

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS SÃO GABRIEL**

THAYS DUARTE DE OLIVEIRA

**ESTUDO CITOGENÉTICO DE DUAS SUBESPÉCIES DO GÊNERO COLAPTES,
FAMÍLIA PICIDAE (AVES, PICIFORMES)**

**São Gabriel
2015**

THAYS DUARTE DE OLIVEIRA

**ESTUDO CITOGENÉTICO DE DUAS SUBESPÉCIES DO GÊNERO COLAPTES,
FAMÍLIA PICIDAE (AVES, PICIFORMES)**

Trabalho de Conclusão de Curso de Biotecnologia, Universidade Federal do Pampa, campus São Gabriel, como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Dr^a. Analía del Valle Garnero

**São Gabriel
2015**

O48e OLIVEIRA, THAYS DUARTE DE
ESTUDO CITOGENÉTICO DE DUAS SUBESPÉCIES DO GÊNERO COLAPTES,
FAMÍLIA PICIDAE (AVES, PICIFORMES) / THAYS DUARTE DE OLIVEIRA.
37 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade
Federal do Pampa, BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA, 2015.

"Orientação: ANALÍA DEL VALLE GARNERO".

1. CROMOSSOMOS. 2. CITOGENÉTICA. 3. PICA-PAU. 4. BANDA C.
5. NOR. I. Título.

THAYS DUARTE DE OLIVEIRA

**ESTUDO CITOGENÉTICO DE DUAS SUBESPÉCIES DO GÊNERO COLAPTES,
FAMÍLIA PICIDAE (AVES, PICIFORMES)**

Trabalho de Conclusão de Curso de
Biotecnologia, Universidade Federal do
Pampa, campus São Gabriel, como
requisito parcial para obtenção do grau
de bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Dr^a. Analía del Valle
Garnero

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em: 19 de janeiro de 2015.

Banca examinadora:



Prof.^a Dr.^a Analía del Valle Garnero
Orientadora
Universidade Federal do Pampa



Prof. Dr. Ricardo José Gunski
Universidade Federal do Pampa



Msc. Tiago Marafija Degrandi
Universidade Federal do Pampa

Dedico à minha família, especialmente
aos meus pais, Wanclei e Rosária.

AGRADECIMENTO

À Professora Analía del Valle Garnero e ao professor Ricardo José Gunski pela orientação, paciência e amizade.

Aos meus pais, Rosária e Wanclei, por todo o apoio e incentivo dado mesmo longe.

À Gabriela pelo companheirismo, amizade, lealdade, cumplicidade e, principalmente, por me aguentar e apoiar em todos os momentos.

À Natasha minha dupla de todos os trabalhos, obrigada pela ajuda e amizade.

Ao Tiago e Rafael por todos os ensinamentos transmitidos dentro e fora do laboratório, pela ajuda prestada em todas as etapas da confecção deste trabalho.

Aos demais membros do grupo de pesquisa Diversidade Genética Animal, Professor Fabiano, Professora Lúcia, Letiane, Vanusa e Helber.

Aos docentes do curso de Biotecnologia que contribuíram para minha formação.

A todos que de alguma forma contribuíram de diversas maneiras nestes quatro anos.

“Complicações surgiram, continuaram e
foram superadas.”

Capitão Jack Sparrow
Piratas do Caribe – No Fim do Mundo

RESUMO

A Classe Aves apresenta cerca de 10000 espécies, porém esta é pouco estudada geneticamente. A família Picidae é popularmente conhecida como pica-paus e está distribuída em todos os continentes, são aproximadamente 180 espécies, mas apenas 15 têm seu cariótipo descrito. Assim o presente trabalho teve como objetivo descrever e analisar o cariótipo de duas subespécies da família Picidae, *Colaptes campestris campestris* e *Colaptes melanochloros melanolaimus*. Os exemplares foram coletados com redes de neblina, na província de Misiones (Município de Sta. Ana e Candelaria), Argentina e no Rio Grande do Sul (São Gabriel e Dom Pedrito), Brasil. Se estudaram 3 exemplares de *C. campestris campestris* (1 machos e 2 fêmea), e 5 exemplares fêmeas de *C. melanochloros melanolaimus*. As metáfases foram obtidas através da cultura direta de medula óssea e cultura de fibroblastos. Através da técnica convencional de coloração por Giemsa verificou-se um número diplóide de 84 cromossomos para ambas subespécies sendo a maioria microcromossomos. A heterocromatina constitutiva, identificada com DAPI, mostrou-se presente na região centromérica da maioria dos cromossomos inclusive o cromossomo Z. O cromossomo W apresentou-se totalmente heterocromático nas duas subespécies. A região organizadora de nucléolo (NOR) foi evidenciada na região telomérica de um par cromossômico, coincidente com uma constrição secundária. Os dados aqui obtidos, homologia no número e morfologia cromossômica, reforçam o caráter conservativo desta família.

Palavras chave: Cromossomos. Citogenética. Pica-paus. Banda C. NOR.

ABSTRACT

The Class Aves has about 10,000 species, but this is little studied genetically. The Picidae family is popularly known as woodpeckers and is spread across all continents, are about 180 species, but only 15 have described their karyotype. Thus the present study aimed to describe and analyze the karyotypes of two subspecies of the Picidae family, *Colaptes campestris campestroides* and *Colaptes melanochloros melanolaimus*. Specimens were collected in the nets, in the province of Misiones (Municipality of Sta. Ana and Candelaria), Argentina and Rio Grande do Sul (São Gabriel and Dom Pedrito), Brazil. Was studied three specimens of *C. campestris campestroides* (1 males and 2 female), and 5 female specimens of *C. melanochloros melanolaimus*. The metaphases were obtained by direct culture of bone marrow and fibroblast culture. Through conventional Giemsa staining technique verified diploid number of chromosomes 84 for both subspecies and most microchromosomes. The constitutive heterochromatin, identified with DAPI, proved this at the centromeric regions of most chromosomes including the Z chromosome. The W chromosome showed up totally heterochromatic in the two subspecies. Nucleolus organizer regions (NOR) was found in the telomeric region of a chromosome pair, coincident with a secondary constriction. The information contained here in, homology in the number and chromosome morphology, reinforce the conservative character of this family.

Keywords: Chromosomes. Cytogenetics. Woodpeckers. Band C. NOR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ilustração dos animais utilizados no presente estudo *Colaptes campestris* (A) e *C. melanochloros* (B). Fonte: adaptado Wikiaves.....14
- Figura 2 – Metáfase e cariótipo parcial de indivíduos fêmeas de *C. campestris campestroides* (2n=84) (A) e de *C. melanochloros melanolaimus* (2n=84)(B), com coloração convencional (Giemsa).24
- Figura 3 - Bandeamento C de um indivíduo fêmea de *C. campestris campestroides* (A -A') e de um indivíduo fêmea de *C. melanochloros melanolaimus* (B -B'). As setas indicam os cromossomos sexuais Z e W.25
- Figura 4 - Análise sequencial Giemsa e banda NOR de um indivíduo fêmea de *C. campestris campestroides* (A-A', respectivamente) e de um indivíduo fêmea de *C. melanochloros melanolaimus* (B-B', respectivamente). As setas indicam o par cromossômico portador da região organizadora de nucléolo (NOR).....26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número diplóide e morfologia dos cromossomos de espécies da família Picidae estudadas.....	15
Tabela 2 – Exemplos analisados por espécies, sexo, local de coleta e número de adesão.	19
Tabela 3- Biometria dos macrocromossomos e cromossomos sexuais de <i>C. campestris campestris</i> e <i>C. melanochloros melanolaimus</i>	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	12
1.1 Características da família Picidae (Aves, Piciformes)	13
2 CAPÍTULO 1 - DESCRIÇÃO CARIOTÍPICA DE DUAS SUBESPÉCIES DO GÊNERO COLAPTES, FAMÍLIA PICIDAE (AVES, PICIFORMES).....	15
2.1 Resumo	17
2.2 Introdução	19
2.3 Material e métodos.....	20
2.3.1 Coleta das amostras	20
2.3.2 Obtenção de metáfases	20
2.3.3 Análises cromossômicas.....	21
2.3.3.1 Determinação do número diplóide	21
2.3.3.2 Bandeamento C.....	21
2.3.3.3 Bandeamento NOR.....	21
2.4 Resultados.....	22
2.4.1 Descrição cariotípica.....	22
2.4.2 Bandeamento C	22
2.6 Agradecimentos	28
2.7 Referências bibliográficas	29
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
ANEXO I.....	35
ANEXO II.....	36

1 INTRODUÇÃO GERAL

A definição de citogenética de acordo com Guerra (1988) é “todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto condensado ou distendido, tanto no que diz respeito a sua morfologia, organização, função, replicação e quanto à sua variação e evolução”. A citogenética clássica, coloração convencional (Giemsa) e bandeamentos cromossômicos, permitem a caracterização dos cromossomos e pode ser utilizada para a comparação tanto entre espécies próximas filogeneticamente, quanto em espécies distantes filogeneticamente. A citogenética clássica fornece dados importantes sobre a evolução cromossômica das espécies, evidenciando as sinapomorfias utilizadas para a classificação (BED’HOM *et al.* 2003).

Entretanto em aves, apesar da sua grande diversidade estes estudos são minoria, no Brasil (1800 espécies) apenas 14% foram estudadas do ponto de vista citogenético e menos ainda apresentam dados de bandeamento cromossômicos (SANTOS & GUNSKI, 2006). Isso, provavelmente, deve-se a três motivos: a) apresenta, na maioria dos casos, um alto número diplóide, acima de 80 cromossomos; b) presença muitos microcromossomos, o que dificulta sua mensuração e manipulação, e c) dificuldade de amostragem de espécimes *in situ*.

As aves apresentam o cariótipo compostos 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 foi encontrado em uma espécie da ordem Charadriiformes (DE OLIVEIRA *et al.* 2005; NISHIDA *et al.* 2008; NIE *et al.* 2009). Por outro lado, cariótipos 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). O cromossomo W é bastante variável em tamanho e morfologia entre espécies de diferentes famílias. Entretanto o cromossomo Z é conservado em tamanho, mas a morfologia deste cromossomo é variável, devido a rearranjos intracromossomais que

são comuns para este cromossomo (NANDA & SCHMID, 2002). As aves, Paleornithes (ratitas), consideradas ancestrais que possuem os cromossomos sexuais Z e W idênticos morfológicamente e apresentam uma porção próxima ao centrômero diferente geneticamente (STIGLEC *et al.*, 2007). As Neornithes (carinatas) apresentam, geralmente, diferenças significativas de tamanho e morfologia entre os cromossomos sexuais (GUNSKI *et al.*, 2000; STIGLEC *et al.*, 2007; CORREIA *et al.*, 2009).

1.1 Características da família Picidae (Aves, Piciformes)

A família Picidae, popularmente conhecida como Pica-pau, faz parte da ordem Piciformes. São amplamente conhecidos pela sua extraordinária capacidade de perfurar vários tipos de madeira. Sua alimentação é baseada principalmente em larvas de insetos, mas também alimentam-se de frutas (WINKLER *et al.*, 1995). Vivem em bosques onde fazem seus ninhos abrindo uma cavidade nos troncos das árvores. Os ninhos são escavados em troncos de árvores o mais alto possível para proteção contra predadores. Os ovos, de 4 a 5, são chocados pela fêmea e também pelo macho durante 20 dias.

Colaptes campestris medem, em torno de, 32 cm, possui os lados da cabeça e do pescoço amarelos, assim como o peito, o alto da cabeça e a nuca são negros (DEVELEY & ENDRIGO, 2004) (Fig.1A). *Colaptes melanochloros* medem, cerca de, 28 cm. Sua plumagem tem tom esverdeado, Na cabeça, possuem divisão entre vermelho e preto, única entre os pica-paus, destaca a grande área branca da região dos olhos (DEVELEY & ENDRIGO, 2004) (Fig. 1B).

Os pica-paus possuem inúmeras sinapomorfias e morfologias definidas que o torna um clado de fácil identificação, porém sua classificação esta baseada em características de anatomia geral e técnicas de caça semelhantes, pelas características de plumagem e distribuição geográfica. Notadamente, no entanto, as relações filogenéticas entre as espécies e gêneros de pica-paus ainda não foram claramente estabelecidas (WEBB & MOORE, 2005).

Os dados citogenéticos em Picidae são escassos, apenas 15 espécies possuem descrição cariotípica (Tab. 1). Por tanto, até o momento não se encontram trabalhos com bandeamento cromossômico em espécies deste grupo, os quais são

necessários para melhor compreensão da evolução cariotípica e as relações filogenéticas entre as espécies de pica-paus.



Figura 1 - Ilustração dos animais utilizados no presente estudo *Colaptes campestris* (A) e *C. melanochloros* (B).
Fonte: adaptado Wikiaves.

Tabela 1 – Número diplóide e morfologia dos macrocromossomos de espécies de Picidae estudadas.

Espécies	2n	Cromossomos											Referência
		1	2	3	4	5	6	7	8	Z	W		
<i>Picus viridis</i>	94	M	T	T	ST	ST	T	T	T	A	A	A	Hammar, 1970
<i>Dinopium benghalense</i>	92	T	T	T	T	T	T	T	T	ST	ST	-	Kaul & Ansari, 1978
<i>Picoides mahrattensis</i> *	84	SM	SM	SM	SM	SM	SM	A	SM	ST	ST	SM	Kaul & Ansari, 1978
<i>Colaptes auratus</i>	90	M	T	M	T	T	T	T	T	ST	ST	ST	Shields et al., 1982
<i>Dendrocopos major</i>	108	SM	T	T	T	T	T	T	T	ST	ST	T	Shields et al., 1982
<i>Dendrocopos minor</i> *	108	M	T	T	T	T	T	T	T	M	M	M	Shields et al., 1982
<i>Dryocopus martius</i>	88	M	M	ST	T	ST	T	T	T	ST	ST	-	Shields et al., 1982
<i>Picoides pubescens</i>	92	T	T	M	T	T	T	T	T	SM	SM	ST	Shields et al., 1982
<i>Picoides villosus</i>	92	SM	T	T	T	T	T	T	T	M	M	T	Shields et al., 1982
<i>Sphyrapicus varius</i>	92	M	SM	M	SM	SM	SM	A	T	ST	ST	A	Shields et al., 1982
<i>Dendrocopos hyperythrus</i>	92	SM	T	T	T	T	T	T	T	ST	ST	T	Xiao-Zhuang & Qing-Wei, 1989
<i>Dendrocopos kizuki</i>	90	M	M	SM	M	SM	T	T	T	SM	SM	M	Xiao-Zhuang & Qing-Wei, 1989
<i>Dendrocopos leucotos</i>	92	SM	T	T	T	T	T	T	T	ST	ST	T	Xiao-Zhuang & Qing-Wei, 1989
<i>Jynx torquilla</i>	90	M	T	T	M	M	T	T	T	M	M	T	Xiao-Zhuang & Qing-Wei, 1989
<i>Picus canus</i>	92	M	T	T	T	T	T	T	T	ST	ST	SM	Xiao-Zhuang & Qing-Wei, 1989

* possui bandeamento C; 2n = número diplóide; M = metacêntrico; SM = submetacêntrico; ST = subtlocêntrico; T = telocêntrico; A = acrocêntrico

2 CAPÍTULO 1 - DESCRIÇÃO CARIOTÍPICA DE DUAS SUBESPÉCIES DO GÊNERO *COLAPTES*, FAMÍLIA *PICIDAE* (AVES, PICIFORMES)

Artigo para submissão na revista Comparative Cytogenetics

Descrição cariotípica de duas subespécies do gênero *Colaptes*, família *Picidae* (Aves, Piciformes)

Thays Duarte de Oliveira¹, Tiago Marafiga Degrandi¹, Ricardo José Gunski¹, Analía del Valle Garnero¹

¹Universidade Federal do Pampa Campus São Gabriel (UNIPAMPA), São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brasil.

2.1 Resumo

Os pica-paus representam cerca de 180 espécies divididas em 24 gêneros. *Colaptes* é um gênero típico das Américas, é composto por nove espécies, sendo que apenas três tem distribuição no Brasil. Estudos citogenéticos de aves e principalmente da família Picidae, ainda são escassos. Assim o presente trabalho teve como objetivo analisar e comparar o cariótipo de duas subespécies da família Picidae, *Colaptes campestris campestroides* e *C. melanochloros melanolaimus*. Foram coletados com redes de neblina 3 exemplares de *C. campestris campestroides* (1 machos e 2 fêmea), e 5 exemplares fêmeas de *C. melanochloros melanolaimus*, na província de Misiones, Argentina e no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. As metáfases foram obtidas através da cultura direta de medula óssea e cultura de fibroblastos. Através da técnica convencional de coloração por Giemsa verificou-se um número diplóide de 84 cromossomos para ambas subespécies, o cariótipo está composto por cerca de 14 pares de macrocromossomos, o primeiro par metacêntrico, o segundo, terceiro e o quinto são submetacêntricos, o quarto, sexto ao décimo acrocêntricos, os demais cromossomos autossômicos são telocêntricos incluindo os cromossomos sexuais Z e W, e cerca de 28 pares de microcromossomos telocêntricos. Entre os cromossomos sexuais foram observados diferenças em tamanho, sendo o cromossomo Z o maior acrocêntrico do complemento e o cromossomo W identificado como acrocêntrico com tamanho entre o 6^o e 7^o par para ambas as subespécies. A heterocromatina constitutiva, identificada com DAPI (4',6-Diamidino-

2-Phenylindole, Dihydrochloride), mostrou-se presente na região centromérica da maioria dos cromossomos inclusive o Z. O cromossomo W apresentou-se totalmente heterocromático nas duas subespécies. A região organizadora de nucléolo foi evidenciada na região telomérica de um par cromossômico, identificado como um cromossomo telocêntrico correspondendo ao 13^o par no cariótipo, característico por apresentar uma constrição secundária. Os resultados demonstram que em ambas as subespécies a evolução cromossômica parece estar relacionada a eventos raros e de pouca complexidade, confirmando sua aparente estabilidade cariotípica nesse grupo postulada em estudos convencionais.

Palavras chaves: Cromossomo. Bandeamento cromossômico. Pica-pau.

2.2 Introdução

A classe Aves inclui aproximadamente 9600 espécies e é reconhecida como o segundo grupo de vertebrados superiores com maior diversidade de espécies (NIE et al., 2009). Apesar das relações filogenéticas das Aves serem bem estudadas, pouco se sabe sobre o genoma e o complemento cromossômico das espécies desta classe (SANTOS & GUNSKI, 2006).

O cariótipo das Aves caracteriza-se pelo alto número diplóide (aproximadamente 80 cromossomos), sendo cerca de 10 pares de macrocromossomos e um elevado número de microcromossomos. (CHRISTIDIS, 1990). Porém encontra-se cariótipos atípicos tanto com alto, como com baixo número diplóide. Entre essas exceções, encontra-se espécies da Ordem Piciformes que apresentam um alto número diploides (CASTRO et al. 2002), e com baixo número diplóide encontram-se espécies da Ordem Falconiformes e Charadriiformes (DE OLIVEIRA et al., 2005; NISHIDA et al., 2008; NIE et al., 2009)

Colaptes campestris campestris e *Colaptes melanochloros melanolaimus* pertencem a família Picidae. Desta família apenas 15 espécies possuem descrição cariotípica, sendo que nenhuma delas tem distribuição no Brasil. Entre essas espécies, verifica-se variabilidade no número diplóide entre $2n=84$ cromossomos para *Picoides mahrattensis* a $2n=108$ para *Dendrocopos minor* e *Dendrocopos major*, assim como a variações morfológicas e de tamanho tanto nos autossomos quanto nos cromossomos sexuais (KAUL & ANSARI, 1978; SHIELDS et al., 1982).

O estudo citogenético auxilia no estabelecimento das relações cariotípicas entre as várias espécies em estudo, revela informações sobre a evolução cromossômica das espécies, auxiliando nas relações filogenéticas destas espécies. Com este intuito e também para contribuir com estudos citogenéticos de espécies da família Picidae, este trabalho teve como objetivo descrever e analisar o cariótipo de duas subespécies do gênero *Colaptes*, *C. campestris campestris* e *C. melanochloros melanolaimus*.

2.3 Material e métodos

2.3.1 Coleta das amostras

Para a captura dos animais foram utilizadas redes ornitológicas tipo *mist net* abertas ao amanhecer até o cair da noite, correspondendo ao horário de maior atividade das aves. Foram estudadas três exemplares (1 macho e 2 fêmeas) de *C. campestris campestroides*, e cinco exemplares fêmeas de *C. melanochloros melanolaimus*, na província de Misiones, Argentina e no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Tab. 1). As coletas no Brasil foram realizadas conforme licença do SISBIO sob número de registro 33860-1, código 18127894 data 08/06/2012.

Tabela 2 – Exemplares analisados por espécies, sexo, local de coleta e número de adesão.

Espécimes	Local	Sexo		Nº de adesão
		M	F	
<i>C. campestris campestroides</i>	Dom Pedrito		x	DP131
<i>C. campestris campestroides</i>	Sta. Ana e Candelaria		x	11.621
<i>C. campestris campestroides</i>	Sta. Ana e Candelaria	x		11.625
<i>C. melanochloros melanolaimus</i>	Dom Pedrito		x	DP114
<i>C. melanochloros melanolaimus</i>	Dom Pedrito		x	DP155
<i>C. melanochloros melanolaimus</i>	Dom Pedrito		x	DP156
<i>C. melanochloros melanolaimus</i>	São Gabriel		x	SG126
<i>C. melanochloros melanolaimus</i>	São Gabriel		x	SG128

2.3.2 Obtenção de metáfases

As preparações cromossômicas foram realizadas de duas formas. Técnica de cultura de medula óssea de curta duração segundo Garner & Gunski (2000), onde a medula óssea foi desagregar em 10 ml de solução de Hank's, juntamente com 0.1 mL de colchicina 0.05% e incubada a 37°C por 1 hora. E cultura de fibroblastos de acordo com Itoh & Arnold (2005), em que a pele é esterilizada com etanol 70%, tratada com colagenase 0,5% e mantidas em meio (MEM) suplementado com 36.7 mmol/L glucose, 10% soro fetal bovino, 2% soro fetal de galinha, e antibióticos (100

U/mL penicilina, 100 mg/mL estreptomicina) em garrafas de cultura com 10cm de diâmetro a 37°C, mudando o meio de cultura a cada dois dias. Independentemente da metodologia utilizada a amostra foi lavada e fixada com metanol e ácido acético (3:1).

2.3.3 Análises cromossômicas

2.3.3.1 Determinação do número diplóide

Para determinação do número diplóide, foram produzidas laminas com coloração convencional Giemsa. De cada exemplar foram observadas aproximadamente 40 metáfases, para contagem e análises morfológicas de cada par cromossômico. Estas foram fotografadas para montagem do cariótipo de acordo com Guerra & Souza (2002). O cariótipo foi montado utilizando ferramentas do *software* Corel X6 e para a biometria dos cromossomos foi utilizado o *software* *Micromeasure* 3.3, para mensuração do tamanho dos braços longos e curtos e determinação do índice centromérico e morfologia dos macrocromossomos.

2.3.3.2 Bandeamento C

Para a identificação das regiões ricas em heterocromatina constitutiva as lâminas foram envelhecidas por 48 horas a 65 °C e o bandeamento C foi obtido utilizando a desnaturação na presença de formamida e contra corado com DAPI de acordo com Fernández *et al.* (2002) (ANEXO I).

2.3.3.3 Bandeamento NOR

Os cromossomos portadores das regiões organizadoras do nucléolo foram identificados de acordo com os procedimentos de Howell & Black (1980)(ANEXO II),

com a técnica de impregnação com nitrato de prata. Para isso, lâminas foram preparadas e analisadas em coloração sequencial, Giemsa-bandeamento NOR.

2.4 Resultados

2.4.1 Descrição cariotípica

O número diplóide observado para *C. campestris campestroides* e para *C. melanochloros melanolaimus* foi $2n = 84$ cromossomos. Sendo o primeiro par metacêntrico, o segundo, terceiro e o quinto são submetacêntricos, o quarto, sexto ao décimo acrocêntricos, os demais cromossomos autossômicos são telocêntricos (Tab. 3). Os cromossomos sexuais Z e W possuem morfologia acrocêntrica, mas com diferenças significativas de tamanho. O cromossomo Z, em ambas subespécies é o maior do complemento cariotípico e o W de tamanho intermediário entre o sexto e o sétimo par (Fig. 1 A-B).

2.4.2 Bandejamento C

Com a realização do bandejamento cromossômico C, foram observadas marcações de heterocromatina constitutiva centromérica para os macrocromossomos e em alguns microcromossomos. Para o cromossomo Z, maior do complemento, foi observado marcação na região centromérica. O cromossomo W foi observado completamente heterocromático em ambas as subespécies (Fig. 2 A-B).

2.4.3 Bandejamento NOR

Com o bandejamento NOR foi observado em ambas subespécies apenas um par cromossômico portador das sequências ribossomais organizadoras do nucléolo,

localizado em um par de cromossomos telocêntricos característicos por apresentarem uma constrição secundária (Fig. 3 A-B).

Tabela 3- Biometria dos macrocromossomos e cromossomos sexuais de *C. campestris campestris* e *C. melanochloros melanolaimus*.

Cromossomo	<i>C. campestris campestris</i>				<i>C. melanochloros melanolaimus</i>			
	Braço longo	Braço curto	Índice centromérico	Morfologia	Braço longo	Braço curto	Índice centromérico	Morfologia
1	1,77	1,25	0,42	M	1,72	1,18	0,41	M
2	1,59	0,96	0,38	SM	1,62	0,97	0,37	SM
3	1,60	0,53	0,25	SM	1,70	0,73	0,30	SM
4	1,79	0,15	0,08	A	1,71	0,17	0,09	A
5	1,14	0,55	0,33	SM	1,13	0,75	0,40	SM
6	1,47	0,15	0,09	A	1,61	0,14	0,08	A
7	1,26	0,17	0,12	A	1,38	0,14	0,09	A
8	1,37	0,09	0,06	A	1,47	0,10	0,06	A
9	1,09	0,10	0,08	A	1,17	0,10	0,08	A
10	1,15	0,13	0,10	A	1,26	0,10	0,07	A
11	1,30	0,00	0,00	T	1,34	0,00	0,00	T
12	1,10	0,00	0,00	T	1,16	0,00	0,00	T
13	1,15	0,00	0,00	T	0,83	0,00	0,00	T
Z	2,43	0,59	0,20	A	2,45	0,69	0,22	A
W	1,43	0,21	0,13	A	1,33	0,17	0,11	A

M = metacêntrico, SM = submetacêntrico, A = acrocêntrico, T = telocêntrico

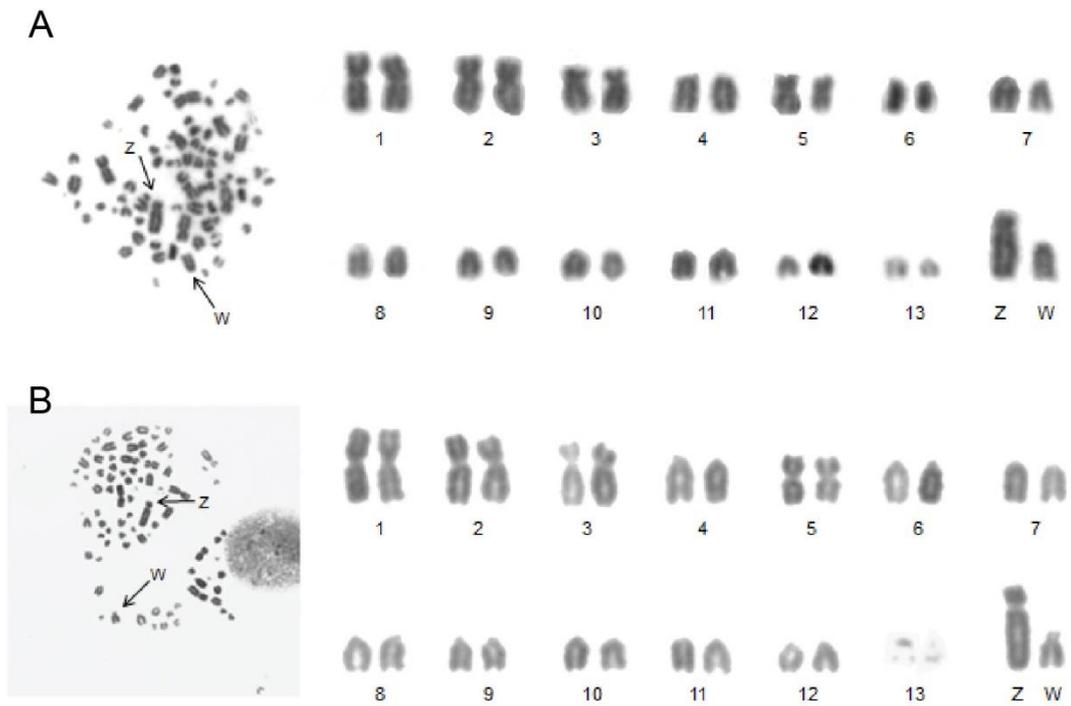


Figura 2 – Metáfase e cariótipo parcial de indivíduos fêmeas de *C. campestris campestris* (2n=84) (A) e de *C. melanochloros malanolaimus* (2n=84)(B), com coloração convencional (Giemsa).

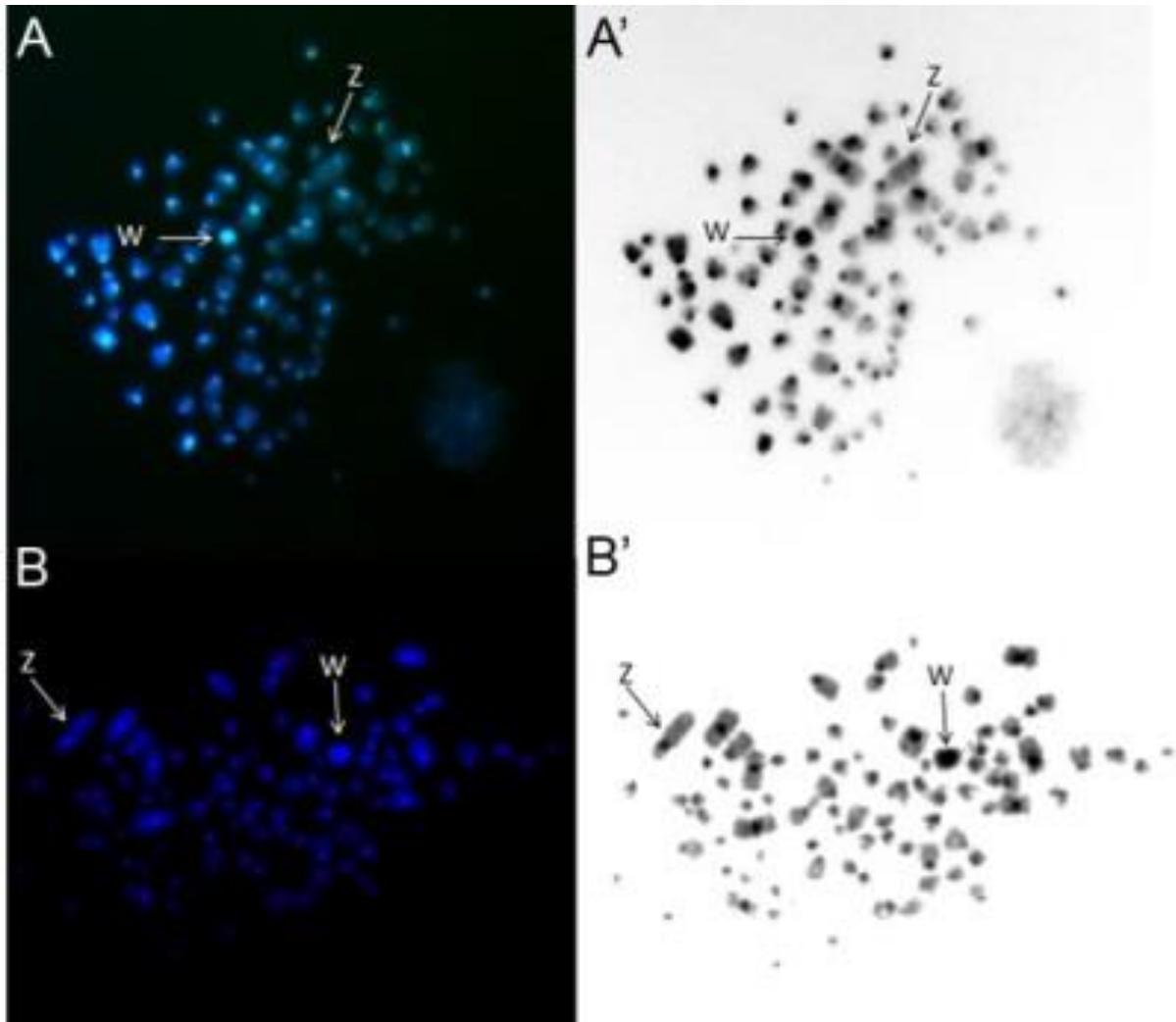


Figura 3 - Bandeamento C de um indivíduo fêmea de *C. campestris campestroides* (A -A') e de um indivíduo fêmea de *C. melanochloros melanolaimus* (B -B'). As setas indicam os cromossomos sexuais Z e W.

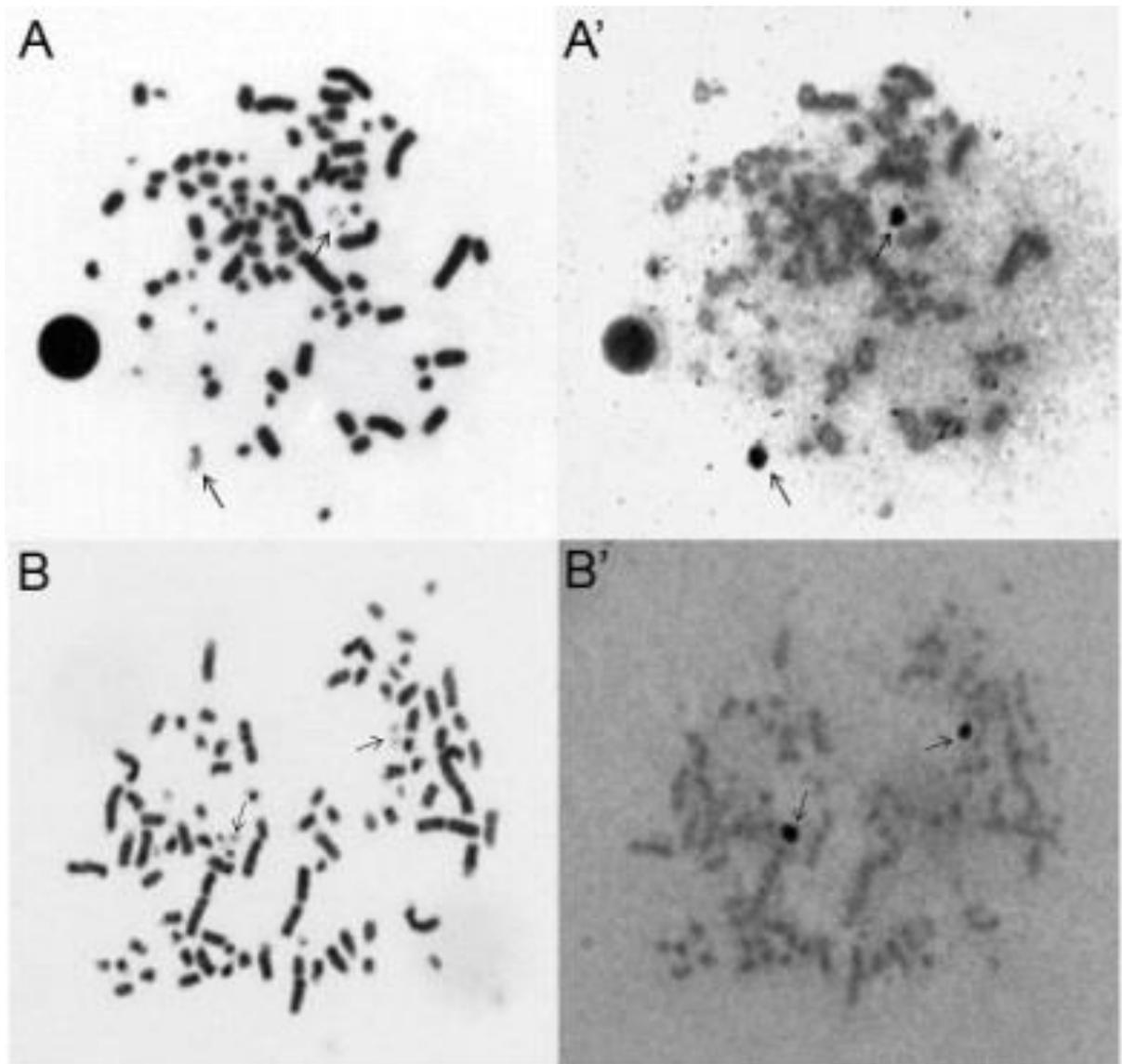


Figura 4 - Análise sequencial Giemsa e banda NOR de um indivíduo fêmea de *C. campestris campestroides* (A-A', respectivamente) e de um indivíduo fêmea de *C. melanochloros melanolaimus* (B-B', respectivamente). As setas indicam o par cromossômico portador da região organizadora de nucléolo (NOR).

2.5 Discussão

Este trabalho apresenta pela primeira vez os cariótipos das subespécies de *C. campestris campestroides* e *C. melanochloros melanolaimus*. As duas espécies são fenotipicamente diferentes, apesar disso, os resultados sugerem que o número diplóide e a morfologia dos cromossomos de ambas são idênticos. O mesmo acontece em Procellariiformes, onde as duas espécies, *Macronectes giganteus* e *Daption capense*, que possuem grandes diferenças fenotípicas e compartilham o mesmo número cromossômico e alta homologia cromossômica (GARNERO *et al.*, 2013).

As duas subespécies apresentam um grande número de microcromossomos e poucos pares de macrocromossomos. Em ambas as subespécies o cromossomo sexual Z, apresentou-se como o maior do complemento cromossômico, este resultado corrobora os resultados apresentados em outras espécies da ordem Piciformes (HAMMAR, 1970; KAUL & ANSARI, 1978; XIAO-ZHUANG & QING-WEI, 1989; SHIELDS *et al.*, 1982; CASTRO *et al.*, 2002; GOLDSCHMIT *et al.*, 2006).

Embora o tamanho do cromossomo Z seja geralmente uniforme a posição do centrômero não é, contudo as espécies aqui descritas apresentam a mesma posição do centrômero. Diferente do que é encontrado em outras espécies do mesmo gênero como *Picoides villosus* e *P. pubescens*, como em *Dendrocopos minor* e *D. major*, o cromossomo Z tem diferentes morfologias. Contudo não condiz com a alta conservação desse cromossomo na classe Aves, apresentando tamanho equivalente ao 4^o e 5^o par autossômico (NANDA & SCHMID, 2002).

O cromossomo W foi identificado como acrocêntrico com tamanho intermediário entre o 6^o e 7^o par para ambas as subespécies, na família Picidae foi relatado em outras espécies (*D. minor*, *C. auratus* e *P. villosus*, *P. pubescens*) o cromossomo W mostrando amplamente notável (SHIELDS *et al.*, 1982).

A heterocromatina constitutiva tanto em *C. campestris campestroides* quanto em *C. melanochloros melanolaimus* está localizada principalmente na região centromérica dos macrocromossomos e em alguns microcromossomos. Este tipo de padrão heterocromático é possível encontrar em todos os grupos de aves, desde as

Rheiformes, *Rhea americana* (GUNSKI & GIANNONI) até os Passeriformes, *Turdus rufiventris* e *Turdus albicollis* (KRETSCHMER *et al.* 2014). Ainda assim existem exceções como em *Pheucticus aureoventris* que foi observado marcações pericentromérica e intersticial (LEDESMA *et al.* 2006) e *Ramphocelu scarbo* marcações na região pericentromérica (CORREIA *et al.* 2009).

Em ambas as subespécies aqui estudadas as regiões organizadoras de nucléolo localizaram-se em um par de microcromossomos, que apresentam uma constrição secundária abaixo do centrómero como demonstrado pela análise sequencial Giemsa- NOR. O mesmo padrão é similar ao apresentado por outras espécies de Paleornithes, como *Rhea americana* (GUNSKI & GIANNONI, 1998), *Crypturellus tataupa*, *Tinamus solitarius* (GARNERO *et al.*, 2006), *Pterocnemia pennatae*, *Eudromia elegans* (NISHIDA-UMEHARA *et al.*, 2007) e na maioria das espécies Neornithes.

Em conclusão, os resultados mostram similaridade no número diplóide e na morfologia cromossômica entre as duas subespécies da família Picidae. Os dados aqui apresentados representam um passo inicial para o entendimento da evolução cariotípica da família Picidae. Por tanto, novos aportes para essa família serão necessárias para um correto entendimento das diferentes estratégias evolutivas, tanto utilizando citogenética clássica em outras espécies desta família, quanto abordagem de citogenética molecular, para identificação dos rearranjos cromossômicos.

2.6 Agradecimentos

Agradecemos ao Grupo de pesquisa “Diversidade Genética Animal” da Universidade Federal do Pampa e a Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPESQ-UNIPAMPA) pela bolsa concedida e pelo aporte financeiro.

2.7 Referências bibliográficas

CASTRO, M. S.; RECCO-PIMENTEL, S. M.; ROCHA, G. T. Karyotypic characterization of Ramphastidae (Piciformes, Aves). *Genetics and Molecular Biology*, v. 25, n. 2, p. 147-150, 2002.

CHRISTIDIS, L. Aves. In: John B, Kayano H, Levan A (eds) *Animal Cytogenetics*, v. 4, Chordata 3. GebruderBorntraeger, Berlin. 1990.

CORREIA, V. C. S.; GARNERO, A. D. V.; SANTOS, P. S.; SILVA, R. R.; BARBOSA, H. L. B.; GUNSKI, R. J. Alta similaridade Cariotípica na Família Emberezidade (Aves: Passeriformes). *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 25, n.2, p. 99-111, Mar./Apr. 2009.

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, *Harpiaharpyja*) compared to that of the chicken (*Gallus gallus*). *Chromosoma*, v.114,p. 338-343, 2005.

FERNÁNDEZ, R.; BARRAGÁN, M. J.; BULLEJOS, M.; MARCHAL, J. A.; DÍAZ DE LA GUARDIA, R.; SANCHEZ. A. New C-band protocol by heat denaturation in the presence of formamide. *Hereditas*, v. 137, n.2, p. 145-148, 2002.

GARNERO, A. D. V. & GUNSKI, R. J. Comparative analysis of the Karyotypes of *Nothuramaculosa* and *Rynchotusrufescens* (Aves: Tinamidae). A case of chromosomal polymorphism. *The nucleus*, v. 43, p. 64-70, 2000.

GARNERO, A. D. V.; LEDESMA, M. A.; GUNSKI, R. J. Alta homeologiacariotípica na Família Tinamidae (Aves: Tinamiformes). *Revista Brasileira de Ornitologia*, v. 14, p. 53-58, 2006.

GARNERO, A. D. V.; BOCCELLI, M.; OLIVEIRA, J.C.P.; LEDESMA, M.A., MONTALTI, D., CORIA, N.; GUNSKI R.J. Chromosomal characterization of four Antarctic Procellariiformes. *Marine Ornithology* v. 41, p. 63–68, 2013.

GOLDSCHMIDT, B.; NOGUEIRA, D. M.; MONSORES, D. W. Cytogenetic study in three species of toucans (*Ramphastostoco*, *Ramphastosvitellinus* and *Ramphostodicolorus*). *Archivos de zootecnia*, v. 45, n.170-171, p.294, 2006.

GUERRA, M. & SOUZA, M. J. Como observar cromossomos. Ribeirão Preto: Ed. Funpec, p. 131, 2002.

GUNSKI, R. J. & GIANNONI, M. L. Nucleolar organizer regions and a new chromosome number for *Rhea americana* (Aves: Rheiformes). *Genetic Mol Biol.*, v. 21, n. 2, p. 207-210, 1998.

HAMMAR, B. The karyotypes of thirty-one birds. *Hereditas*, v. 65, p. 29-58, 1970.

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.

ITOH, Y. & ARNOLD, A. P. Chromosomal polymorphism and comparative painting analysis in the *Zebra finch*. *Chromosome Research*, v. 13, p. 47–56, 2005.

KAUL, D. & ANSARI, H. Chromosome studies in three species of Piciformes (Aves). *Genetica*, v. 48, n. 3, p. 193-196, 1978.

KRETSCHMER, R.; GUNSKI, R.J.; GARNERO, A.D.V.; FURO, I.D.O.; O'BRIEN, P.C.M.; FERGUSON-SMITH, M. A.; DE OLIVEIRA, E. H. C. Molecular cytogenetic characterization of multiple intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus *Turdus* (Turdidae, Passeriformes). *PLoS ONE* 9(7): e103338. doi:10.1371/journal.pone.0103338, 2014.

LEDESMA, M. A.; MARTÍNEZ, P. A.; CALDERÓN, P. S.; BOERIS, J. M.; MERILES, J. M. Descrição do cariótipo e padrões de bandas C e NOR em *Pheucticus aureoventris* (Emberizidae, Cardinalinae). *Revista Brasileira de Ornitologia*. 2006, v. 14, n. 1, p. 59-62.

NANDA, I. & SCHMID, M. Conservation of avian Z chromosomes as revealed by comparative mapping of the Z-linked aldolase B gene. *Cytogenet Genome res* v. 96, p. 176-178, 2002.

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*, v. 17, p. 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* v. 15, p. 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* v. 15, p. 171 -181, 2008.

SANTOS, L. P. & GUNSKI, R. J. Revisão de dados citogenéticos sobre a Avifauna brasileira. *Revista Brasileira de Ornitologia*, v. 14, n. 1, p.35-45, 2006.

SHIELDS, G.F.; JARRELL, G.H.; REDRUPP, E. Enlarged sex chromosomes of woodpeckers (Piciformes). *The Auk* v. 99, n. 4, p. 767-771, 1982.

STIGLEC, R.; EZAZ, T.; GRAVES, J. A. M. A new look at the evolution of avian sex chromosomes. *Cytogenetic Genome Research* v. 117, p. 103-109, 2007.

XIAO-ZHUANG, B. & QING-WEI, L. Studies on The Karyotypes of Birds V. The 20 species of Climber birds.(Aves). *Zoological research*, v. 10, n. 4, p. 303-308, 1989

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise de citogenética clássica em *C. campestris campestroides* e *C. melanochloros melanolaimus* permitiu concluir que ambas apresentam um cariótipo típico de aves, alto número diplóide, com alto número de microcromossomos e baixo número de macrocromossomos.

O cromossomo sexual Z é o maior do complemento, comum entre os membros da Ordem Piciformes. E o cromossomo W é maior do que o encontrado em outras aves, possivelmente este fato deve-se à fusão de regiões heterocromáticas obtidos de partes de outros cromossomos ou de pequenos cromossomos heterocromáticos.

O décimo terceiro par cromossômico que possui uma constrição secundária está associada a região organizadora de nucléolo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BED'HOM, B.; COULLIN, P; GUILLIER-GENCİK, 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*. v.11, p.335-343, 2003

CASTRO, M. S., RECCO-PIMENTEL, S. M.; ROCHA, G. T. Karyotypic characterization of Ramphastidae (Piciformes, Aves). *Genetics and Molecular Biology*, v. 25, n. 2, p. 147-150, 2002.

CHRISTIDIS, L. Aves. In: John B, Kayano H, Levan A (eds) *Animal Cytogenetics*, v. 4, Chordata 3. GebruderBorntraeger, Berlin. 1990.

CORREIA, V. C. S.; GARNERO, A. D. V.; SANTOS, P. S.; SILVA, R. R.; BARBOSA, H. L. B.; GUNSKI, R. J. Alta similaridade Cariotípica na Família Emberezidade (Aves: Passeriformes). *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 25, n.2, p. 99-111, Mar./Apr. 2009.

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, *Harpiaharpyja*) compared to that of the chicken (*Gallus gallus*). *Chromosoma*, v. 114, p. 338-343, 2005.

DEVELEY, P. F. & ENDRIGO, E. *Guia de campo: aves da Grande São Paulo*. São Paulo: Aves e Fotos Editora. p. 298, 2004.

GUERRA, M. *Introdução a citogenética geral*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, p. 142, 1988.

GUNSKI, R.J.; CABANNE, G.S.; LEDESMA, M.A.; GARNERO, A. D. V. Análisis cariotípico de siete especies de Tiránidos (Tyrannidae). *Hornero*, v. 15, p.103-109, 2000.

HAMMAR, B. The karyotypes of thirty-one birds. *Hereditas*, v. 65, p. 29-58, 1970.

KAUL, D. & ANSARI, H. Chromosome studies in three species of Piciformes (Aves). *Genetica*, v. 48 n. 3, p. 193-196, 1978.

NANDA, I. & SCHMID, M; Conservation of avian Z chromosomes as revealed by comparative mapping of the Z-linked aldolase B gene. *Cytogenet Genome res* v. 96, p. 176-178, 2002.

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 (*Burhinusoediceus*, Charadriiformes) - An atypical species with low diploid number, *Chromosome Research*, v. 17, p. 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*, v. 15, p. 171 -181, 2008.

SANTOS, L. P.& GUNSKI, R. J. Revisão de dados citogenéticos sobre a Avifauna brasileira. *Revista Brasileira de Ornitologia*, v. 14, n. 1, p.35-45, 2006.

SHIELDS, G.F.; JARRELL, G.H.; REDRUPP, E. Enlarged sex chromosomes of woodpeckers (Piciformes). *The Auk*, v. 99, n. 4; p. 767-771, 1982.

STIGLEC, R.; EZAZ, T.; GRAVES, J.A.M. A new look at the evolution of avian sex chromosomes. *Cytogenetic Genome Research*, v. 117, p. 103-109, 2007.

WEBB, D.M. & MOORE, W.S. A phylogenetic analysis of woodpeckers and their allies using 12S, Cyt b, and COI nucleotide sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 36, p. 233–248, 2005.

WINKLER, H.; CHRISTIE, D.A.; NURNEY, D. *Woodpeckers: an identification guide to the woodpeckers of the world*. Boston: Houghton Mifflin Company. 1995.

XIAO-ZHUANG, B. & QING-WEI, L. Studies on The Karyotypes of Birds V. The 20 species of Climber birds.(Aves). *zoological research*, v. 10, n. 4, p. 303-308, 1989.

ANEXO I
Protocolo banda C segundo Fernández *et al.* (2002)

- Preparar jarras de coplin com 2x SSC, etanol 70%, 90%, 100% todos a temperatura ambiente
- Submergir a lâmina em 2xSSC por 2 minutos
- Logo por etanol 70% por 2 minutos
- Etanol 90% e 100% por 2 minutos cada
- Secar
- Preparar Formamida 70% e esquentar a 74°C, medir a temperatura dentro da jarra, deve estar a 74°C
- Por a lâmina na formamida por 4 minutos
- Desidratas com séries de etanol 70% a – 20°C e 90% e 100% a temperatura ambiente por 1 minuto
- Corar com DAPI (20 microlitros de DAPI na lamínula)
- Analisar em microscópio de fluorescência.

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 incolor diluída em 50 mL de água destilada e 25 gotas de ácido fórmico) sobre a lâmina;
- Gotejar duas gotas de Nitrato de Prata (50%) em cada gota de solução coloidal;
- Cobrir a lâmina com uma lamínula;
- Incubar a lâmina em câmara úmida a 60°C até que atinja um tom caramelo;
- Lavar em água destilada;
- Analisar em microscópio ótico.