et al.* (2010). 18

Capítulo 1

- Figura 1 – Ilustração do método de captura das aves através da utilização de redes de neblina.... 25
- Figura 2 – Complemento cromossômico de um indivíduo macho de *Elaenia spectabilis* (2n=80), em coloração convencional (Giemsa) (A) e cariótipo dos dez primeiros pares autossômicos e par sexual (ZZ) com Banda G (B)... 27
- Figura 3 – Distribuição de heterocromatina constitutiva e das regiões organizadoras de nucléolos (NOR) de *Elaenia spectabilis*. A-B Análise sequencial, Giemsa (A) e banda C (B). As setas indicam os cromossomos sexuais (ZZ). C-D Análise sequencial, Giemsa (C) Banda NORs (D). As setas indicam três microcromossomos portadores das regiões organizadoras de nucléolos..... 28
- Figura 4 – Distribuição cromossômica dos sítios ribossomais 18S em metáfase de um exemplar fêmea de *Elaenia spectabilis*. Foram encontrados quatro microcromossomos portadores das sequências de rDNA 18S..... 29
- Figura 5 – Hibridização *in situ* fluorescente com a utilização de sondas cromossômicas derivadas de *G. gallus* (GGA) e *L. albicollis* (LAL) em metáfases de *E. spectabilis*. As sondas cromossômicas usadas estão indicadas nos círculos na parte inferior, em verde (fluoresceína) ou vermelho (biontin-cy3). 30

Figura 6 – Hibridização <i>in situ</i> fluorescente com a utilização de sondas cromossômicas derivadas de <i>L. albicollis</i> em metáfases de <i>E. spectabilis</i> . As sondas cromossômicas usadas estão indicadas nos círculos na parte inferior, em verde (fluoresceína) ou vermelho (biontin-cy3).	30
Figura 7 – Cariótipo parcial como coloração convencional (Giemsa) de um indivíduo macho de <i>Megarynchus pitangua</i> (A) e de um indivíduo fêmea de <i>Megarynchus pitangua</i> (B), 2n=82.....	31
Figura 8 – Hibridização <i>in situ</i> fluorescente com sondas cromossômicas derivadas de <i>G. gallus</i> (GGA) e <i>L. albicollis</i> (LAL) em metáfases de <i>M. pitangua</i> . As sondas cromossômicas usadas estão indicadas nos círculos na parte inferior, vermelho (biontin-cy3).	32
Figura 9 – Esquematização da origem dos cromossomos 3 e 5 de <i>E. spectabilis</i> . O cromossomo ancestral (GGA1) sofreu uma fissão, dando origem aos cromossomos 3 e 5 de <i>E. spectabilis</i> (ESP) (A). O cromossomo 3 de <i>E. spectabilis</i> também sofreu uma inversão paracêntrica (B). A quebra que permitiu a inversão ocorreu na região que corresponde ao cromossomo LAL 6. O símbolo de interrogação (?) significa que não conhecemos o cromossomo de <i>L. albicollis</i> que corresponde ao braço curto do cromossomo 5 de <i>E. spectabilis</i>	35

Capítulo 2

Figura 1 – Cariótipo parcial de um indivíduo macho de <i>Tolmomyias flaviventris</i> (2n= 56) (A), e de um indivíduo fêmea de <i>Corythopis delalandi</i> (2n=60) (B), através de coloração convencional.....	43
Figura 2 – Hibridização <i>in situ</i> fluorescente com sondas cromossômicas derivadas de <i>G. gallus</i> (GGA) e <i>L. albicollis</i> (LAL) em metáfases de <i>T. flaviventris</i> . As sondas cromossômicas usadas estão indicadas nos círculos na parte inferior, em verde (fluoresceína) ou vermelho (biontin-cy3).	44
Figura 3 – Esquematização da inversão paracêntrica no cromossomo 1 de <i>Tolmomyias flaviventris</i> (TFL) (A-B) e da fusão dos cromossomos ancestrais 3 (LAL 17 e LAL 13) e 4q (LAL 1) de <i>Gallus gallus</i> (GGA) (C).....	45

LISTA DE TABELAS

1 INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1: Dados de hibridização *in situ* fluorescente com sondas cromossômicas em espécies da Ordem Passeriformes: *Fringilla coelebs* (FCO), *Turdus merula* (TME), *Turdus iliacus* (TIL), *Taeniopygia guttata* (TGU), *Pica pica* (PPI), *Garrulus glandarius* (GGL) *Sitta europaea* (SEU), *Sylvia atricapilla* (SAT) *Parus major* (PMA) *Periparus ater* (PAT). M= Microcromossomos; T= Telocêntrico; q = Braço longo; p= Braço curto... 19

Capítulo 1

Tabela 1: Informações sobre os espécimes e número de amostras usadas neste estudo... 24

Tabela 2: Pintura cromossômica com a utilização de sondas de *G. gallus* e *L. albicollis* em *M. pitangua* e *E. spectabilis*..... 34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Citogenética Clássica em Aves	15
2.2 Pintura Cromossômica em Aves	16
2.3 Características da família Tyrannidae (Aves, Passeriformes).....	19
3 CAPÍTULO 1- Análise citogenética em <i>Elaenia spectabilis</i> e <i>Megarynchus pitangua</i> (Aves, Passeriformes): Ocorrência de rearranjos intracromossomais	21
3.1 Resumo.....	22
3.2 Introdução	23
3.3 Material e Métodos	24
3.3.1 Preparação cromossômica	25
3.3.2 Coloração com Giemsa, Ag-NORs, Bandas G e C	26
3.3.3 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente	26
3.4 Resultados	26
3.4.1 <i>Elaenia spectabilis</i> : Descrição cariotípica.....	26
3.4.2 <i>Elaenia spectabilis</i> : Bandeamento cromossômico e rDNA.....	27
3.4.3 <i>Elaenia spectabilis</i> : Hibridização <i>in situ</i> fluorescente	29
3.4.4 <i>Megarynchus pitangua</i> : Descrição cariotípica	31
3.4.5 <i>Megarynchus pitangua</i> : Hibridização <i>in situ</i> fluorescente	31
3.5 Discussão	33
Referências Bibliográficas	36
4 CAPÍTULO 2- Descrição cariotípica de <i>Tolmomyias flaviventris</i> e <i>Corythopsis delalandi</i> (Aves, Passeriformes): Cariótipos atípicos com baixo número diplóide	39
4.1 Resumo.....	40
4.2 Introdução	40
4.3 Material e Métodos	42
4.3.1 Animais e preparações cromossômicas	42
4.3.2 Hibridização <i>in situ</i> e detecção das sondas.....	42
5.4 Resultados	42
5.4.1 Descrição cariotípica	42
5.4.2 <i>Tolmomyias flaviventris</i> : Hibridização <i>in situ</i> fluorescente.....	43

5.5 Discussão	44
Referências Bibliográficas	46
6 Considerações finais	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	49
ANEXO I - Protocolo Banda C segundo LEDESMA <i>et al.</i> (2002) com modificações	53
ANEXO II – Protocolo AgNOR segundo HOWELL & BLACK (1980) com modificações ..	54
ANEXO III – Protocolo Banda G segundo SEABRIGHT (1971) com modificações	55
ANEXO IV - Protocolo da Hibridização <i>in situ</i> fluorescente segundo DE OLIVEIRA <i>et al.</i> (2010) com modificações	56

RESUMO

Na classe Aves, a família Tyrannidae é uma das mais diversificadas e numerosas em termos de espécies, entretanto, poucas possuem seus cariótipos descritos e para estas, apenas foi utilizada a coloração cromossômica convencional. Apesar da escassez de trabalhos citogenéticos, resultados interessantes sobre esta família foram relatados na literatura, como por exemplo, a grande variabilidade da morfologia dos macrocromossomos e variação no número diplóide. Assim, quatro espécies da família Tyrannidae: *Elaenia spectabilis*, *Megarynchus pitangua*, *Tolmomyias flaviventris* e *Corythopsis delalandi* foram estudadas através da coloração convencional e pintura cromossômica com a utilização de sondas cromossômicas inteiras derivadas de *Gallus gallus* e *Leucopternis albicollis*. A espécie *E. spectabilis* também foi estudada através de Banda C, G, Ag-NORs e 18S rDNA. A análise citogenética nas quatro espécies estudadas neste trabalho demonstrou uma grande variabilidade cromossômica. As espécies *E. spectabilis* e *M. pitangua* apresentam cariótipos típicos para a classe Aves, com número diplóide relativamente alto (aproximadamente 80 cromossomos), muitos pares de microcromossomos e poucos pares de macrocromossomos. Por outro lado, as espécies *T. flaviventris* e *C. delalandi* apresentam cariótipos atípicos para a classe Aves, com um baixo número diplóide (aproximadamente 60 cromossomos). Pode-se identificar uma inversão paracêntrica e a fissão do cromossomo 1 ancestral de *Gallus gallus* (GGA1) como características cromossômicas derivadas compartilhadas entre as espécies *E. spectabilis*, *M. pitangua* e *T. flaviventris*. A inversão cromossômica mencionada foi encontrada no cromossomo 1q ancestral (GGA1q). Na espécie *T. flaviventris* foram encontradas fusões cromossômicas, as quais provocaram a diminuição do número diplóide nesta espécie. Os resultados apresentados e discutidos neste trabalho mostram alguns dos rearranjos cromossômicos ocorridos ao longo da evolução cariotípica dos representantes da família Tyrannidae. Também é discutido o estado evolutivo das espécies estudadas em relação ao cariótipo ancestral das aves.

Palavras chaves: Cariótipo ancestral, número diplóide, rearranjos cromossômicos, macrocromossomos, microcromossomos.

ABSTRACT

In the bird's class, the Tyrannidae Family is one of the most diversified and numerous in numbers of species, however, few have been karyotyped and for this, only conventional staining was used. Despite of few cytogenetic researches, interesting results about this family were related in the literature, for example, the high morphology and diploid number variability. Hence, four species of Tyrannidae: *Elaenia spectabilis*, *Megarynchus pitangua*, *Tolmomyias flaviventris* e *Corythopsis delalandi* were studied by conventional staining and chromosome painting with the use of whole chromosome probes derived from *Gallus gallus* and *Leucopternis albicollis*. The species *E. spectabilis*, was also cytogenetically characterized by G- and C-banding, Ag-NORs e 18S rDNA. Cytogenetic analysis in the four species studied in this work showed a large chromosomal variability. The species *E. spectabilis* and *M. pitangua* retained chromosomal complements similar to the putative avian ancestral karyotype, with diploid number relatively high (approximately 80 chromosomes), many pairs of microchromosomes and a few pairs of macrochromosomes. On the other hand, the species *T. flaviventris* and *C. delalandi* have atypical karyotypes among birds, with a low diploid number (approximately 60 chromosomes). We identified a paracentric inversion and fission of ancestral chromosome 1 of *Gallus gallus* (GGA1) as derived chromosomal characteristics shared between the species *E. spectabilis*, *M. pitangua* and *T. flaviventris*. The chromosomal inversion mentioned was found on ancestor chromosome 1q (GGA1q). In species *T. flaviventris* chromosomal fusions, which led to lower diploid number of this species, were found. The results presented and discussed in this dissertation show some of chromosomal rearrangements that occurred along the karyotype evolution of the representatives of the Tyrannidae family. We discuss the evolutionary status of the species studied in relation to the ancestral karyotype of birds.

Key words: Ancestral karyotype, diploid number, chromosomal rearrangements, macrochromosomes, microchromosomes.

1 Introdução geral

Diversos trabalhos têm demonstrado a importância da determinação de características cromossômicas como uma importante ferramenta para o entendimento dos rearranjos cromossômicos ocorridos ao longo da evolução cariotípica. Sua utilização tem contribuído para esclarecimentos acerca da diferenciação dos cromossomos sexuais, além da identificação sexual em espécies que não apresentam dimorfismo (BED'HOM *et al.* 2003). A detecção de rearranjos cromossômicos também se torna importante em análises filogenéticas, uma vez que representam caracteres muitas vezes exclusivos de um determinado grupo, agindo assim como sinapomorfias em análises cladísticas (DE OLIVEIRA *et al.* 2006; 2013).

Entretanto, apesar da grande diversidade de espécies de aves (cerca de 10000 espécies), pouco se sabe sobre a genética e evolução desta classe, por exemplo, para as aves brasileiras, menos de 14 % foram estudadas citogeneticamente (SANTOS & GUNSKI 2006). A escassez de trabalhos citogenéticos de aves deve-se principalmente a três motivos: 1º) elevado número diplóide presente nessa classe, aproximadamente 80 cromossomos; 2º) presença de muitos microcromossomos, citologicamente de difícil distinção, e; 3º) dificuldade de amostragem dos espécimes *in situ*.

A maioria dos cariótipos das aves é composta por aproximadamente 40 pares de cromossomos, caracterizados por poucos pares de macrocromossomos e muitos pares de microcromossomos (CHRISTIDIS 1990). Algumas exceções, com baixo número diplóide, são encontradas principalmente em espécies da ordem Falconiformes e Charadriiformes (DE OLIVEIRA *et al.* 2005; NISHIDA *et al.* 2008; NIE *et al.* 2009) e, com um alto número diplóide são encontrados na ordem Piciformes (CASTRO *et al.* 2002).

Em relação ao sistema sexual das aves, as fêmeas representam o sexo heterogamético (ZW) e os machos representam o sexo homogamético (ZZ) (Fig. 1). Dependendo do estágio da diferenciação sexual, as aves podem ser reunidas em dois grandes grupos: As Ratitas (Struthioniformes, Rheiformes, Casuariiformes e Apterygiformes) e as Carinatas (demais ordens existentes). As primeiras são consideradas como aves ancestrais, pois possuem os cromossomos Z e W morfologicamente e geneticamente idênticos, exceto em uma pequena região ao redor do centrômero do W (STIGLEC *et al.* 2007). As Carinatas, ao contrário, geralmente apresentam diferenças significativas em morfologia e tamanho entre o Z e o W (GUNSKI *et al.* 2000; STIGLEC *et al.* 2007; CORREIA *et al.* 2009). Enquanto existe uma visível diferenciação do cromossomo W entre as Ratitas e as Carinatas, o cromossomo Z

apresenta-se conservado na classe aves, como é demonstrado no trabalho de NANDA & SCHMID (2002). Entretanto, apesar da aparente conservação do cromossomo Z, este tem sofrido muitos rearranjos intracromossomais. O cromossomo Z metacêntrico encontrado em *Gallus gallus* aparece como submetacêntrico em muitas espécies da ordem Galliformes, bem como em Anseriformes (GRIFFIN *et al.* 2007). Além disso, existe uma indicação de adição de heterocromatina nos braços longos deste cromossomo em *G. gallus*, *Coturnix chinensis*, *Callipepla californica*, *Saltator similis*, *Saltator aurantiirostris* (SHIBUSAWA *et al.* 2004; DA PONTE *et al.* 2013).

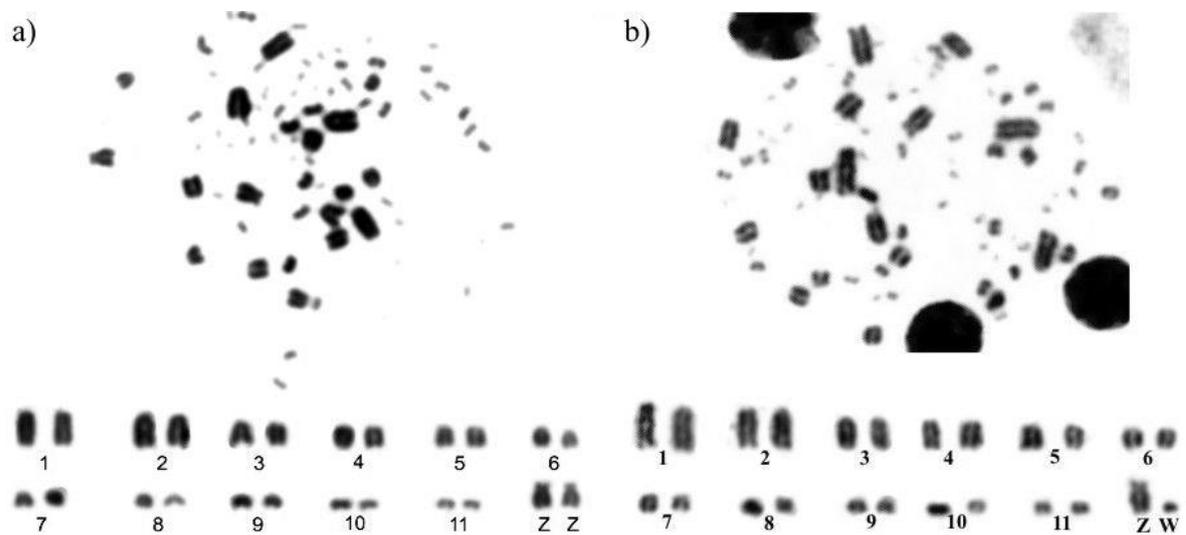


Figura 1 – Cariótipo parcial de um exemplar macho (a) e de um exemplar fêmea (b) da espécie *Furnarius rufus* (Furnariidae, Passeriformes) (a). Note a significativa diferenciação morfológica entre os cromossomos Z e W.

2.0 Referencial Teórico

2.1 Citogenética Clássica em Aves

A citogenética clássica baseia-se na utilização da coloração convencional (Giemsa) e na aplicação das técnicas de bandeamento cromossômico, principalmente a detecção das regiões ricas em heterocromatina constitutiva (Banda C), localização das regiões organizadoras de nucléolo (NOR) e a identificação das regiões ricas em Adenina e Timina (AT) e Citosina e Guanina (CG) (Banda G). A aplicação destas técnicas permite a caracterização mais detalhada do cariótipo, com identificação individual dos pares cromossômicos e caracteres que podem ser utilizados para a comparação com outras espécies

do mesmo grupo, ou até mesmo de grupos distantes filogeneticamente. Entretanto, poucas espécies de Aves apresentam dados de bandeamentos, o que dificulta a compreensão dos mecanismos envolvidos na diferenciação cromossômica. Mesmo com o baixo número de espécies analisadas, se observou que certos grupos têm mostrado uma razoável variação cromossômica, o que poderia encorajar a aplicação de estudos citogenéticos mais aprofundados (DE OLIVEIRA *et al.* 2006). Assim, a utilização das técnicas de bandamento cromossômico tem contribuído de forma significativa na detecção, interpretação e compreensão de rearranjos cromossômicos, auxiliando no estabelecimento das relações cariotípicas entre as várias espécies em estudo, além de revelar aspectos importantes sobre heterocromatina constitutiva e regiões organizadoras de nucléolo (NORs) (CORREIA *et al.* 2009).

Em relação à heterocromatina constitutiva, esta se localiza principalmente na região centromérica. As regiões organizadoras de nucléolos geralmente estão presentes em apenas um par de microcromossomos. Esta característica está presente em todas as espécies de Paleognathae (Struthioniformes, Rheiformes, Casuariiformes, Apterygiformes e Tinamiformes) estudadas até o momento e na maioria das espécies Neognathae (demais ordens existentes). Entretanto, algumas espécies apresentam um número maior de cromossomos portadores das NORs, como por exemplo, em espécies da Família Accipitridae: *Elanus caeruleus* apresenta NOR em dois pares acrocêntricos e *Harpia harpyja* nos cromossomos dois e oito (BED'HOM 2003; DE OLIVEIRA *et al.* 2005). Os padrões de bandamento G têm indicado algumas homologias entre os macrocromossomos de espécies pertencentes a diferentes famílias e até mesmo em diferentes ordens (TAKAGI & SASAKI 1974).

2.2 Pintura Cromossômica em Aves

Até o momento foram utilizadas sondas derivadas de três espécies de aves: *Gallus gallus* (GGA), *Burhinus oedicephalus* (BOE) e *Leucopternis albicollis* (LAL). A pintura cromossômica com sondas de GGA tem sido utilizada com maior frequência, e tem demonstrado uma elevada conservação dos macrocromossomos, além de revelar segmentos homeólogos entre espécies distantes filogeneticamente. Para cada espécie analisada, encontrou-se em torno de dois rearranjos intercromossômicos, exceto nos cariótipos mais derivados, como por exemplo, em espécies de Falconiformes (GUTTENBACH *et al.* 2003; DERJUSHEVA *et al.* 2004; NANDA *et al.* 2006). Nas espécies de Falconiformes,

caracterizadas por apresentar poucos microcromossomos, pelo menos 19 a 22 rearranjos intercromossômicos têm sido descritos (DE OLIVEIRA *et al.* 2005; NANDA *et al.* 2006).

O rearranjo cromossômico mais encontrado é a fissão do cromossomo quatro (GGA 4), o qual é encontrado desde as Paleognathae até as Neognathae (GUTTENBACH *et al.* 2003; NISHIDA-UMEHARA *et al.* 2007). Assim, parece claro que o padrão de hibridização dos cromossomos 1, 2, 3, 4q, 5, 6, 7, 8, 9, 4p e Z de *G. gallus* representam os cromossomos ancestrais para a classe Aves (Fig. 2) (GRIFFIN *et al.* 2007). Portanto, a fissão do cromossomo 4 de *G. gallus* seria a condição plesiomórfica, enquanto a forma observada em *G. gallus*, resultante da fusão desses dois pares, representaria um estado apomórfico (DE OLIVEIRA *et al.* 2006).

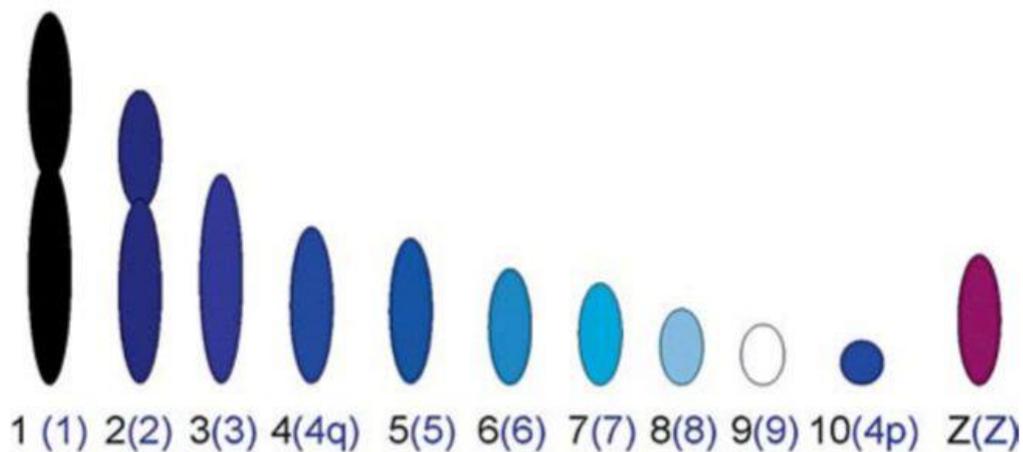


Figura 2 – Esquema do suposto cariótipo ancestral (macrochromossomos) das aves ($2n=80$), ortólogo com *Gallus gallus* ($2n=78$). A única diferença está na fusão dos cromossomos ancestrais 4 e 10. Fonte: GRIFFIN *et al.* (2007).

As sondas de BOE foram descritas no trabalho de NIE *et al.* (2009) e hibridizadas em cinco espécies de diferentes ordens no estudo de HANSMANN *et al.* (2009). Este último trabalho demonstrou que os microcromossomos ancestrais sofreram fusões formando os cromossomos médios em *B. oedienemus*, enquanto eles foram conservados como microcromossomos na maioria das espécies de aves Neognathae.

As sondas de LAL foram descritas pela primeira vez por DE OLIVEIRA *et al.* (2010), através da pintura cromossômica recíproca entre *G. gallus* e *L. albicollis*. Neste trabalho foram descritas várias fissões dos macrocromossomos (Fig. 3), entretanto, fusões entre microcromossomos ocorreram ao longo da evolução cariotípica, as quais ocasionaram a diminuição do número diplóide em *L. albicollis* para 66 cromossomos. Recentemente, sondas

de LAL foram hibridizadas em três espécies de Buteoninae: *Asturina nitida*, *Rupornis magnirostris* e *Buteogallus meridionalis*, o que permitiu a identificação da fusão do GGA 1p com GGA 6, que corresponde a uma sinapomorfia entre as espécies da subfamília Buteoninae (DE OLIVEIRA *et al.* 2013).

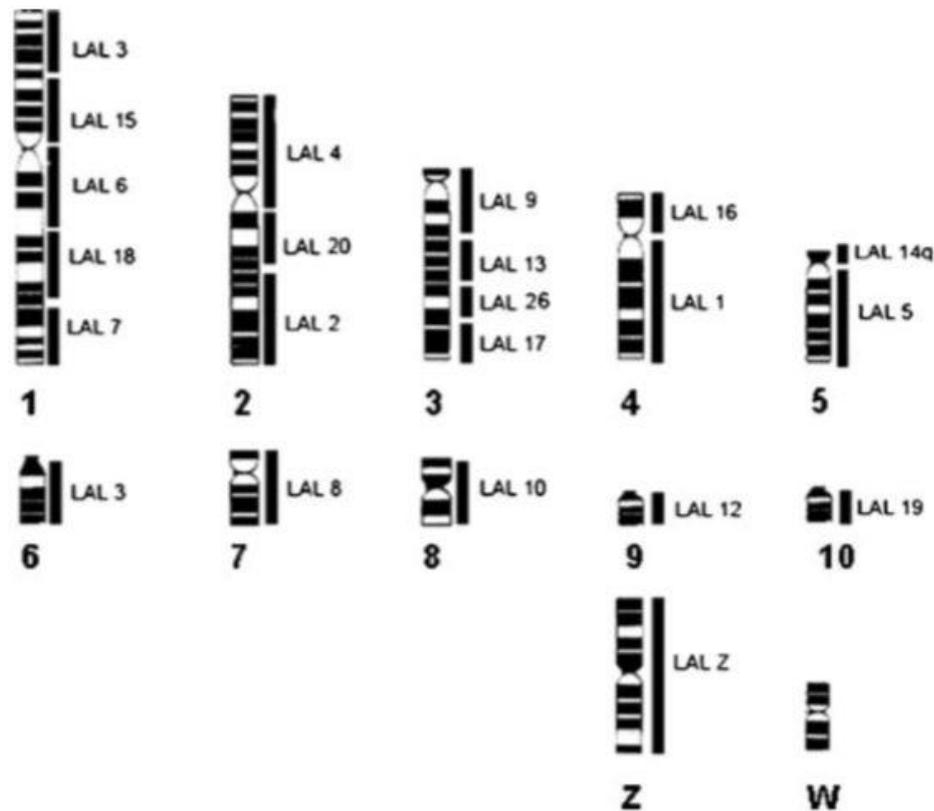


Figura 3 – Mapa de homologia entre os macrocromossomos de *Gallus gallus* (2n=78) e *Leucopternis albicollis* (2n=66). Fonte: DE OLIVEIRA *et al.*, (2010).

Em Passeriformes, a pintura cromossômica iniciou-se em 2003, 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). Mais tarde, *Fringilla coelebs* (Fringillidae) e *Turdus iliacus* (Turdidae) foram hibridizadas com sondas cromossômicas derivadas de *G. gallus* por DERJUSHEVA *et al.* (2004). *Taeniopygia guttata* (Estrildidae) foi hibridizada com sondas de *G. gallus* por ITOH & ARNOLD (2005). O trabalho de pintura cromossômica em Passeriformes mais recente foi em seis espécies de quatro diferentes famílias: *Pica pica*, *Garrulus glandarius* (Corvidae), *Sitta europaea* (Sittidae), *Sylvia atricapilla* (Sylviidae) *Parus major* e *Periparus ater* (Paridae) (NANDA *et al.* 2011). Em todos estes trabalhos, foi encontrado a fissão do cromossomo 1 e 4 de *G. gallus*,

exceto *Sylvia atricapilla*, a qual não possui a fissão do cromossomo GGA 4. A fissão do cromossomo GGA 4 era esperada, visto que esse resultado foi obtido para praticamente todas as espécies de aves estudadas até o momento. Por outro lado, a fissão do cromossomo ancestral GGA 1 não era esperada. Esta característica derivada parece ser compartilhada por todos os Passeriformes. Contudo, esse rearranjo não funciona como uma sinapomorfia para os Passeriformes, uma vez que a fissão do cromossomo 1 de *G. gallus* também foi encontrada em espécies das Ordens Strigiformes, Psittaciformes, Falconiformes e Accipitriformes (GUTTENBACH *et al.* 2003; DE OLIVIEIRA *et al.* 2005; NANDA *et al.* 2006; NANDA *et al.* 2007; DE OLIVIEIRA *et al.* 2008). Os dados encontrados com a hibridização de sondas cromossômicas derivadas de *G. gallus* em espécies de Passeriformes encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1: Dados de hibridização *in situ* fluorescente com sondas cromossômicas derivadas de *G. gallus* em espécies da Ordem Passeriformes: *Fringilla coelebs* (FCO), *Turdus merula* (TME), *Turdus iliacus* (TIL), *Taeniopygia guttata* (TGU), *Pica pica* (PPI), *Garrulus glandarius* (GGL) *Sitta europaea* (SEU), *Sylvia atricapilla* (SAT) *Parus major* (PMA) *Periparus ater* (PAT). M= Microcromossomos; T= Telocêntrico; q = Braço longo; p= Braço curto.

Espécies	Sondas cromossômicas derivadas de <i>Gallus gallus</i> hibridizadas									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
FCO	3q+4	1	2	5+M	6	7	8	9	10	1M
TME	2+5	1	3	4+M	6?	T	T	T	T	-
TIL	2+5	1	3	4+M	6	7	8	9	10	1M
TGU	3+4	1	2	5+M	6	7	8	9	10	-
PPI	3+4	1	2	5+M	6	9	7	8	11	10
GGL	2+4	1	3	5+M	6	8	7	9	10	1M
SAT	2+4	1	3	5	6	9	8	M	10	1M
SEU	2+5	1	3	4+M	6q+10	8	9	7p	7q	6p
PMA	2+4	1	3	6+M	5	7	9	8	11	10
PAT	2+4	1	3	5+M	6	7	9	8	10	11

2.3 Espécies em estudo e características da família Tyrannidae (Aves, Passeriformes)

Os Tyrannídeos representam a maior família de pássaros Suboscines (conhecidos por não apresentar aprendizagem do canto) das Américas e a maior do Brasil. Ocupam todos os

tipos de ambientes, desde florestas e cerrados até ambientes abertos, lacustres e montanhosos. Podem apresentar diferenças morfológicas na forma do bico, presença de bigodes e caudas. A dieta é baseada principalmente em insetos, mas existem espécies frutívoras e carnívoras. Constroem ninhos elaborados ou nidificam em cavidades naturais. Põem ovos coloridos ou brancos, pintalgados ou manchados com cores fortes como marrom, preto ou castanho avermelhado (SIGRIST 2013).

A escolha das espécies e da família para este estudo baseou-se na experiência do grupo de citogenética da Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, RS e pela leitura de artigos científicos da área. Sabia-se que existiam controvérsias filogenéticas na família Tyrannidae e que esta apresentava uma grande variabilidade numérica e morfológica nos primeiros pares cromossômicos, a qual, provavelmente, seja o reflexo da ocorrência de diferentes rearranjos cromossômicos sofridos ao longo da evolução cariotípica (SHIELDS *et al.* 1987; GUNSKI *et al.* 2000). Assim, escolheram-se duas espécies próximas filogeneticamente daquela espécie descrita com um baixo número diplóide (*Platyrrhynchus mystaceus*) e outras duas espécies próximas filogeneticamente de espécies caracterizadas por apresentar cariótipos típicos para a classe aves (*Tyrannus savana*, *Pitangus sulphuratus*) (GUNSKI *et al.* 2000).

Os dados de morfologia externa e os dados de taxonomia molecular confirmam a proximidade filogenética entre as espécies *Tolmomyias flaviventris* e *Corythopsis delalandi* (CHAVES *et al.* 2008). Entretanto, dependendo do autor, estas espécies podem ser incluídas dentro da Família Tyrannidae (CHAVES *et al.* 2008; SIGRIST, 2013; SOUTH AMERICAN CLASSIFICATION COMMITTEE, 2014) ou dentro da família Rhynchocyclidae (CBRO, 2014). Esta discordância filogenética reflete a falta de estudos para que se chegue a um consenso de qual seria a família mais apropriada para estas espécies. Por outro lado, não existe controvérsia filogenética quanto à classificação das espécies *Elaenia spectabilis* e *Megarynchus pitangua*. Ambas as espécies são incluídas na família Tyrannidae por todos os autores. Neste trabalho nós adotamos a classificação proposta por SOUTH AMERICAN CLASSIFICATION COMMITTEE (2014).

Os dados citogenéticos da família Tyrannidae são escassos, os poucos trabalhos existentes referem-se a dados de coloração convencional com Giemsa. Portanto, até o momento não se encontram trabalhos de citogenética molecular e bandeamento cromossômico em espécies deste grupo, os quais se fazem necessários para melhor entender a evolução cariotípica e as relações filogenéticas entre as espécies de tyrannídeos.

3 CAPÍTULO 1

Análise citogenética em *Elaenia spectabilis* e *Megarynchus pitangua* (Aves, Passeriformes): Ocorrência de rearranjos intracromossomais

Análise citogenética em *Elaenia spectabilis* e *Megarynchus pitangua* (Aves, Passeriformes): Ocorrência de rearranjos intracromossomais

Rafael Kretschmer¹, Edivaldo Herculano Correa de Oliveira², Patricia C. M. O'Brien³, Malcolm A. Ferguson-Smith³, Michelly S. dos Santos⁴, Analía Del Valle Garnero¹, Ricardo José Gunski¹

1 Programa de Pós graduação em Ciências Biológicas, PPGCB, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, Rio Grande do Sul, RS, Brasil, **2** Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética, SAMAM, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, PA, Brasil, **3** Cambridge Resource Centre for Comparative Genomics, Cambridge, United Kingdom, **4** Programa de Pós-Graduação de Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

3.1 Resumo

Na classe Aves, a família Tyrannidae é uma das mais diversificadas e numerosas em termos de espécies, entretanto, poucas possuem seus cariótipos descritos e para estas, apenas foi utilizada a coloração cromossômica convencional. Apesar da escassez de trabalhos citogenéticos, resultados interessantes sobre esta família foram relatados na literatura, como por exemplo, a grande variabilidade da morfologia dos macrocromossomos e variação no número diplóide. Assim, o objetivo deste trabalho foi descrever os cariótipos das espécies *Elaenia spectabilis* (Guaracava-grande) e *Megarynchus pitangua* (Bem-te-vi-do-bico-chato) através da utilização da coloração convencional, bem como, identificar os rearranjos cromossômicos ocorridos ao longo da evolução cariotípica através da utilização da pintura cromossômica com sondas cromossômicas derivadas de *Gallus gallus* e *Leucopternis albicollis*. A espécie *E. spectabilis* também foi estudada através de Banda C, G, Ag-NORs e 18S rDNA. As duas espécies analisadas apresentaram diferenças nas morfologias cromossômicas e uma pequena variação no número diplóide, $2n=80$ em *E. spectabilis* e $2n=82$ em *M. pitangua*. A técnica de Hibridização *in situ* por fluorescência demonstrou a conservação de segmentos cromossômicos de *G. gallus* e *L. albicollis* nas duas espécies analisadas neste trabalho. Entretanto, as hibridizações de sondas derivadas de *L. albicollis* também revelaram a presença de uma inversão no cromossomo três na espécie *E. spectabilis*. Assim, sondas derivadas de *L. albicollis* mostraram-se eficientes para a detecção de rearranjos intracromossomais.

Palavras chaves: Aves, bandeamento cromossômico, inversão, FISH.

3.2 INTRODUÇÃO

Estudos citogenéticos têm sugerido um grau elevado de conservação cariotípica nas aves, com um alto número diplóide (entre $2n = 76$ e 84), poucos pares de macrocromossomos e muitos pares de microcromossomos (CHRISTIDIS 1990). Estas características contribuem para o baixo interesse pelo estudo citogenético desse grupo, uma vez que os microcromossomos são de difícil distinção. Conseqüentemente, as aves representam um dos grupos menos conhecidos citogeneticamente.

Em relação às características cromossômicas, as aves podem ser agrupadas em Ratitas ou Carinatas. O primeiro grupo inclui as aves mais basais, pois possuem os cromossomos Z e W morfologicamente e geneticamente idênticos, exceto em uma pequena região ao redor do centrômero do W (STIGLEC *et al.* 2007). As Carinatas, ao contrário, geralmente apresentam diferenças significativas (morfologia e tamanho) entre o Z e o W (GUNSKI *et al.* 2000; STIGLEC *et al.* 2007; CORREIA *et al.* 2009).

A determinação das características cromossômicas representa uma importante ferramenta para o entendimento do papel dos rearranjos cromossômicos na evolução cariotípica e na diferenciação dos cromossomos sexuais. A aplicação de técnicas de coloração diferencial permitem, além da detecção e interpretação de rearranjos cromossômicos, a identificação de homologias e homeologias cariotípicas (DE OLIVEIRA *et al.* 2006). Entretanto, o uso da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) permite, de modo mais acurado do que a citogenética clássica, a identificação e interpretação dos rearranjos cromossômicos e na detecção de grupos sintênicos conservados durante a divergência cariotípica entre as espécies analisadas. Os resultados desta técnica podem ser visualizados nos trabalhos de SHETTY *et al.* (1999); DE OLIVEIRA *et al.* (2005) sobre os mecanismos de diversificação cromossômica, GRAVES & SHETTY (2001) sobre a diferenciação dos cromossomos sexuais, e mapeamento cromossômico no trabalho de MASABANDA *et al.* (2004), entre outros.

No entanto, deve-se considerar que há a necessidade também da caracterização do cariótipo das espécies de aves através de técnicas de coloração convencional e de bandeamentos cromossômicos, pois a técnica de FISH traz resultados mais satisfatórios

quando aplicadas em espécies com cariótipos devidamente analisados (DE OLIVEIRA *et al.* 2006).

Tanto a citogenética clássica quanto a molecular através da técnica de FISH tem permitido a identificação de sinapomorfias ou simplesiomorfias cromossômicas. Por exemplo, a presença de apenas um par cromossômico portador de sequências 18/28S rDNA em espécies da Família Cathartidae (*Gymnogyps californianus*, *Sarcoramphus papa*, *Cathartes aura* e *C. burrovianus*) é considerada um estado plesiomórfico desta família (RAUDSEPP *et al.* 2002; TAGLIARINI *et al.* 2009), visto que espécies pertencentes às aves Paleognathae (*Pterocnemia pennata*, *Dromaius novaehollandiae*, *Casuarius casuarius*, *Struthio camelus* e *Rhea americana*) também apresentam apenas um par correspondente ao 18S/28S rDNA (NISHIDA-UMEHARA *et al.* 2007). Dessa forma, estudos evolutivos através de caracterização cromossômicos têm revelado informações importantes sobre o estado evolutivo de diferentes grupos de aves.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é contribuir para o entendimento da evolução cariotípica da família Tyrannidae. Para tanto, utilizou-se a citogenética clássica e molecular nas espécies *Elaenia spectabilis* e *Megarynchus pitangua*.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos que incluem o uso de animais foram aprovados pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA-Universidade Federal do Pampa), protocolo número 026/2012. As amostragens foram autorizadas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), número 33860-3. Um exemplar macho da espécie *Elaenia spectabilis* foi amostrado em áreas da Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel – Rio Grande do Sul, Brasil e dois indivíduos (um macho e uma fêmea) da espécie *Megarynchus pitangua*, amostrados no município de Porto Nacional – Tocantins (Tabela 1). As amostragens foram realizadas com redes de neblina durante o amanhecer e o entardecer, período de maior atividade das aves (Fig. 1).

Tabela 1 – Informações sobre os espécimes e número de amostras usadas neste estudo.

Espécies	n	Localidade/Estado	2n	Coordenadas geográficas
<i>E. spectabilis</i>	1♂	São Gabriel, RS	80	30° 20' 06.56" S, 054° 21' 44.82" W
<i>M. pitangua</i>	1♂+1♀	Porto Nacional, Tocantins	82	22° 077' 54.94" S, 88° 10' 050" W



Figura 1 – Ilustração do método de captura das aves através da utilização de redes de neblina.

3.3.1 Preparação cromossômica

Para a obtenção de cromossomos em metáfases, utilizaram-se dois protocolos, a técnica de cultura de curta duração de medula óssea segundo GARNERO & GUNSKI (2000) e cultura de fibroblastos segundo SASAKI *et al.* (1968). Na primeira técnica, a medula óssea foi suspensa em 10 ml de solução de Hank's, juntamente com 0.1 ml de colchicina 0.05%, seguido por incubação a 37°C por 1 hora. Após esse tempo, a suspensão foi centrifugada a 800 rpm por 8 min e removeu-se o sobrenadante. A solução hipotônica (0.075 M, KCl, 10 ml) foi adicionada e incubada novamente a 37°C por 30 minutos. Após, a suspensão foi centrifugada a 800 rpm por 8 min e descartado o sobrenadante. O pellet foi fixado em metanol e ácido acético (3:1) e centrifugado novamente na mesma velocidade. O último passo foi repetido três vezes. Na cultura de fibroblastos, a pele foi esterilizada com etanol 70%, cortaram-se os tecidos em pedaços pequenos e transferiu-se para um tubo de centrífuga de 15

ml com 3 ml de colagenase tipo IV (0,5%). Após, os tubos foram incubados a 37°C por 3 horas. A suspensão foi ressuspensa várias vezes para dissociar as células e adicionaram-se 10 ml de meio de cultura (DMEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino e antibiótico (estreptomicina). As células foram colocadas em 5 ml de meio em garrafas de cultura e foram mantidas a 37°C. Trocou-se o meio de cultura a cada dois dias.

3.3.2 Coloração com Giemsa, AgNORs, Bandas G e C

Para a determinação do número diplóide, foram analisadas 30 metáfases com coloração de Giemsa 5%. O bandeamento C foi realizado conforme o protocolo de LEDESMA *et al.* (2002), com modificações (ANEXO I). Para identificação dos cromossomos portadores das NORs, foram utilizadas lâminas envelhecidas a 60°C por 24 horas e posteriormente foi realizada a impregnação com nitrato de prata segundo HOWELL & BLACK (1980) (ANEXO II). A banda G foi realizada de acordo com SEABRIGHT (1971) com modificações (ANEXO III). Os cromossomos foram classificados de acordo com o índice centromérico proposto por GUERRA (1986).

3.3.3 Hibridização *in situ* fluorescente

Para detectar a localização de genes de RNA ribossômico foram utilizadas sondas do segmento 18S de *Gallus gallus*, a qual foi marcada com biotina. Também utilizou-se sondas cromossômicas derivadas de *G. gallus* e *L. albicollis*. A hibridização *in situ* e a detecção do sinal foram realizadas segundo o protocolo DE OLIVEIRA *et al.* (2010) (ANEXO IV).

3.4 Resultados

3.4.1 *Elaenia spectabilis*: Descrição cariotípica

O número diplóide observado para *Elaenia spectabilis* foi $2n=80$. O primeiro e quarto pares são de morfologia submetacêntrica, o segundo, quinto ao nono são acrocêntricos, o décimo e décimo primeiro são metacêntricos, e os demais cromossomos autossômicos são telocêntricos. O cromossomo sexual Z é de morfologia acrocêntrica (Fig. 2 A).

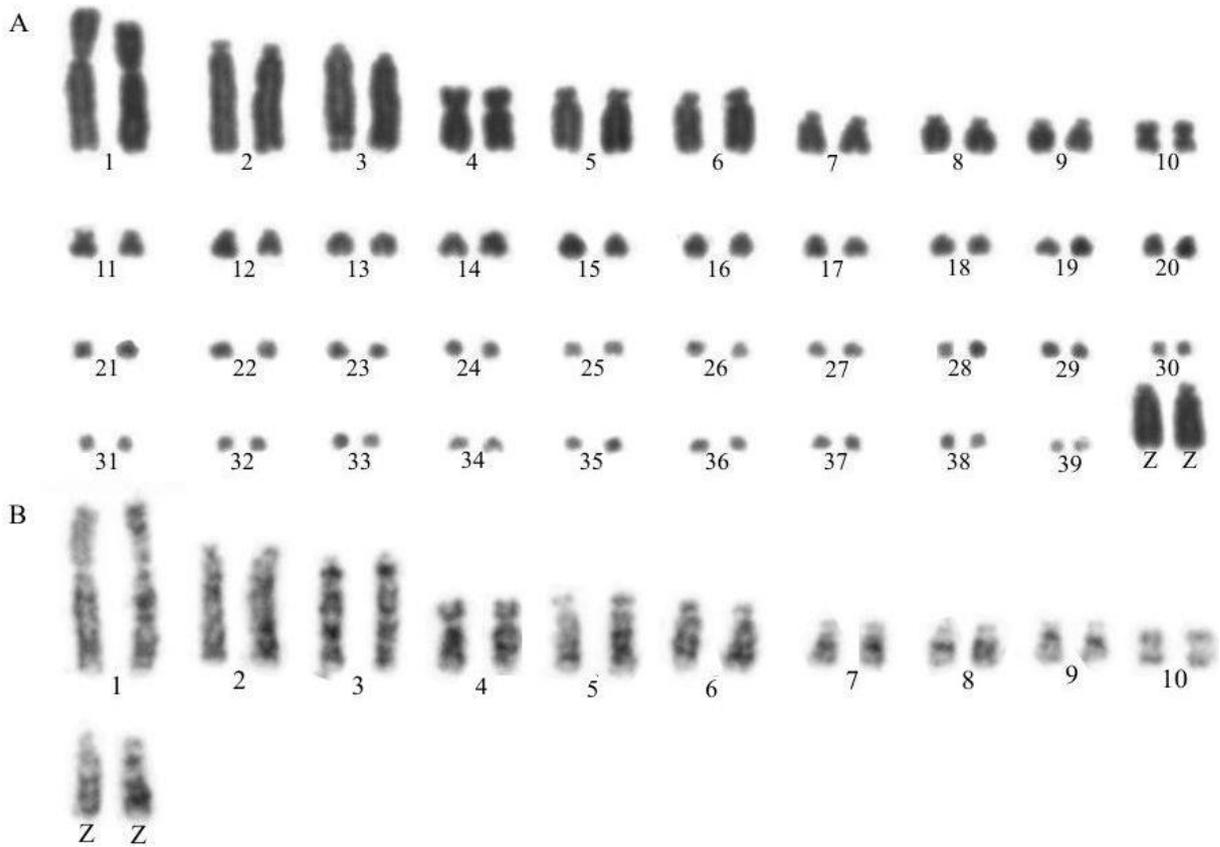


Figura 2 – Complemento cromossômico de um exemplar macho de *Elaenia spectabilis* ($2n=80$), em coloração convencional (Giemsa) (A) e cariótipo dos dez primeiros pares autossômicos e par sexual (ZZ) com Banda G (B).

3.4.2 *Elaenia spectabilis*: Bandeamento cromossômico e rDNA

O padrão de bandeamento G permitiu a identificação dos cromossomos homólogos com um grau de confiabilidade maior do que apenas com a coloração convencional (Fig. 2 B). O bandeamento C revelou a presença de heterocromatina constitutiva principalmente na região centromérica dos macrocromossomos (Fig. 3 A-B). As regiões organizadoras de nucléolos estão presentes em três microcromossomos (Fig. 3 C-D), o que corrobora com os dados obtidos com a hibridização *in situ* fluorescente, onde se observaram quatro microcromossomos portadores das sequências do gene ribossomal 18S (Fig. 4).

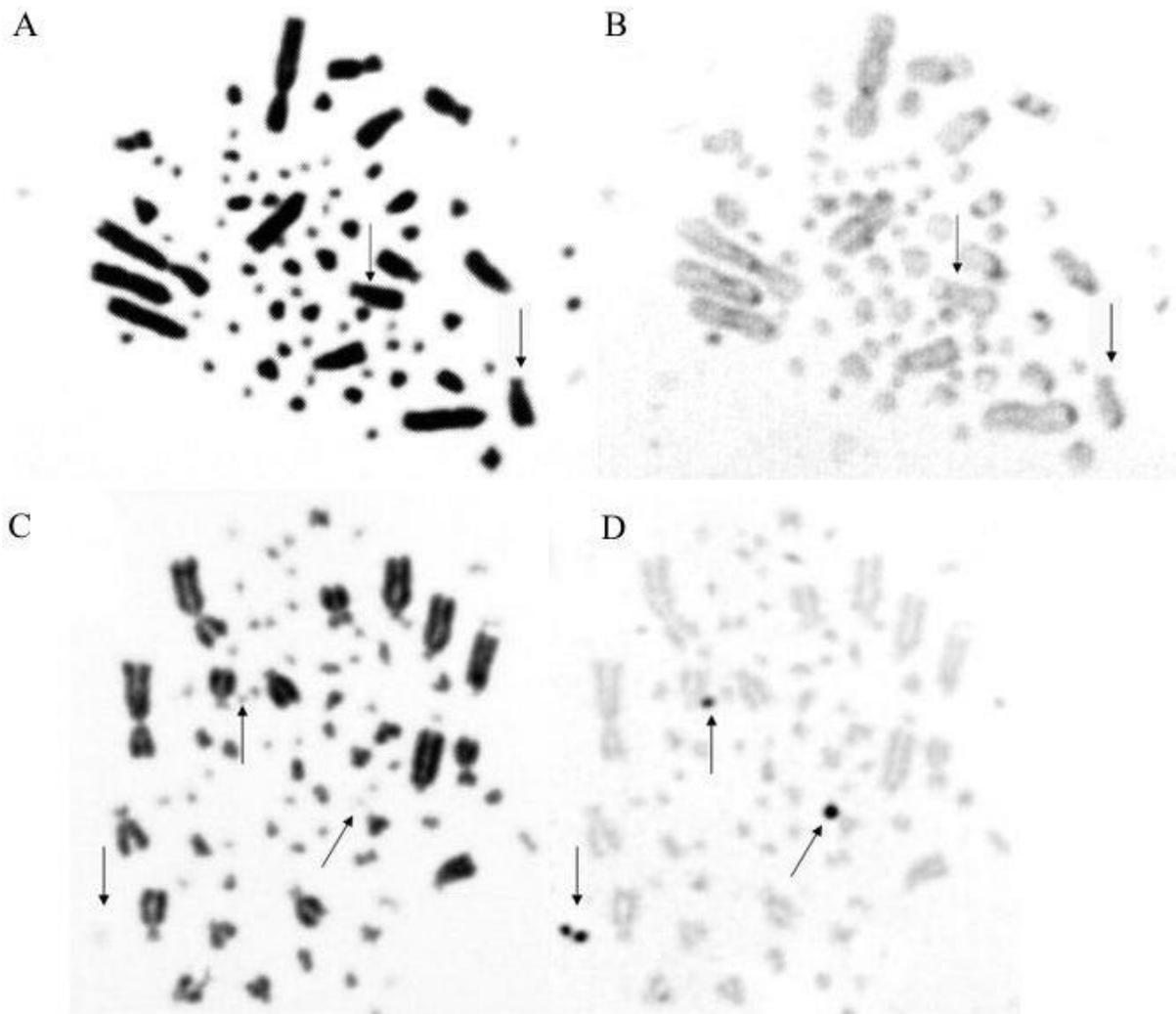


Figura 3 – Distribuição de heterocromatina constitutiva e das regiões organizadoras de nucléolos (NOR) de *Elaenia spectabilis*. A-B Análise sequencial, Giemsa (A) e banda C (B). As setas indicam os cromossomos sexuais (ZZ). C-D Análise sequencial, Giemsa (C) Banda NORs (D). As setas indicam três microcromossomos portadores das regiões organizadoras de nucléolos.

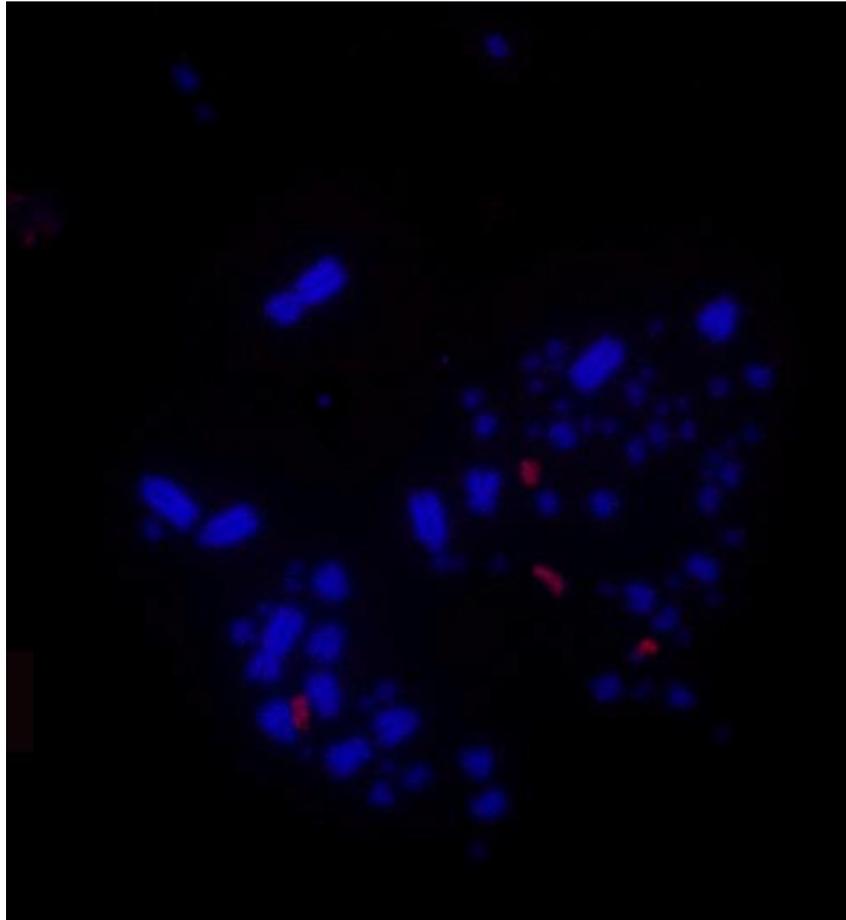


Figura 4 – Distribuição cromossômica dos sítios ribossomais 18S em metáfase de um exemplar macho de *Elaenia spectabilis*. Foram encontrados quatro microcromossomos portadores das sequências de rDNA 18S.

3.4.3 *Elaenia spectabilis*: Hibridização *in situ* fluorescente

As sondas dos cromossomos inteiros derivados de *G. gallus* mostraram a conservação dos grupos sintênicos nos cromossomos 5, 8 e 9. A sonda GGA 5 hibridizou em um par acrocêntrico mediano e cada uma das sondas GGA 8 e GGA 9 hibridizaram em um par acrocêntrico pequeno (Fig. 5 D, E e F).

As sondas derivadas de *L. albicollis* mostraram a mesma homologia encontrada entre *L. albicollis* e *G. gallus* (DE OLIVEIRA *et al.* 2010) (Fig. 5 A-C), exceto as sondas LAL 7, LAL 3 e LAL 6 (Fig. 6 A-B). A sonda LAL 7 encontra-se invertida no cromossomo 3 de *E. spectabilis*. Durante esse rearranjo cromossômico, a quebra que possibilitou a inversão ocorreu no cromossomo LAL 6. Portanto, a sonda do cromossomo LAL 6 produziu duas marcações em *E. spectabilis*, uma na região terminal e outra na região proximal do centrômero do cromossomo 3 dessa espécie. A sonda do cromossomo LAL 3 evidenciou a

fissão do cromossomo 1 ancestral das aves, uma vez que essa sonda corresponde ao cromossomo GGA 1 e a hibridização da sonda do cromossomo LAL 3 exibiu marcações no cromossomo 5 e 7 de *E. spectabilis* (Fig. 5 A).

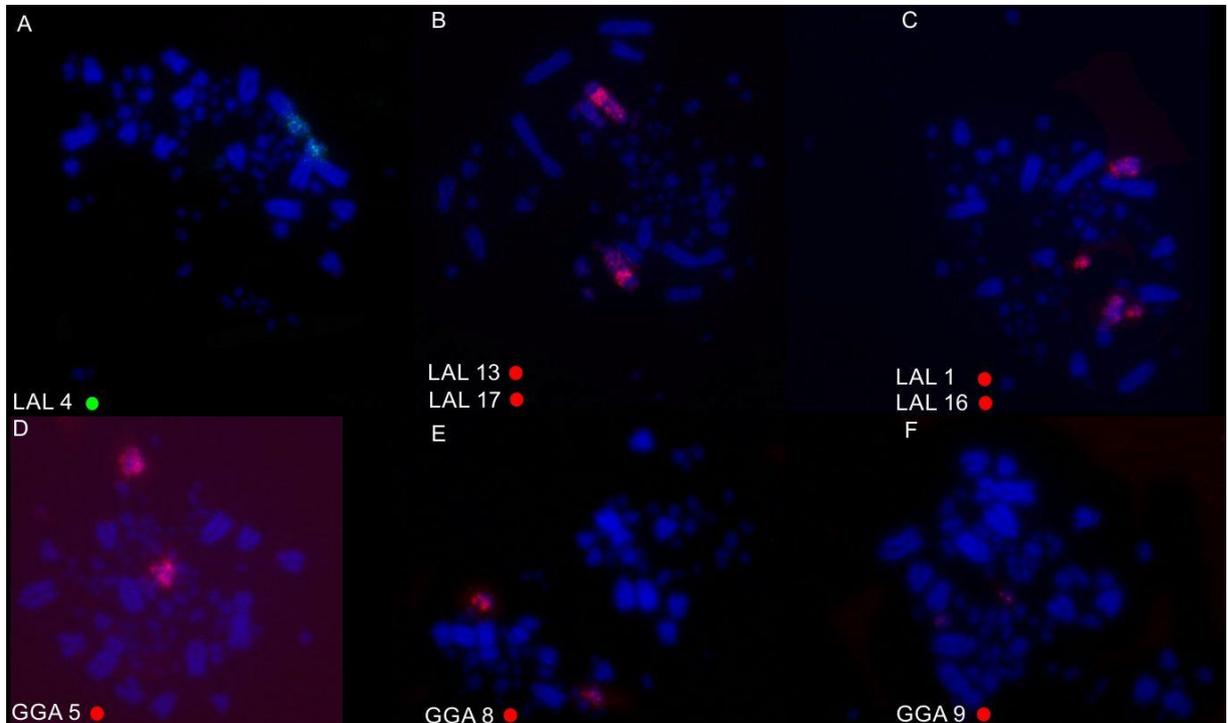


Figura 5 – Hibridização *in situ* fluorescente com a utilização de sondas cromossômicas derivadas de *G. gallus* (GGA) e *L. albicollis* (LAL) em metáfases de *E. spectabilis*. As sondas cromossômicas usadas estão indicadas nos círculos na parte inferior, em verde (fluoresceína) ou vermelho (biontin-cy3).

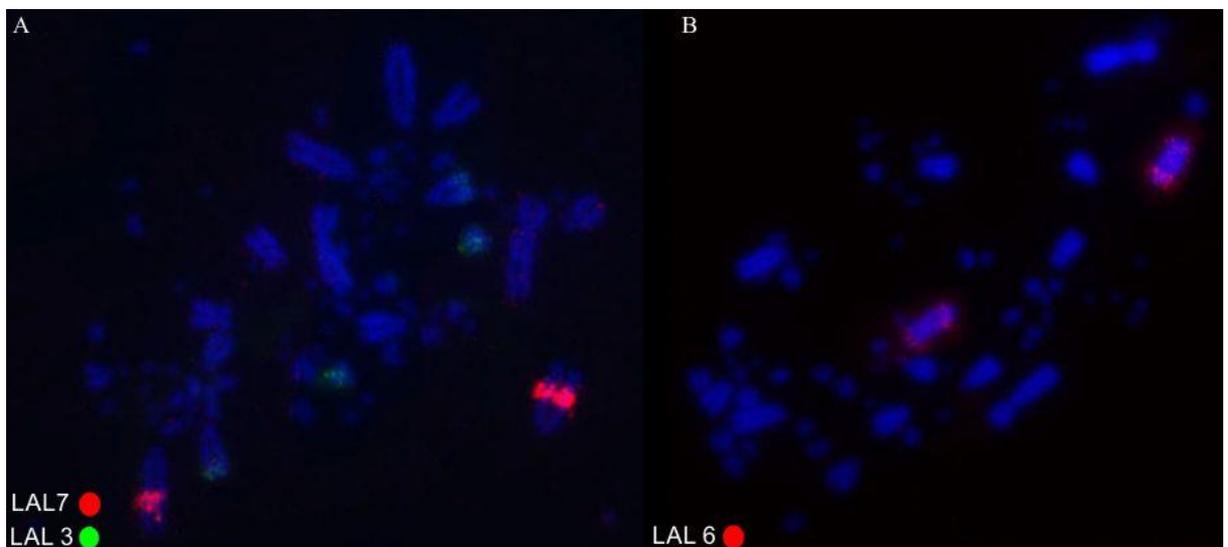


Figura 6 - Hibridização *in situ* fluorescente com a utilização de sondas cromossômicas derivadas de *L. albicollis* em metáfases de *E. spectabilis*. As sondas cromossômicas usadas estão indicadas nos círculos na parte inferior, em verde (fluoresceína) ou vermelho (biontin-cy3).

3.4.4 *Megarynchus pitangua*: Descrição cariotípica

Megarynchus pitangua apresenta $2n=82$, sendo o primeiro par submetacêntrico, segundo acrocêntrico, nono metacêntrico e os demais cromossomos autossômicos são telocêntricos. O cromossomo sexual Z é um submetacêntrico e o cromossomo W acrocêntrico (Fig. 7).

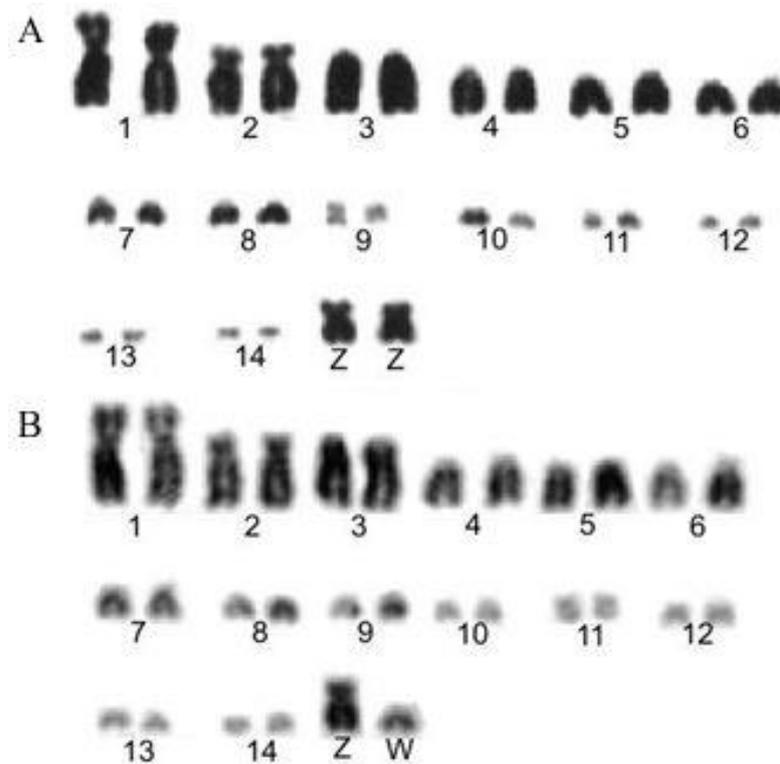


Figura 7 – Cariótipo parcial como coloração convencional (Giemsa) de um indivíduo macho de *Megarynchus pitangua* (A) e de um indivíduo fêmea de *Megarynchus pitangua* (B), $2n=82$.

3.4.5 *Megarynchus pitangua*: Hibridização *in situ* fluorescente

Na espécie *M. pitangua* foram utilizadas as sondas cromossômicas GGA 5, GGA 8, LAL 4, LAL 1 e LAL 16. Cada uma das sondas hibridizou em apenas um par cromossômico, o que demonstra a conservação dessas regiões entre a espécie *M. pitangua* e *G. gallus* (Fig. 8). A sonda GGA 5 hibridizou no sexto par cromossômico e a sonda GGA 8 hibridizou no cromossomo 9 de *M. pitangua*. A sonda LAL 4 hibridizou no braço curto do cromossomo 1, as sondas LAL 1 e LAL 16 hibridizaram no cromossomo 4 e em um microcromossomo, respectivamente. Apesar de não termos conseguido a hibridização com nenhuma sonda de LAL correspondentes ao cromossomo GGA1, foi possível perceber que o cromossomo ancestral GGA1 também está fissionado em *M. pitangua*. Isto porque a sonda LAL 4 (que corresponde ao cromossomo GGA 2) hibridizou no cromossomo 1 de *M. pitangua*. Portanto, o cromossomo 1 ancestral deve estar fissionado para que o cromossomo 2 ancestral tenha se tornado o maior cromossomo do complemento em *M. pitangua*.

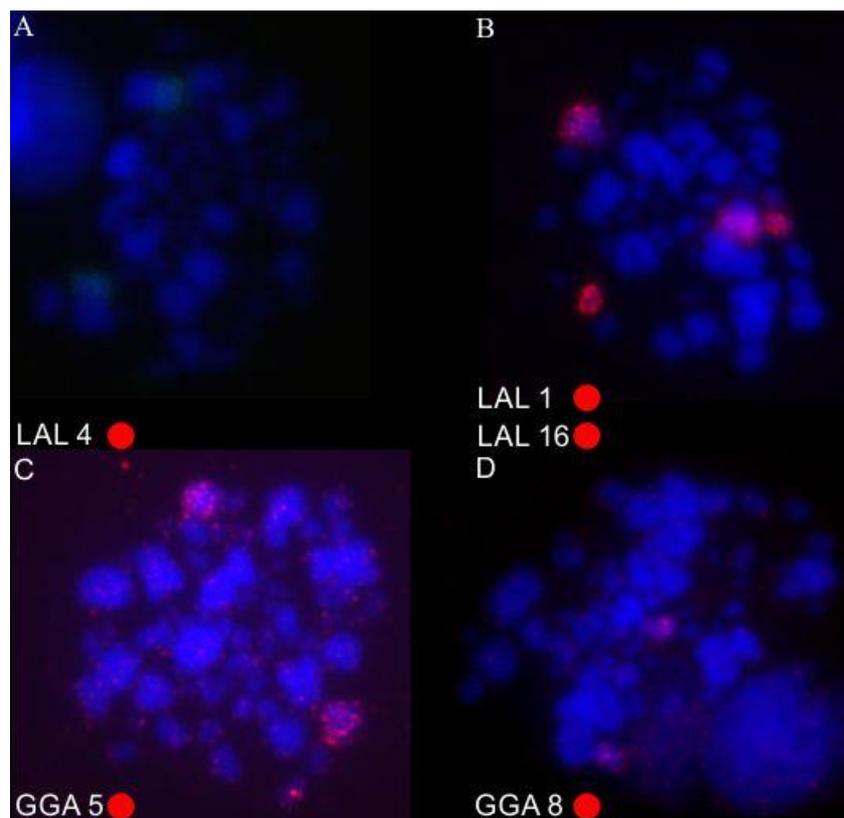


Figura 8 – Hibridização *in situ* fluorescente com sondas cromossômicas derivadas de *G. gallus* (GGA) e *L. albicollis* (LAL) em metáfases de *M. pitangua*. As sondas cromossômicas usadas estão indicadas nos círculos na parte inferior, vermelho (biontin-cy3).

3.5 Discussão

As espécies inseridas na ordem Passeriformes apresentam uma grande similaridade quanto ao número diplóide, onde o número mais encontrado aproxima-se a 80 (SANTOS & GUNSKI 2006). O número cromossômico varia de 60 cromossomos em *Platyrinchus mystaceus* e 84 cromossomos em *Cnemotriccus fuscatus* (GUNSKI *et al.* 2000). As duas espécies citadas pertencem à família Tyrannidae, a qual apresenta a maior variabilidade cromossômica da ordem Passeriformes. Por esse motivo, a Família Tyrannidae vem sendo alvo de pesquisas citogenéticas a fim de compreender os rearranjos cromossômicos que levaram a essa grande variabilidade estrutural e numérica dos cromossomos.

As duas espécies estudadas neste trabalho apresentam cariótipos muito similares e típicos para a classe Aves, com aproximadamente 80 cromossomos e caracterizados por um grande número de pares de microcromossomos e poucos pares de macrocromossomos. Em ambas as espécies, o tamanho do cromossomo sexual Z equivaleu-se entre o terceiro e quarto pares autossômicos. Tal resultado está de acordo com a alta conservação desse cromossomo na classe Aves (NANDA & SCHMID 2002). Entretanto, observou-se variação morfológica entre eles: acrocêntrico em *E. spectabilis* e submetacêntrico em *M. pitangua*. Esta variação morfológica, provavelmente, deve-se a rearranjos intracromossomais, que são frequentes para o cromossomo Z (GRIFFIN *et al.* 2007). O cromossomo sexual W em *M. pitangua* apresentou-se pequeno, que é característica das aves Carinatas (STIGLEC *et al.* 2007).

A heterocromatina constitutiva na espécie *E. spectabilis* está localizada principalmente na região centromérica dos macrocromossomos e em alguns microcromossomos. Este resultado é o mais encontrado para as aves, como pode ser visualizado no trabalho de CORREIA *et al.* (2009). As regiões organizadoras de nucléolos foram localizadas em três microcromossomos, o que corrobora com os dados obtidos com a hibridização *in situ* fluorescente, onde se evidenciou quatro microcromossomos portadores das sequências do gene ribossomal 18S. O que indica a presença de um estado derivado (apomórfico) quanto ao 18S rDNA e NOR em relação ao cariótipo ancestral das aves. Esta hipótese é baseada no fato de que espécies como *Pterocnemia pennata*, *Dromaius novaehollandiae*, *Casuaris casuaris*, *Struthio camelus* e *Rhea americana* (todas pertencentes às aves Paleognathae) apresentam apenas um par correspondente ao 18S-28S rDNA (NISHIDA-UMEHARA *et al.* 2007). Em relação ao bandeamento NOR, espécies de Paleognathae, como *Rhea americana* (GUNSKI & GIANNONI 1998), *Crypturellus tataupa*, *Tinamus solitarius* (GARNERO *et al.* 2006), *Pterocnemia pennata* e *Eudromia elegans* (NISHIDA-UMEHARA *et al.* 2007) apresentam apenas um par de microcromossomos portadores das regiões organizadoras de nucléolos.

Com poucas exceções, cada sonda cromossômica hibridizou em um único par cromossômico em metáfases de *M. pitangua* e *E. spectabilis* (Tabela 2). As sondas dos cromossomos inteiros derivados de *G. gallus* em *E. spectabilis* revelaram que cada uma das sondas GGA 5, 8 e 9 marcaram um par cromossômico, como foi encontrado em outras espécies de Passeriformes (GUTTENBACH *et al.* 2003; DERJUSHEVA *et al.* 2004; ITOH & ARNOLD 2005; NANDA *et al.* 2011), com exceção de *Sitta europaea*, em que o cromossomo GGA 5 está fissionado (SEU 6q e SEU 10) e os cromossomos GGA 8 e GGA 9 estão fusionados (NANDA *et al.* 2011). As sondas cromossômicas derivadas de *L. albicollis* permitiram a identificação da conservação dos cromossomos, LAL 4, LAL 13 e LAL 17 na mesma ordem e nos mesmos cromossomos que em *G. gallus* (DE OLIVEIRA *et al.* 2010). As sondas LAL 7 e LAL 6 permitiram a identificação de uma inversão no cromossomo 3 de *E. spectabilis*. A quebra cromossômica que permitiu a inversão ocorreu no cromossomo LAL 6 (Fig 6 e 9). A hibridização do cromossomo LAL 3 na espécie *E. spectabilis* revelou que o cromossomo ancestral (GGA 1) está fissionado nesta espécie, uma vez que, no ancestral essa sonda corresponde a parte terminal do braço curto do cromossomo 1 e ao cromossomo 6, e na espécie *E. spectabilis* essa sonda exibiu marcações na parte terminal do cromossomo 5 e no cromossomo 7 (Fig. 6 e 9).

Tabela 2: Pintura cromossômica com a utilização de sondas de *G. gallus* e *L. albicollis* em *M. pitangua* e *E. spectabilis*.

Espécies	Sondas cromossômicas inteiras										
	Sondas GGA			Sondas LAL							
	5	8	9	4	7	6	1	16	13	17	3
<i>E. spectabilis</i>	6	9	10	1	3	3	4	11	2	2	5, 7
<i>M. pitangua</i>	6	-	-	1	-	-	4	11	-	-	-

A fissão do cromossomo GGA 1 parece ser uma característica compartilhada por todos os Passeriformes, uma vez que este resultado foi encontrado para as dez espécies dessa ordem que tiveram pintura cromossômica (*Turdus merula*, *Fringilla coelebs*, *Turdus iliacus*, *Taeniopygia guttata*, *Pica pica*, *Garrulus glandarius*, *Sitta europaea*, *Sylvia atricapilla*, *Parus major* e *Periparus ater*) (GUTTENBACH *et al.* 2003, DERJUSHEVA *et al.* 2004, ITOH & ARNOLD 2005; NANDA *et al.* 2011). A inversão encontrada no cromossomo 3 de *E. spectabilis* pode ser considerada como uma assinatura citogenética compartilhada por essa ordem, pois também foi encontrada em *Tolmomyias flaviventris* (Capítulo 2), *Turdus rufiventris* e *Turdus albicollis* (dados não publicados). Essa inversão possivelmente está

presente nas espécies de Passeriformes já estudados, mas não pode ser identificada por que naqueles trabalhos foram utilizadas apenas sondas derivadas de *G. gallus*.

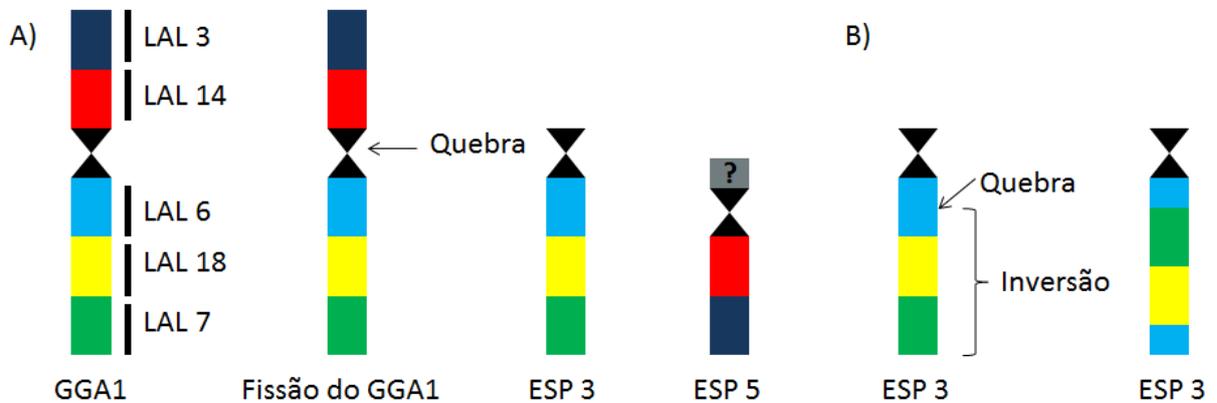


Figura 9 – Esquemática da origem dos cromossomos 3 e 5 de *E. spectabilis* (ESP). O cromossomo ancestral (GGA1) sofreu uma fissão, dando origem aos cromossomos 3 e 5 de *E. spectabilis* (A). O cromossomo 3 de *E. spectabilis* também sofreu uma inversão paracêntrica (B). A quebra que permitiu a inversão ocorreu na região que corresponde ao cromossomo LAL 6. O símbolo de interrogação (?) significa que desconhecemos o cromossomo de *L. albicollis* que corresponde ao braço curto do cromossomo 5 de *E. spectabilis*.

Em conclusão, os dados obtidos demonstram a importância da utilização de sondas derivadas de *L. albicollis*, bem como de outras espécies de aves, para a identificação de rearranjos intracromossômicos, os quais não poderiam ser encontrados apenas com a utilização de sondas derivadas de *G. gallus*. As análises cariotípicas através do bandeamento NOR, rDNA e pintura cromossômica em *E. spectabilis* revelaram que esta espécie possui a expressão das NORs, a localização dos sítios ribossômicos, fissão do cromossomo 1 ancestral e inversão no cromossomo 3 como características derivadas do ancestral das aves. Dados de pintura cromossômica e mesmo da citogenética clássica se fazem necessários em outras espécies de Passeriformes para verificar se essas características são compartilhadas por todas as espécies dessa ordem.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Grupo de pesquisa “Diversidade Genética Animal” da Universidade Federal do Pampa. A CAPES pela concessão da bolsa de estudo, ao SISBIO pela licença para a amostragem dos exemplares e à Pró-Reitoria de Pesquisa

(PROPESQ-UNIPAMPA) pelo aporte financeiro através de editais de Apoio a Grupos de Pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHRISTIDIS L. Aves. In: John B, Kayano H, Levan A (eds) **Animal cytogenetics**, vol. 4, Chordata 3. Gebrüder Borntraeger, Berlin. 1990.
- CORREIA, V.C.S.; GARNERO, A.V.; SANTOS, L.P.; SILVA, R.R.; BARBOSA, M.; BONIFÁCIO, H.L.; GUNSKI, R.J. Alta similaridade cariotípica na família Emberezidae (Aves: Passeriformes). **Bio-sci. J.** 25: 99-111. 2009.
- DERJUSHEVA, S.; KURGANOVA, A.; HABERMANN, F.; GAGIN- SKAYA, E. High chromosome conservation detected by comparative chromosome painting in chicken, pigeon and passerine birds. **Chromosome Research** 12:715-723. 2004.
- DE OLIVEIRA, E.H.C.; HABERMANN, F.; LACERDA, O.; SBALQUEIRO, I.J.; WIENBERG, J. MULLER, S. Chromosome reshuffling in birds of prey: the karyotypes of the world's largest eagle (Harpy eagle, *Harpia harpyja*) compared to that of the chicken (*Gallus gallus*). **Chromosoma** 114:338-343. 2005.
- DE OLIVEIRA, E.H.C.; TAGLIARINI, M.M.; NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C. Comparação genômica em aves através de sondas cromossomo-específicas. **Rev. Bras. Ornitol.** 14: 47-52. 2006.
- DE OLIVEIRA, E.H.C.; 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** 18: 349-355. 2010.
- GARNERO, A.V.; GUNSKI, R.J. Comparative analysis of the karyotypes of *Nothura maculosa* and *Rynchotus rufescens* (Aves: Tinamidae). A case of chromosomal polymorphism. **The Nucleus** 43: 64-70. 2000.
- GARNERO, A.V.; LEDESMA, M.A.; GUNSKI, R.J. Alta homeologia cariotípica na família Tinamidae (Aves: Tinamiformes). **Revista Brasileira de Ornitologia** 14 (1) 53-58. 2006.
- GRAVES, J.A.M.; SHETTY, S. Sex From W to Z: Evolution of Vertebrate Sex Chromosomes and Sex Determining Genes. **Journal of Experimental Zoology** 290:449-462. 2001.

- GRIFFIN, D.K.; ROBERTSON, L.B.W.; TEMPEST, H.G.; SKINNER, B.M. The evolution of the avian genome as revealed by comparative molecular cytogenetic. **Cytogenet Genome Res** 117:64-77. 2007.
- GUERRA, M.S. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* **Revista Brasileira de Genética**, 9: 741-743. 1986.
- GUNSKI, R.J.; GIANNONI, M.L. Nucleolar organizer regions and a new chromosome number for *Rhea americana* (Aves: Rheiformes). **Genet Mol Biol.** 21(2):207-210. 1998.
- GUNSKI, R.J.; CABANNE, G.S.; LEDESMA, M.A.; GARNERO, A.V. Análisis cariotípico de siete especies de Tiránidos (Tyrannidae). **Hornero** 15:103-109. 2000.
- GUTTENBACH, M.; NANDA, I.; FEICHTINGER, W.; MASABANDA, J.S.; GRIFFIN, D.K.; SCHMID, M. Comparative chromosome painting of chicken autosomal paints 1–9 in nine different bird species. **Cytogenet Genome Res** 103:173-184. 2003.
- HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** 36:1014-1015. 1980.
- ITOH, Y.; ARNOLD, A.P. Chromosomal polymorphism and comparative painting analysis in the zebra finch. **Chromosome Research** 13: 47-56. 2005.
- LEDESMA, M.A.; GARNERO, A.V.; GUNSKI, R.J. Análise do Cariótipo de duas espécies da Família Formicariidae (Aves: Passeriformes). **Ararajuba** 10:15-19. 2002.
- MASABANDA, J.S.; BURT, D.W.; O'BRIEN, P.C.M. Molecular cytogenetic definition of the chicken genome: the 1st complete avian karyotype. **Genetics** 166:1367-1373. 2004.
- NANDA, I.; SCHMID, M. Conservation of avian Z chromosomes as revealed by comparative mapping of the Z-linked aldolase B gene. **Cytogenet Genome Res** 96:176-178. 2002.
- NANDA, I.; BENISCH, P.; FETTING, D.; HAAF, T.; SCHMID, M. Synteny Conservation of Chicken Macrochromosomes 1–10 in Different Avian Lineages Revealed by Cross-Species Chromosome Painting. **Cytogenet Genome Res** 132:165–181. 2011.
- 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** 15:721-734. 2007.
- RAUDSEPP, T.; HOUCK, M.L.; O'BRIAN, P.C.; FERGUNSON-SMITH, M.A.; RYDER, O.A.; CHOWDHARY, B.P. Cytogenetic analysis of California Condor (*Gymnogyps californianus*) chromosomes: comparison with chicken (*Gallus gallus*) macrochromosomes. **Cytogenet Genome Res** 98:54-60. 2002.

- SANTOS, L.P.; GUNSKI, R.J. Revisão de Dados Citogenéticos sobre Avifauna Brasileira. **Rev. Bras. Ornitol** v. 14, n. 1, p. 35-45. 2006.
- SASAKI, M.; IKEUCHI, T.; MAINO, S. A feather pulp culture for avian chromosomes with notes on the chromosomes of the peafowl and the ostrich. **Experientia** 24:1923-1929. 1968.
- SEABRIGHT, M. A rapid banding technique for human chromosomes. **Lancet**. 2:971-972. 1971.
- SHETTY, S.; GRIFFIN, D.K.; GRAVES, J.A. Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. **Chromosome Research** 7:289-295. 1999.
- STIGLEC, R.; EZAZ, T.; GRAVES, J.A.M. A new look at the evolution of avian sex chromosomes. **Cytogenet Genome Res** 117:103-109. 2007.
- TAGLIARINI, M.M.; NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C.; RISSINO, J.; DE OLIVEIRA, E.H.C. Chromosomal analysis in Cathartidae: Distribution of heterochromatic blocks and rDNA, and phylogenetic considerations. **Genetica** 135:299-304. 2009.

4 Capítulo 2

Descrição cariotípica de *Tolmomyias flaviventris* e *Corythopsis delalandi* (Aves, Passeriformes): Cariótipos atípicos com baixo número diplóide

Descrição cariotípica de *Tolmomyias flaviventris* e *Corythopis delalandi* (Aves, Passeriformes): Cariótipos atípicos com baixo número diplóide

Rafael Kretschmer¹, Edivaldo Herculano Correa de Oliveira², Mario Angel Ledesma³, Patricia C. M. O'Brien⁴, Malcolm A. Ferguson-Smith⁴, Analía Del Valle Garnero¹, Ricardo José Gunski¹

1 Programa de Pós graduação em Ciências Biológicas, PPGCB, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, Rio Grande do Sul, RS, Brasil, **2** Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética, SAMAM, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, PA, Brasil, **3** Parque Ecológico El Puma, Candelaria, Misiones, Argentina, **4** Cambridge Resource Centre for Comparative Genomics, Cambridge, United Kingdom.

4.1 Resumo

Os Passeriformes em geral apresentam uma grande similaridade cariotípica, com aproximadamente 80 cromossomos, sendo a maioria composta por microcromossomos. Raras exceções observam-se na família Tyrannidae, na qual o número diplóide varia de 60 a 84 cromossomos. Assim, esta família torna-se um grupo interessante em termos citogenéticos, pois diferentes rearranjos cromossômicos ocorreram, possibilitando a grande variabilidade cromossômica, fenotípica e comportamental observada neste grupo. A coloração convencional com Giemsa e a pintura cromossômica foram utilizadas para identificar segmentos homólogos entre a espécie *Tolmomyias flaviventris* (Bico-chato-amarelo) e as espécies *Gallus gallus* e *Leucopternis albicollis*. Estudou-se também a espécie *Corythopis delalandi* (Estalador) através da coloração convencional. Os resultados nas duas espécies aqui estudadas revelaram um número diplóide atípico para a classe aves, $2n=56$ para *Tolmomyias flaviventris* e $2n=60$ para *Corythopis delalandi*. Os resultados da pintura cromossômica em *Tolmomyias flaviventris* mostraram a ocorrência de fusões e inversões durante a evolução cariotípica desta espécie.

4.2 Introdução

A classe Aves possui aproximadamente 10000 espécies, as quais apresentam uma grande variabilidade morfológica, comportamental e alimentícia como resultado da especiação para diferentes habitats. Entretanto, essa variabilidade não se estende ao nível citogenético, onde a

maioria das espécies apresenta um número diplóide em torno de 80 cromossomos (CHRISTIDIS 1990). Assim, o cariótipo das aves caracteriza-se pela presença de 7-10 pares de macrocromossomos e um grande número de microcromossomos de difícil distinção e que representam uma característica ancestral e universal de seus cariótipos (HANSMANN *et al.* 2009). Apesar da existência desse cariótipo típico para as aves, é possível encontrar na literatura espécies caracterizadas por apresentar cariótipos atípicos, seja pela presença de um baixo ou um alto número diplóide. A Família Ramphastidae, por exemplo, é caracterizada pelo alto número diplóide (CASTRO *et al.* 2002). Por outro lado, as famílias Accipitridae e Falconidae são caracterizadas pela presença de um baixo número cromossômico (DE OLIVEIRA *et al.* 2005; NISHIDA *et al.* 2008). Em todas estas espécies com baixo número diplóide, houve o aumento do número de pares de macrocromossomos, associado com a diminuição do número de microcromossomos.

Apesar da aparente conservação do cariótipo das aves, com a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi possível identificar rearranjos cromossômicos, tais como fusões e fissões de forma mais eficiente do que com a citogenética clássica (bandamentos cromossômicos). Extensivas fusões cromossômicas ocorridas durante a evolução cariotípica foram evidenciadas no trabalho de NIE *et al.* (2009) em um representante da ordem Charadriiformes, *Burhinus oedicnemus*, o qual apresenta $2n=42$. Até o momento não foram realizados experimentos de FISH em espécies com um número diplóide extremamente alto, como em representantes da família Ramphastidae, mas certamente as fissões cromossômicas devem ser os principais rearranjos cromossômicos em espécies com estas características.

As espécies *Tolmomyias flaviventris* e *Corythopsis delalandi*, pertencem à família Tyrannidae, ordem Passeriformes. Esta ordem é caracterizada por apresentar um número diplóide aproximado a 80 cromossomos (SANTOS & GUNSKI 2006). Entretanto, existe na literatura a descrição cariotípica de uma espécie (*Platyrrinchus mystaceus*) com um baixo número diplóide ($2n=60$) e outra (*Cnemotriccus fuscatus*) com um número diplóide relativamente alto ($2n=84$) (GUNSKI *et al.* 2000). Ambas as espécies pertencem à família Tyrannidae, a qual apresenta uma alta diversidade cariotípica, em termos de morfologia cromossômica e número diplóide, possivelmente devido a diferentes eventos ocorridos durante a evolução cariotípica desta família (GUNSKI *et al.* 2000).

A utilização da pintura cromossômica em espécies da ordem Passeriformes revelou a fissão do cromossomo GGA 1 em dez espécies: *Turdus iliacus*, *Fringilla coelebs*, *Turdus merula*, *Taeniopygia guttata*, *Pica pica*, *Garrulus glandarius*, *Sitta europaea*, *Sylvia atricapilla*, *Parus major* e *Periparus ater* (GUTTENBACH *et al.* 2003; DERJUSHEVA *et al.*

2004; ITOH & ARNOLD 2005; NANDA *et al.* 2011), além da fissão do cromossomo GGA 4 que já tinha sido relatado para outras espécies de diferentes ordens.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi descrever o cariótipo de duas espécies da Família Tyrannidae, *Tolmomyias flaviventris* e *Corythopsis delalandi* e identificar os rearranjos cromossômicos sofridos durante a especiação.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Animais e preparações cromossômicas

Duas espécies pertencentes à família Tyrannidae foram estudadas no presente estudo: *Tolmomyias flaviventris* e *Corythopsis delalandi*. Um indivíduo macho da espécie *T. flaviventris* foi amostrado no município de Porto Nacional – Tocantins e um indivíduo fêmea da espécie *C. delalandi* foi amostrado no município de Santa Ana, Província de Misiones, Argentina. A amostragem foi realizada com redes de neblina durante o amanhecer e o entardecer, período de maior atividade das aves.

As metáfases foram obtidas através de cultura direta de medula óssea, de acordo com o protocolo de GARNERO & GUNSKI (2000). O protocolo de obtenção cromossômica inclui o tratamento com colchicina (0,05 %), solução hipotônica e fixação celular com metanol e ácido acético (3: 1). Coloração convencional com Giemsa foi utilizada para a determinação do número diplóide e morfologia cromossômica.

4.3.2 Hibridização *in situ* e detecção das sondas

Os experimentos usando sondas cromossômicas inteiras de *Leucopternis albicollis* (LAL) e *Gallus gallus* (GGA) em *T. flaviventris* foram realizados de acordo com DE OLIVEIRA *et al.* (2010) (ANEXO IV). Não foi possível a realização de experimentos de hibridização *in situ* fluorescente na espécie *C. delalandi*, devido à insuficiência das preparações cromossômicas.

5.4 Resultados

5.4.1 Descrição cariotípica

Foram analisadas 20 metáfases de cada exemplar para a determinação do número diplóide e das morfologias cromossômicas. O complemento cromossômico da espécie *T. flaviventris* está composto por 56 cromossomos, sendo os pares primeiro, segundo, quarto, sétimo e décimo metacêntricos, os pares terceiro, quinto, sexto, oitavo e nono submetacêntricos e telocêntricos os restantes pares autossômicos. O cromossomo sexual Z é submetacêntrico (Fig. 1 A). A espécie *C. delalandi* possui 60 cromossomos, sendo o primeiro e sexto pares metacêntricos, segundo ao quinto, sétimo e oitavo submetacêntricos, e os demais cromossomos autossômicos são telocêntricos. O cromossomo sexual Z é submetacêntrico e o cromossomo sexual W é metacêntrico (Fig. 1 B).

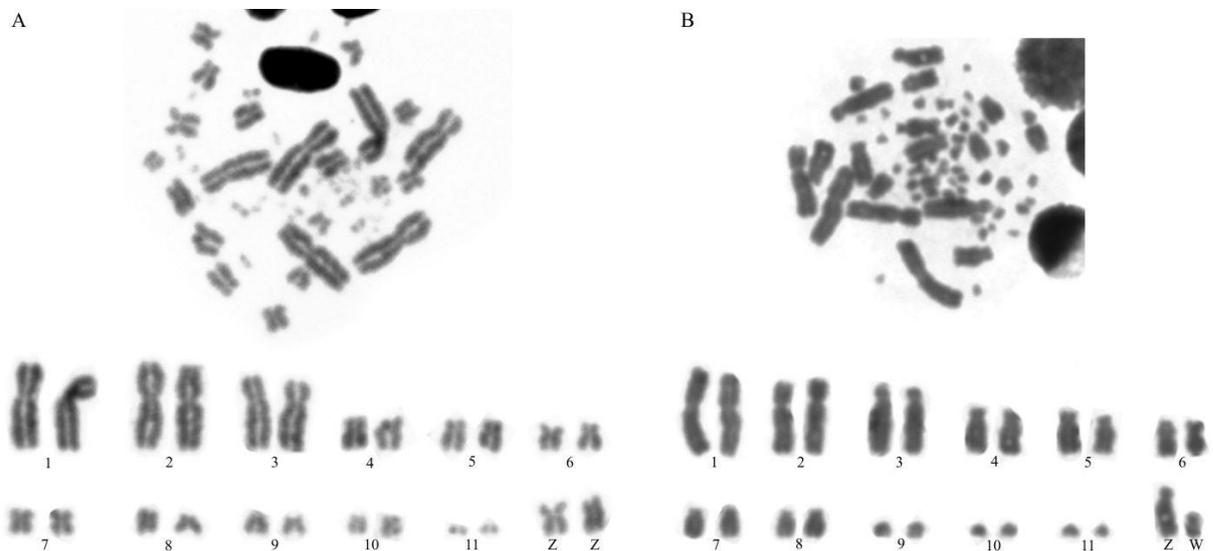


Figura 1 – Cariótipo parcial de um indivíduo macho de *Tolmomyias flaviventris* ($2n=56$) (A), e de um indivíduo fêmea de *Corythopsis delalandi* ($2n=60$) (B), através de coloração convencional. Note a presença de poucos pares de microcromossomos no complemento cromossômico das duas espécies.

5.4.2 *Tolmomyias flaviventris*: Hibridização *in situ* fluorescente

A sonda cromossômica inteira do cromossomo cinco (GGA 5) derivada de *G. gallus* hibridizou no quinto par cromossômico de *T. flaviventris*, indicando a conservação desse cromossomo. A sonda cromossômica do cromossomo LAL 7 derivada de *L. albicollis* hibridizou no cromossomo 1 de *T. flaviventris*, assim como em *G. gallus*, entretanto não na mesma ordem, devido à ocorrência de uma inversão cromossômica. As sondas LAL 13, LAL 17 e LAL 1 hibridizaram no cromossomo 2 de *T. flaviventris*, mostrando que os cromossomos

GGA3 e GGA4p estão fusionados nesta espécie. A sonda LAL 16 hibridizou em um par cromossômico mediano (Fig. 2).

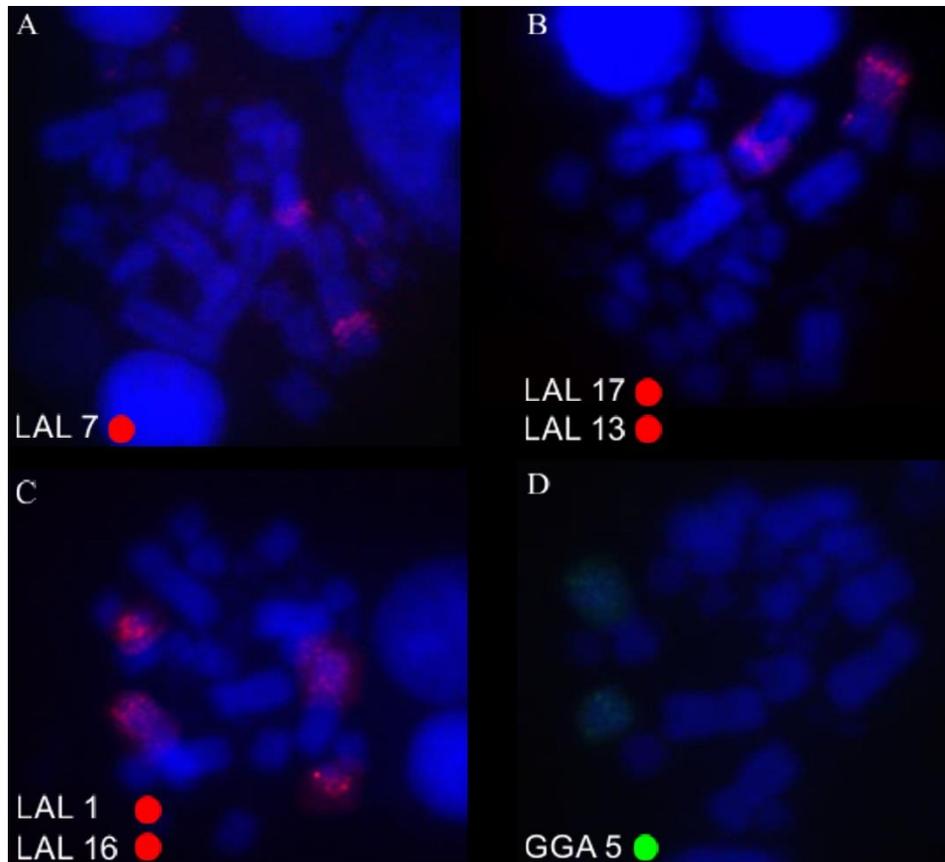


Figura 2 – Hibridização *in situ* fluorescente com sondas cromossômicas derivadas de *G. gallus* (GGA) e *L. albicollis* (LAL) em metáfases de *T. flaviventris*. As sondas cromossômicas usadas estão indicadas nos círculos na parte inferior, em verde (fluoresceína) ou vermelho (biontin-cy3).

5.5 Discussão

Neste trabalho são reportados pela primeira vez os cariótipos das espécies *Tolmomyias flaviventris* e *Corythopsis delalandi*. Nossos resultados sugerem um número diplóide igual a 56 cromossomos para *T. flaviventris* e 60 para *C. delalandi*. Os números diplóides encontrados para ambas as espécies fogem do cariótipo típico das aves, e principalmente para a ordem Passeriformes. Para esta ordem, o número diplóide mais encontrado aproxima-se a 80 cromossomos (SANTOS & GUNSKI 2006). Espécies com um número diplóide baixo são comuns para algumas famílias, como por exemplo, para os representantes da família Falconidae. Estudos nesta família mostram cariótipos com número diplóide aproximado a 50

cromossomos, como pode ser observado em *Falco tinnunculus* ($2n=52$), *Falco peregrinus* ($2n=50$), *Falco columbarius* ($2n=40$) (NISHIDA *et al.* 2008) e em *Morphnus guianensis* ($2n=54$) (WILLIAMS & BENIRSCKE 1976). Entretanto, para a ordem Passeriformes, são raros os cariótipos com essas características, apenas *Platyrinchus mystaceus* (Tyrannidae) ($2n=60$) possui um número diplóide semelhante ao observado em *T. flaviventris* e *C. delalandi* (GUNSKI *et al.* 2000).

As sondas cromossômicas derivadas de *L. albicollis* revelaram a ocorrência de fusões entre macrocromossomos e de uma inversão no cromossomo 1 de *T. flaviventris* (Fig. 3). Fusões de microcromossomos em macrocromossomos e entre microcromossomos já foram relatadas em estudos com espécies com baixo número diplóide, como por exemplo, em Falconiformes: *Falco tinnunculus*, *Falco peregrinus*, *Falco columbarius* (NISHIDA *et al.* 2008). Em uma espécie da família Accipitridae (*Harpia harpyja*, $2n=58$) foram encontradas fusões entre microcromossomos, fusões entre microcromossomos e macrocromossomos e fissões dos macrocromossomos (DE OLIVEIRA *et al.* 2005).

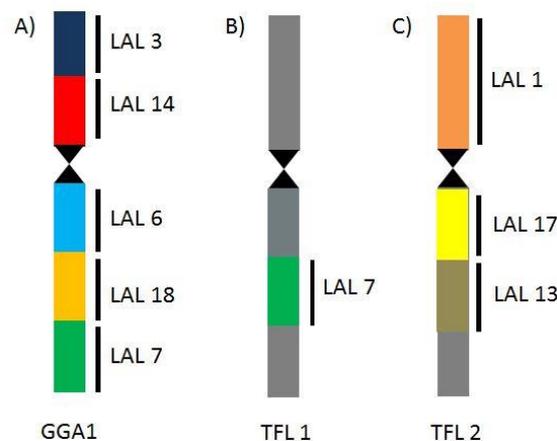


Figura 3 – Esquemática da inversão paracêntrica no cromossomo 1 de *Tolmomyias flaviventris* (TFL) (A-B) e da fusão dos cromossomos ancestrais 3 (LAL 17 e LAL 13) e 4q (LAL 1) de *Gallus gallus* (GGA) (C).

Os dados citogenéticos sugerem que *T. flaviventris*, *C. delalandi* e *P. mystaceus* apresentam características cromossômicas semelhantes, e, portanto, possivelmente compartilham os mesmos rearranjos cromossômicos. Esta hipótese corrobora com dados da taxonomia molecular, na qual *T. flaviventris*, *C. delalandi* e *P. mystaceus* estão próximas filogeneticamente (CHAVES *et al.* 2008). Estas espécies estão distantes filogeneticamente de outras espécies da família Tyrannidae, as quais são caracterizadas por apresentar cariótipos

típicos para classe aves ($2n$ aproximado a 80), como por exemplo, *Pitangus sulphuratus* e *Myiarchus ferox* (GUNSKI *et al.* 2000).

Em conclusão, este trabalho mostra que a ordem Passeriformes, bem como a família Tyrannidae possui diferenças significativas em relação às morfologias dos macrocromossomos e ao número diplóide. As fusões cromossômicas mostraram-se presentes na espécie *T. flaviventris* e, possivelmente, devem estar presentes na espécie *C. delalandi*, uma vez que ambas as espécies apresentam um reduzido número cromossômico.

Agradecimentos

Os autores agradecem à equipe do grupo de pesquisa “Diversidade Genética Animal” da Universidade Federal do Pampa. A CAPES pela concessão da bolsa de estudo, ao SISBIO pela licença para a amostragem dos exemplares, à Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPESQ-UNIPAMPA) pelo aporte financeiro através de editais de Apoio a Grupos de Pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CASTRO, M.S.; RECCO-PIMENTEL, S.M.; ROCHA, G.T. Karyotypic characterization of Ramphastidae (Piciformes, Aves). **Genetics and Mol. Biol.** 25:147-150. 2002.
- CHAVES, A.V.; CLOZATO, C.L.; LACERDA, D.R.; SARI, E.H.R.; SANTOS, F.R. Molecular taxonomy of Brazilian tyrant-flycatchers (Passeriformes: Tyrannidae). **Molecular Ecology Resources** 8: 1169–1177. 2008.
- CHRISTIDIS L. Aves. In: John B, Kayano H, Levan A (eds) **Animal Cytogenetics**, vol. 4, Chordata 3. Gebrüder Borntraeger, Berlin. 1990.
- DERJUSHEVA, S.; KURGANOVA, A.; HABERMANN, F.; GAGIN- SKAYA, E. High chromosome conservation detected by comparative chromosome painting in chicken, pigeon and passerine birds. **Chromosome Research** 12:715-723. 2004.
- DE OLIVEIRA, E.H.C.; HABERMANN, F.; LACERDA, O.; SBALQUEIRO, I.J.; WIENBERG, J. MULLER, S. Chromosome reshuffling in birds of prey: the karyotypes of the world’s largest eagle (Harpy eagle, *Harpia harpyja*) compared to that of the chicken (*Gallus gallus*). **Chromosoma** 114:338-343. 2005.
- DE OLIVEIRA, E.H.C.; 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** 18: 349-355. 2010.
- GARNERO, A.V.; GUNSKI, R.J. Comparative analysis of the karyotypes of *Nothura maculosa* and *Rynchotus rufescens* (Aves: Tinamidae). A case of chromosomal polymorphism. **The Nucleus** 43: 64-70. 2000.
- GUNSKI, R.J.; CABANNE, G.S.; LEDESMA, M.A.; GARNERO, A.V. Análisis cariotípico de siete especies de Tiránidos (Tyrannidae). **Hornero** 15:103-109. 2000.
- GUTTENBACH, M.; NANDA, I.; FEICHTINGER, W.; MASABANDA, J.S.; GRIFFIN, D.K.; SCHMID, M. Comparative chromosome painting of chicken autosomal paints 1–9 in nine different bird species. **Cytogenet Genome Res** 103:173-184. 2003.
- HANSMANN, T.; NANDA, I.; VOLOBOUEV, V.; YANG, F.; SCHARTL, M.; HAAF, T. Cross-Species Chromosome Painting Corroborates Microchromosome Fusion during Karyotype Evolution of Birds. **Cytogenet Genome Res** 126:281-304. 2009.
- ITOH, Y.; ARNOLD, A.P. Chromosomal polymorphism and comparative painting analysis in the zebra finch. **Chromosome Research** 13: 47-56. 2005.
- NANDA, I.; BENISCH, P.; FETTING, D.; HAAF, T.; SCHMID, M. Synteny Conservation of Chicken Macrochromosomes 1–10 in Different Avian Lineages Revealed by Cross-Species Chromosome Painting. **Cytogenet Genome Res** 132:165–181. 2011.
- NIE, W.; O'BRIEN, P.C.M.; NG, B.L.; FU, B.; VOLOBOUEV, V.; CARTER, N.P.; FERGUSON-SMITH, M.A.; YANG, F. 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**. 17:99-113. 2009.
- NISHIDA, C.; ISHIJIMA, J.; KOSAKA, A.; TANABE, H.; HABERMANN, F.A.; GRIFFIN, D.K.; MATSUDA, Y. Characterization of chromosome structures of Falconinae (Falconidae, Falconiformes, Aves) by chromosome painting and delineation of chromosome rearrangements during their differentiation. **Chromosome Research** 16:171-181. 2008.
- SANTOS, L.P.; GUNSKI, R.J. Revisão de Dados Citogenéticos sobre Avifauna Brasileira. **Rev. Bras. Ornitol** v. 14, n. 1, p. 35-45. 2006.
- WILLIAMS, R.M.; BENIRSCKE, K. The chromosome of four species of Falconiformes. **Experientia** 32: 310-311. 1976.

6 Considerações finais

As análises de pintura cromossômica e citogenética clássica em *E. spectabilis*, *M. pitangua*, *T. flaviventris* e *C. delalandi* nos permitiu concluir que:

1 – *E. spectabilis* e *M. pitangua* apresentam cariótipos típicos para as aves, com um número diplóide aproximado a 80 cromossomos, enquanto que *T. flaviventris* e *C. delalandi* apresentam cariótipos atípicos para as aves, com um número diplóide aproximado a 60 cromossomos.

2 – A evolução cariotípica de *T. flaviventris* envolveu fusões entre macrocromossomos, como ficou evidenciado com as hibridizações das sondas cromossômicas LAL 1, LAL 17 e LAL 13. Essas hibridizações demonstraram que o cromossomo ancestral GGA 4q (LAL 1) encontra-se fusionado com o cromossomo ancestral GGA 3 (LAL 17 e LAL 13), formando assim o cromossomo TFL 2. Possivelmente fusões semelhantes às encontradas em *T. flaviventris* também estejam presentes em *C. delalandi*, pois ambas as espécies possuem um baixo número diplóide e esse tipo de rearranjo funciona como propulsor da diminuição do número diplóide.

3 – A fissão do cromossomo ancestral GGA 1 possivelmente representa uma característica compartilhada pela ordem Passeriformes, uma vez que as dez espécies de Passeriformes estudadas através da pintura cromossômica até o momento e *E. spectabilis* e *M. pitangua* compartilham essa característica.

4 – A inversão paracêntrica encontrada nas espécies *E. spectabilis* e *T. flaviventris* demonstram a ocorrência de rearranjos intracromossomais na família Tyrannidae. Essa mesma inversão também foi encontrada em duas espécies da família Turdidae (dados não publicados). Portanto, possivelmente essa característica seja compartilhada por todos os Passeriformes.

Referências Bibliográficas

- BED'HOM, B.; COULLIN, P.; GUILLIER-GENCIK, Z.; MOULIN, S.; BERNHEIM, A.; VOLOBOUEV, V. Characterization of the atypical karyotype of the black-winged kite *Elanus caerulus* (Falconiformes: Accipitridae) by means of classical and molecular techniques. **Chromosome Research** 11:335-343. 2003.
- CASTRO, M.S.; RECCO-PIMENTEL, S.M.; ROCHA, G.T. Karyotypic characterization of Ramphastidae (Piciformes, Aves). **Genetics and Mol. Biol.** 25:147-150. 2002.
- CHAVES, A.V.; CLOZATO, C.L.; LACERDA, D.R.; SARI, E.H.R.; SANTOS, F.R. Molecular taxonomy of Brazilian tyrant-flycatchers (Passeriformes: Tyrannidae). **Molecular Ecology Resources** 8: 1169-1177. 2008.
- CHRISTIDIS L. Aves. In: John B, Kayano H, Levan A (eds) **Animal Cytogenetics**, vol. 4, Chordata 3. Gebrüder Borntraeger, Berlin. 1990.
- COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS (CBRO). Listas das Aves do Brasil. 11ª Edição. Disponível em www.cbro.org.br. 2014.
- CORREIA, V.C.S.; GARNERO, A.V.; SANTOS, L.P.; SILVA, R.R.; BARBOSA, M.; BONIFÁCIO, H.L.; GUNSKI, R.J. Alta similaridade cariotípica na família Emberezidae (Aves: Passeriformes). **Bio-sci. J.** 25: 99-111. 2009.
- DA PONTE LN, KRETSCHMER R, DE SOUZA MS, GARNERO ADV, GUNSKI RJ. Cytogenetic studies of the genus *Saltator*: a case of pericentric inversion in *Saltator similis* Z chromosome. Resumos da 3º RBC - Reunião Brasileira de Citogenética e IV SLACE - Simpósio Latino Americano de Citogenética e Evolução. Guarujá, São Paulo. 2013.
- DE OLIVEIRA, E.H.C.; HABERMANN, F.; LACERDA, O.; SBALQUEIRO, I.J.; WIENBERG, J. MULLER, S. Chromosome reshuffling in birds of prey: the karyotypes of the world's largest eagle (Harpy eagle, *Harpia harpyja*) compared to that of the chicken (*Gallus gallus*). **Chromosoma** 114:338-343. 2005.
- DE OLIVEIRA, E.H.C.; TAGLIARINI, M.M.; NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C. Comparação genômica em aves através de sondas cromossomo-específicas. **Rev. Bras. Ornitol.** 14: 47-52. 2006.
- DE OLIVEIRA, E.H.C.; DE MOURA, S.P.; DOS ANJOS, L.J.; NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C.; O'BRIEN, P.C.M.; FERGUSON-SMITH, M.A. Comparative chromosome painting between chicken and spectacled owl (*Pulsatrix perspicillata*):

- implications for chromosomal evolution in the Strigidae (Aves, Strigiformes). **Cytogenet Genome Res** 122: 157–162. 2008.
- DE OLIVEIRA, E.H.C.; 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** 18: 349-355. 2010.
- DE OLIVEIRA, E.H.C.; TAGLIARINI, M.M.; DOS SANTOS, M.S.; O'BRIEN, P.C.M.; FERGUSON-SMITH, M.A. Chromosome Painting in Three Species of Buteoninae: A Cytogenetic Signature Reinforces the Monophyly of South American Species. **PLOS one** 8 (7): e70071. 2013.
- DERJUSHEVA, S.; KURGANOVA, A.; HABERMANN, F.; GAGIN- SKAYA, E. High chromosome conservation detected by comparative chromosome painting in chicken, pigeon and passerine birds. **Chromosome Research** 12:715-723. 2004.
- GUNSKI, R.J.; CABANNE, G.S.; LEDESMA, M.A.; GARNERO, A.V. Análisis cariotípico de siete especies de Tiránidos (Tyrannidae). **Hornero** 15:103-109. 2000.
- GUTTENBACH, M.; NANDA, I.; FEICHTINGER, W.; MASABANDA, J.S.; GRIFFIN, D.K.; SCHMID, M. Comparative chromosome painting of chicken autosomal paints 1–9 in nine different bird species. **Cytogenet Genome Res** 103:173-184. 2003.
- GRIFFIN, D.K.; ROBERTSON, L.B.W.; TEMPEST, H.G.; SKINNER, B.M. The evolution of the avian genome as revealed by comparative molecular cytogenetic. **Cytogenet Genome Res** 117:64-77. 2007.
- HANSMANN, T.; NANDA, I.; VOLOBOUEV, V.; YANG, F.; SCHARTL, M.; HAAF, T. Cross-Species Chromosome Painting Corroborates Microchromosome Fusion during Karyotype Evolution of Birds. **Cytogenet Genome Res** 126:281-304. 2009.
- ITOH, Y.; ARNOLD, A.P. Chromosomal polymorphism and comparative painting analysis in the zebra finch. **Chromosome Research** 13: 47-56. 2005.
- NANDA, I.; SCHMID, M. Conservation of avian Z chromosomes as revealed by comparative mapping of the Z-linked aldolase B gene. **Cytogenet Genome Res** 96:176-178. 2002.
- NANDA, I.; KARL, E.; VOLOBOUEV, V.; GRIFFIN, D.K.; SCHARTL, M.; SCHMID, M. Extensive gross genomic rearrangements between chicken and Old World vultures (Falconiformes: Accipitridae). **Cytogenet Genome Res** 112:286-295. 2006.

- NANDA, I.; KARL, E.; GRIFFIN, D.K.; SCHARTL, M.; SCHMID, M. Chromosome repatterning in three representative parrots (Psittaciformes) inferred from comparative chromosome painting. **Cytogenet Genome Res** 117: 43–53. 2007.
- NANDA, I.; BENISCH, P.; FETTING, D.; HAAF, T.; SCHMID, M. Synteny Conservation of Chicken Macrochromosomes 1–10 in Different Avian Lineages Revealed by Cross-Species Chromosome Painting. **Cytogenet Genome Res** 132:165–181. 2011.
- NIE, W.; O'BRIEN, P.C.M.; NG, B.L.; FU, B.; VOLOBOUEV, V.; CARTER, N.P.; FERGUSON-SMITH, M.A.; YANG, F. 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**. 17:99-113. 2009.
- 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** 15:721-734. 2007.
- NISHIDA, C.; ISHIJIMA, J.; KOSAKA, A.; TANABE, H.; HABERMANN, F.A.; GRIFFIN, D.K.; MATSUDA, Y. Characterization of chromosome structures of Falconinae (Falconidae, Falconiformes, Aves) by chromosome painting and delineation of chromosome rearrangements during their differentiation. **Chromosome Research** 16:171-181. 2008.
- SANTOS, L.P.; GUNSKI, R.J. Revisão de dados citogenéticos sobre a Avifauna brasileira. **Revista Brasileira de Ornitologia** 14 (1) 35-45. 2006.
- SHIBUSAWA, M.; NISHIDA-UMEHARA, C.; TSUDZUKI, M.; MASABANDA, J.; GRIFFIN, D.K.; MATSUDA, Y. A comparative karyological study of the blue-breasted quail (*Coturnix chinensis*, Phasianidae) and California quail (*Callipepla californica*, Odontophoridae). **Cytogenet Genome Res** 106: 82-90. 2004.
- SHIELDS, G.; BARLOW, J.C.; JAMES, R.D. Karyotypes of five species of Empidonax flycatchers. **The Wilson Bulletin** 99 (2): 169-174. 1987.
- SIGRIST, T. **Guia de Campo Avis Brasilis – Avifauna Brasileira**. 3. ed. São Paulo: Avisbrasilis editora, 2013, 592 p.
- SOUTH AMERICAN CLASSIFICATION COMMITTEE. A Classification of the Bird Species of South America. Disponível em: <http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.htm>. 2014.

STIGLEC, R.; EZAZ, T.; GRAVES, J.A.M. A new look at the evolution of avian sex chromosomes. **Cytogenet Genome Res** 117:103-109. 2007.

TAKAGI, N.; SASAKI, M. A phylogenetic study of bird karyotypes. **Chromosoma** 46: 91-120. 1974.

ANEXO I

Protocolo Banda C segundo LEDESMA *et al.* (2002) com modificações

Primeiramente, as melhores metáfases foram fotografadas em coloração com Giemsa. Removeu-se o óleo de imersão com o auxílio de Xilol e o Giemsa com Fixador (3:1), e então, as lâminas foram 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.

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

ANEXO II

Protocolo Ag-NOR segundo HOWELL & BLACK (1980) com modificações

Primeiramente, as melhores metáfases foram fotografadas em coloração com Giemsa. Posteriormente, as lâminas foram mergulhadas em Xilol para a remoção do óleo de imersão e em Fixador (3:1) para a remoção do Giemsa, e então, as lâminas foram incubadas à 60 °C por 24 horas e submetidas ao bandeamento NOR:

- Pingar três gotas de solução coloidal (1 grama de gelatina diluída em 50ml de H₂O destilada e 25 gotas de ácido fórmico) sobre a lâmina;
- Gotejar duas gotas de Nitrato de prata (50%) em cada gota de solução coloidal;
- Colocar uma lamínula sobre a lâmina;
- Incubar a lâmina em uma câmara úmida a 60 °C até que atinja um tom caramelo;
- Lavar em água destilada;
- Analisar em microscópio óptico.

ANEXO III

Protocolo Banda G segundo SEABRIGHT (1971) com modificações

Primeiramente, as lâminas foram incubadas a 40 °C por 48 horas, e então submetidas ao tratamento com tripsina:

- Mergulhar a lâmina em tripsina 0,25 % (0,25 g de tripsina em 50 ml de tampão fosfato pH 6,8), à 4 °C por 5 segundos;
- Lavar a lâmina em água destilada;
- Corar a lâmina com Giemsa por 7 minutos;
- Analisar em microscópio óptico.

ANEXO IV

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

- Pingar uma gota da preparação cromossômica no centro da lâmina (15µL);
- 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 15µL 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 100µL 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 10µL 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 seqüências 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.