



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

**MAPEAMENTO GENÔMICO DE SEQUÊNCIAS REPETITIVAS EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA  
FURNARIIDAE (AVES): UM ENFOQUE CITOGENÉTICO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**VICTORIA TURA**

**São Gabriel  
2023**

**VICTORIA TURA**

**MAPEAMENTO GENÔMICO DE SEQUÊNCIAS REPETITIVAS EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA  
FURNARIIDAE (AVES): UM ENFOQUE CITOGENÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Analía del Valle Garnero

**São Gabriel  
2023**

V645m Tura, Victoria.

Mapeamento genômico de sequências repetitivas em espécies da família Furnariidae (Aves): um enfoque citogenético/Victoria Tura - São Gabriel, 27/10/2023. Xp

Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Pampa, 2023.

Orientação: Analía del Valle Garnero

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, 27/10/2023.

1. Aves. 2. Cariótipo. 3. Sequências repetitivas. 4. Cromossomos.

VICTORIA TURA

**MAPEAMENTO GENÔMICO DE SEQUÊNCIAS REPETITIVAS EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA  
FURNARIIDAE (AVES): UM ENFOQUE CITOGENÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Genética

Dissertação defendida e aprovada em: 27 de Outubro de 2023  
Banca examinadora:

---

Prof. Dra. Analía del Valle Garnero  
Orientador  
(UNIPAMPA)

---

Prof. Dr. Ricardo José Gunski  
(UNIPAMPA)

---

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira  
(UFPA)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à minha família, que em todos os momentos me apoiou e me incentivou incansavelmente. Aos meus pais e avós, obrigada pela paciência e suporte de sempre.

Aos meus melhores amigos que fiz durante a graduação, obrigada por tudo.

Ao Mateus, pelo companheirismo, paciência e amor durante esse período.

Aos meus colegas de laboratório e amigos de vida, Suzi, Marcelo e Vitor, obrigada pelo companheirismo e por todos os momentos da minha graduação, vocês são uma fonte de inspiração como pessoas e profissionais.

Agradeço à minha orientadora, professora Dra. Analía del Valle Garnero e ao professor Dr. Ricardo José Gunski por sempre me mostrarem o caminho seguro e correto, vocês são minhas maiores inspirações profissionais e pessoais, e se tornaram minha segunda família. Obrigada por tudo, e, principalmente pelo incentivo para que seguisse a carreira acadêmica.

Ao Professor Fabiano pelos conselhos, ensinamentos e incentivo.

Ao professor Dr. Rafael Kretschmer pelos ensinamentos e sugestões que elevaram meu conhecimento a respeito de citogenética.

Agradeço incansavelmente aos membros docentes e discentes do Laboratório de Diversidade Genética Animal (UNIPAMPA), que por todos esses anos me apoiaram e me ajudaram sempre.

Ao professor Dr. Marcelo de Bello Cioffi e aos membros do Laboratório de Citogenética de Peixes (UFSCar) por me receberem de braços abertos e enriquecer meus conhecimentos e carreira profissional.

Por fim, a todos que participaram e contribuíram, direta ou indiretamente, no desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.

## RESUMO

A família Furnariidae, conhecida como furnarídeos, é uma das famílias mais diversas dentro da ordem Passeriformes, mas a pesquisa em citogenética ainda está em estágios iniciais, limitando nosso entendimento sobre a evolução de seus cariótipos. Análises citogenéticas tradicionais e moleculares foram realizadas em diversas espécies representativas desta família, incluindo *Synallaxis frontalis*, *Syndactyla rufosuperciliata*, *Cranioleuca obsoleta*, *Heliobletus contaminatus* e *Anumbius annumbi*. No capítulo 1, os resultados dessas análises revelaram que todas as espécies estudadas possuem o mesmo número diplóide ( $2n = 82$ ), mas diferenças na morfologia cromossômica sugerem a presença de rearranjos intracromossômicos. Além disso, o mapeamento de sequências repetitivas revelou padrões variados de distribuição cromossômica, indicando acumulação diferente de DNA repetitivo após a divergência entre as espécies. A hibridização genômica comparativa interespecífica demonstrou a conservação do cariótipo da família Furnariidae, embora a espécie de grupo externo *Turdus rufiventris* tenha mostrado uma divergência mais avançada de sequências. No capítulo 2, foi feita a descrição da espécie *Heliobletus contaminatus* ( $2n = 82$ ), que possui características morfológicas semelhantes a outras espécies relacionadas. Algumas diferenças na morfologia cromossômica indicam rearranjos intracromossômicos. Além disso, a espécie apresenta diferenças na distribuição de heterocromatina em comparação com outras espécies estudadas de furnarídeos. O mapeamento de sequências repetitivas mostra padrões variáveis, incluindo marcações nos cromossomos macro e microcromossomos, bem como nos cromossomos sexuais Z e W. A presença de sequências 18S rDNA em um par de microcromossomos sugere que essa configuração pode representar o estado ancestral das aves. A partir da Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) foram detectadas sequências teloméricas em locais intersticiais dos macrocromossomos, sugerindo fusões cromossômicas passadas e eventos de rearranjos cromossômicos durante a evolução do trepadorzinho. No geral, os resultados apontam que essa espécie de Furnariidae tem um alto grau de conservação, mas com possíveis fusões cromossômicas. No 3º e último capítulo, um estudo adicional sobre o cariótipo de *Anumbius annumbi* ( $2n = 82$ ) revelou um cariótipo conservado, mas com uma peculiaridade, um cromossomo Z grande e maior do que todos os outros do complemento, algo incomum em Passeriformes. Sequências de microssatélites foram encontradas distribuídas nos cromossomos do cochicho (*A. annumbi*), algumas acumuladas no cromossomo Z. Esses resultados indicam um alto grau de conservação cromossômica em relação aos números diploides das espécies de Furnariidae, mas também evidenciam diferenças na distribuição de sequências repetitivas e rearranjos cromossômicos. Esta

característica peculiar do cromossomo Z grande em uma das espécies de Furnariidae (*Anumbius annumbi*), estabelece um questionamento sobre um tópico na pesquisa em citogenética de aves. Até então, acreditava-se que os Passeriformes apresentavam um alto grau de conservação em seus cariótipos, principalmente o cromossomo Z. No entanto, o fato aqui evidenciado desafia essa visão estabelecida, sugerindo que ainda há muito o que explorar sobre a diversidade cromossômica nesta ordem. É possível que outras espécies de passeriformes e aves em geral possam também apresentar características cromossômicas singulares que ainda não foram documentadas devido à falta de estudos abrangentes. Portanto, a aparente conservação do cariótipo de Furnariidae pode ser, em parte, resultado da escassez de espécies estudadas em profundidade. Dessa forma, essas pesquisas contribuem significativamente para o entendimento da evolução cromossômica e genômica das aves, especialmente dentro da família Furnariidae e na ordem Passeriformes.

## ABSTRACT

The family Furnariidae, known as ovenbirds, is one of the most diverse families within the order Passeriformes, but cytogenetic research is still in its early stages, limiting our understanding of the evolution of their karyotypes. Traditional and molecular cytogenetic analyses have been conducted on several representative species of this family, including *Synallaxis frontalis*, *Syndactyla rufosuperciliata*, *Cranioleuca obsoleta*, *Heliobletus contaminatus*, and *Anumbius annumbi*. In Chapter 1, the results of these analyses revealed that all the studied species have the same diploid number ( $2n = 82$ ), but differences in chromosomal morphology suggest the presence of intrachromosomal rearrangements. Furthermore, the mapping of repetitive sequences revealed varied patterns of chromosomal distribution, indicating differential accumulation of repetitive DNA after species divergence. Inter-specific comparative genomic hybridization demonstrated the conservation of the karyotype in the Furnariidae family, although the outgroup species *Turdus rufiventris* showed more advanced sequence divergence. In Chapter 2, the species *Heliobletus contaminatus* ( $2n = 82$ ) was described, which possesses morphological characteristics similar to other related species. Some differences in chromosomal morphology indicate intrachromosomal rearrangements. Additionally, the species exhibits differences in heterochromatin distribution compared to other studied ovenbirds. The mapping of repetitive sequences shows variable patterns, including markings on macro and microchromosomes, as well as on the Z and W sex chromosomes. The presence of 18S rDNA sequences on a pair of microchromosomes suggests that this configuration may represent the ancestral state of birds. Through Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH), telomeric sequences were detected in interstitial locations on macrochromosomes, suggesting past chromosomal fusions and rearrangement events during the evolution of this species. In the third and final chapter, further study of the karyotype of *A. annumbi* ( $2n = 82$ ) revealed a conserved karyotype but with a peculiarity: a large Z chromosome larger than all other chromosomes in the complement, which is unusual in Passeriformes. Microsatellite sequences were found distributed on the chromosomes of *Anumbius annumbi*, some of which were accumulated on the Z chromosome. These results indicate a high degree of chromosomal conservation in diploid number of Furnariidae species but also highlight differences in the distribution of repetitive sequences and chromosomal rearrangements. This unique feature of the large Z chromosome in one of the Furnariidae species (*Anumbius annumbi*) challenges the established view that Passeriformes have a high degree of karyotype conservation, particularly with respect to the Z chromosome.

Therefore, the apparent karyotype conservation in Furnariidae may, in part, result from the limited number of species studied in depth. Thus, this research significantly contributes to our understanding of the chromosomal and genomic evolution of birds, especially within the Furnariidae family and the Passeriformes order.

## LISTA DE FIGURAS

### 3. Referencial Teórico

- Figura 1 - Espécies da família Furnariidae (Passeriformes, Aves): a) *Synallaxis frontalis*; b) *Anumbius annumbi*; c) *Pseudoseisura lophotes*. Fotos: Luciano Lopes Marques.....20
- Figura 2 - Proporção de sequências repetitivas e as subclasses de Tetrápodes. Sentf & Macfarlan, 2021. ....21
- Figura 3 - Filogenia das famílias da ordem Passeriformes e seus respectivos números diploides (KUMA et al., 2022, com alterações) .....25

### 4. Capítulo I

- Figure 1 - Images and karyotypes of *S. rufosuperciliata* (a) and *C. obsoleta* (b)..... 32
- Figure 2 - C-banded female chromosomes of *S. frontalis* (a), *S. rufosuperciliata* (b), and *C. obsoleta* (c). Sex chromosomes are indicated. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ ..... 32
- Figure 3 - Distribution of microsatellite sequences on *C. obsoleta* female chromosomes. Sex chromosomes are indicated in the metaphase plates, and the probes used are highlighted in the upper left. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ ... .....33
- Figure 4 - FISH with microsatellite probes on *S. rufosuperciliata* female chromosomes. Sex chromosomes are indicated in the metaphase plates, and the probes used are highlighted in the upper left. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ ... .....33
- Figure 5 - Microsatellite mapping on *S. frontalis* female chromosomes. Sex chromosomes are indicated in the metaphase plates, and the probes used are highlighted in the upper left. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ ... .....34
- Figure 6 - FISH with 18S rDNA probe (green) in *S. frontalis* (a), *S. rufosuperciliata* (b), and *C. obsoleta* (c) chromosomes (blue). Sex chromosomes are indicated. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ ... 35
- Figure 7 - Female mitotic chromosomes of *S. frontalis* after intraspecific CGH procedure. Female- (green) and male derived (red) genomic probes were hybridized together. a DAPI image (blue). b Hybridization pattern of the female-derived probe (green). c Hybridization pattern of the male-derived probe (red). d Merged images of both genomic probes and DAPI staining. The common genomic regions for males and females are depicted in yellow. Sex chromosomes are indicated. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ ... .....35
- Figure 8 - Female mitotic chromosomes of *S. frontalis* after interspecific CGH procedures. Female- (green) and male derived (red) genomic probes were hybridized together, and the merged results are presented in the last column. First column: DAPI images (blue). Second column: hybridization pattern of the female-derived probe of *S. frontalis* (green). Third column: hybridization pattern of the female-derived probes (red) of *C. obsoleta*, *S. rufosuperciliata*, and *T. rufiventris*. Fourth column: merged images of both genomic probes and DAPI staining. The common genomic regions for both species are depicted in yellow. Sex chromosomes are indicated. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ ... ..... 36

### 5. Capítulo II

- Figura 1. Cariótipo da espécie *H. contaminatus* ( $2n = 82$ ). Barra de escala = 5  $\mu\text{m}$ . Ilustração: Birds of the World..... 46

Figura 2: Alterações observadas no par cromossômico 2 de <i>H. contaminatus</i> .....	47
Figura 3. Análise sequencial de Giemsa (a) e Banda C (b) em cromossomos de <i>Heliobletus contaminatus</i> . Cromossomos sexuais e blocos heterocromáticos intersticiais estão indicados. Barra de escala = 5 µm.....	48
Figura 4: Mapeamento de microssatélites nos cromossomos de <i>Heliobletus contaminatus</i> (fêmea). Os cromossomos sexuais estão indicados nas imagens e cada sonda é destacada no canto superior esquerdo. Barra de escala = 5 µm... ..	49
Figura 5: Localização das sequências 18s rDNA (a) e telomérica (b) em metáfases de fêmea de <i>H. contaminatus</i> . As setas indicam marcações intersticiais (ITS). Barra de escala = 5 µm... ..	50
Figura 6: Análises sequenciais de Giemsa, Banda C e Sequência Telomérica do 2° e 3° pares cromossômicos de <i>H. contaminatus</i> . Observou-se blocos heterocromáticos e a presença de sequências teloméricas intersticiais em ambos os cromossomos e nas mesmas regiões. ....	50
Figura 7: Ideograma representando a distribuição e localização de sequências de microssatélites nos pares de cromossomos 1-8, Z e W de <i>H. contaminatus</i> .....	52

### 6. Capítulo III

Figura 1: Cariótipo de uma fêmea de <i>Anumbius annumbi</i> (2n =82). Barra de escala = 5 µm. Ilustração: Birds of the World.....	66
Figura 2: Análise sequencial com Giemsa (a) e banda C (b) em cromossomos de <i>Anumbius annumbi</i> (fêmea). Cromossomos sexuais estão indicados. Barra de escala = 5 µm... ..	66
Figura 3: Mapeamento de microssatélites nos cromossomos de <i>Anumbius annumbi</i> (fêmea). O cromossomo sexual Z é indicado na placa metafásica e cada sonda é destacada no canto superior esquerdo. Barra de escala = 5 µm... ..	67
Figura 4: Diferenciação do cromossomo sexual Z em algumas ordens da Classe Aves (de Oliveira et al., 2017; Furo et al., 2017; Kretschmer et al., 2020; Tura et al., 2023, com modificações).....	69

## LISTA DE TABELA

### 4. Capítulo I

Tabela 1: Distribution of microsatellite sequences in the Furnariidae species... .....34

### 5. Capítulo II

Tabela 1: Morfologia dos cromossomos de *H. contaminatus* por análise biométrica... .....47

### 6. Capítulo III

Tabela 1: Morfologia dos cromossomos de *Anumbius annumbi* por análise biométrica... .....6

### 7. Conclusão

Tabela 1: Mapeamento cromossômico de sequências de microssatélites na família Furnariidae (Passeriformes, Suboscines)... .....78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl - Microlitro

µm - Micrômetro

ml - Mililitro

2n - Número diplóide

Braço p - Braço curto

Braço q - Braço longo

°C - Celsius

rDNA - DNA ribossomal

DNA - Ácido desoxirribonucleico

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

Cot-1 DNA - Supressor de sequências repetitivas de DNA

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA - Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

FISH - Hibridização *in situ* Fluorescente

CGH - Hibridização genômica comparativa

SSRs - Sequências simples repetitiva

GGA - *Gallus gallus*

LAL - *Leucopternis albicollis*

PAK - Putative Avian Ancestral Karyotype

RPM - Rotação por minuto

SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

NORs – Regiões organizadoras de nucléolo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
2.1 Objetivos gerais.....	18
2.2 Objetivos específicos .....	18
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>19</b>
3.1 Classe Aves .....	19
3.2 Citogenética Clássica em Aves .....	20
3.3 Sequências repetitivas em Aves .....	22
3.4 Características citogenéticas da família Furnariidae .....	24
<b>4. CAPÍTULO I .....</b>	<b>27</b>
<b>5. CAPÍTULO II.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>5.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
5.2.1 Amostras.....	44
5.2.2 Preparações cromossômicas e citogenética clássica.....	45
5.2.3 Mapeamento de DNA Repetitivo FISH .....	45
5.2.4 Microscopia e Processamento de Imagens .....	46
<b>5.3 RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
5.3.1 Descrição cariotípica e bandeamento C .....	46
5.3.2 Sequências simples repetitivas (SSRs).....	48
5.3.3 rDNA e telomérica.....	49
<b>5.4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>5.5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>
<b>6. CAPÍTULO 3.....</b>	<b>60</b>
<b>6.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>6.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>64</b>
6.2.1 Amostras e preparações cromossômicas .....	64
6.2.2 Citogenética clássica .....	64

6.2.3 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH) com SSRs .....	64
6.2.4 Análise microscópica e processamento de imagens .....	65
<b>6.3 RESULTADOS</b> .....	<b>65</b>
6.3.1 Descrição cariotípica e bandejamento C .....	65
6.3.1 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente com SSRs .....	67
<b>6.4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>68</b>
<b>6.5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>71</b>
<b>6.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>73</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>79</b>
<b>8. ANEXOS</b> .....	<b>86</b>
Anexo I .....	86
Anexo II .....	91
Anexo III .....	92
Anexo IV .....	94
Anexo V .....	95

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A classe Aves compreende um elevado número de espécies as quais estão distribuídas globalmente, devido à sua capacidade de voar e às suas adaptações evolutivas, garantindo até hoje uma grande ocupação e diversificação (BARROWCLOUGH et al., 2016). As aves desempenham um papel muito importante no equilíbrio ecológico. Ademais, são importantes modelos experimentais que permitem investigar questões evolutivas e ecológicas, já que a determinação de características cromossômicas deste grupo é importante para correlacionar fenômenos celulares com genéticos, bem como a diferenciação dos cromossomos sexuais, entre outros estudos (BED'HOM et al., 2003; KAPUSTA et al., 2017).

Dentro do padrão de cariótipo desta classe, que apresenta  $2n = 80$  na maioria dos indivíduos, oito a dez pares são macrocromossomos e o restante, de 30 a 32 pares, microcromossomos (BURT, 2002). Com relação ao sistema de determinação sexual, as fêmeas possuem um par de cromossomos heterogaméticos ZW, e homogaméticos ZZ nos machos (BELTERMAN & DE BOER, 1984). Todavia, apesar da elevada diversidade de espécies de aves, apenas 9,83% das espécies foram cariotipadas, enquanto a pintura cromossômica tem sido aplicada a menos de 1% de todos os indivíduos do grupo. (DEGRANDI et al., 2020a). No início dos estudos citogenéticos, muitos autores negaram a importância do cariótipo na evolução e especiação, alegando que os cromossomos não eram importantes, mas sim os genes que eles carregavam. Entretanto, estudos posteriores demonstraram evidências que diferenças cariotípicas fornecem valiosas informações citotaxonômicas para a interpretação da filogenia da classe Aves (WALDRIGUES, 1982; KRETSCHMER et al., 2018a; 2021a).

Estudos que mapearam rDNA por meio da técnica FISH são bastante comuns em vertebrados. Sequências simples repetitivas (SSRs) podem ser usadas para selecionar o alelo desejável quando o gene de interesse é conhecido (MAZZOLENI et al., 2018). Há uma classificação de acordo com o tipo de sequências repetitivas, onde podem ser definidas como perfeitas ou imperfeitas, quando são interrompidas por nucleotídeos distintos que não se repetem (SELKOE & TOONEN, 2006). Embora as sequências repetitivas constituam apenas uma pequena fração dos genomas das aves, o estudo desse componente genômico tem sido útil para entender a evolução dos cromossomos sexuais e a diferenciação cromossômica (CIOFFI & BERTOLLO, 2012; KRETSCHMER et al., 2018a). Microsatélites, por exemplo, foram recentemente analisados em espécies de aves Passeriformes, na Subordem Oscines, onde acumularam preferencialmente em áreas centroméricas, pericentroméricas ou teloméricas de macro e microcromossomos, além de

exibir um padrão único nos cromossomos sexuais (BARCELLOS et al., 2019; KRETSCHMER et al., 2021b). Embora esses estudos tenham contribuído para melhorarnossa compreensão da evolução dos cromossomos sexuais e da diferenciação cromossômica em espécies de Passeriformes, a dinâmica das sequências de DNA repetitivas nesse grupo recebeu pouca atenção, pois somente um estudo semelhante envolvendo membros da Subordem Suboscines foi conduzido até o momento.

Em resumo, apesar de seus cariótipos geralmente conservados, as aves apresentam uma variabilidade cromossômica interessante, tanto no número diplóide quanto na morfologia cromossômica, embora a maioria dos dados seja baseada apenas em macrocromossomos. Adicionalmente, a citogenética molecular e as informações de sequenciamento de DNA, a variação observada é uma subestimação da reorganização cromossômica aviária, que se baseia principalmente em rearranjos intracromossômicos, como inversões pericêntricas e paracêntricas (SKINNER & GRIFFIN, 2012; KRETSCHMER et al., 2014).

Um fenômeno notável de hibridização de SSRs tem sido minuciosamente documentado nos cromossomos sexuais das aves. Em linhas gerais, há uma tendência para a concentração dessas SSRs nos cromossomos sexuais W, conforme evidenciado em diversos estudos (FURO et al., 2017; BARCELLOS et al., 2019; GUNSKI et al., 2019; KRETSCHMER et al., 2021b). No entanto, algo notável ocorre nas aves pertencentes à ordem Piciformes, que revelam uma presença significativa de SSRs no cromossomo Z em todas as espécies até agora analisadas. Este achado sugere que essa acumulação de SSRs no cromossomo Z pode ser o principal fator responsável pelo aumento de tamanho observado nessas espécies (DE OLIVEIRA et al., 2017; KRETSCHMER et al., 2020a). Sequências repetitivas de DNA desempenham um papel importante na diferenciação dos cromossomos sexuais, além de sua importância na organização estrutural e funcional dos cromossomos (CHARLESWORTH & CHARLESWORTH, 2000; BIÉMONT & VIEIRA, 2006). Assim, esses estudos enfatizam a importância da acumulação de sequências de DNA repetitivas específicas de cada espécie nos cromossomos das aves.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

- Adquirir uma compreensão mais profunda dos processos fundamentais à evolução cromossômica em espécies pertencentes à família Furnariidae (Aves, Passeriformes).

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar o cariótipo de cinco espécies da família Furnariidae através da coloração convencional;
- Caracterizar o padrão de bandas C e identificar e caracterizar a presença, ou não, de sequências repetitivas no genoma de espécies de Furnariidae utilizando sondas de microssatélites, 45S (18S) e telomérica.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Classe Aves

O processo pelo qual a diversidade biológica foi originada começou a ser esclarecido a partir do século 19. A ampliação dos avanços científicos e tecnológicos das últimas décadas também resultaram em descobertas incríveis, como os táxons, principalmente em registros fósseis, que decifraram de maneira clara a origem de grupos de vertebrados altamente modificados, como as aves (BENEDITO, 2015). Hoje sabe-se, por exemplo, que as aves - foco deste trabalho- são dinossauros, encerrando um debate que intriga naturalistas há séculos (MARTINS, 2021).

As aves constituem uma importante classe de vertebrados tetrápodes e bípedes que evoluíram a capacidade do voo (POUGH et al., 2008). Atualmente este grupo é composto por aproximadamente 11.000 espécies existentes (WINKLER, et al., 2020). Destacam-se não só pela beleza de cada uma das espécies, ou pelos cantos, mas também por desempenharem um papel muito importante na natureza (RICE & GREENBERG, 2000). A capacidade do voo, ligada à maioria das espécies de aves, certamente influenciou na expansão desta classe, ocupando quase todos os tipos de habitats do planeta (BENEDITO, 2015).

Dentre as ordens atuais a maior diversidade de espécies é encontrada no Passeriformes. Essa ordem consiste em cerca de 5740 espécies, ou 59% de todas as espécies de aves vivas. Variando em morfologia, ecologia e comportamento, os passeriformes habitam amplamente todos os biótopos terrestres em todos os continentes, exceto nos gelos da Antártica (SIBLEY & MONROE, 1990; WINKLER, et al.; 2020). A ordem é dividida em duas subordens: Oscines (com aprendizado vocal/de canto), que compreende 776 gêneros e cerca de 80% de todas as espécies de Passeriformes, e Suboscines (sem aprendizado vocal/ de canto), que tem 284 gêneros e representa a linhagem mais antiga dessa ordem (FEDUCCIA, 1999; SELVATTI et al., 2015). Entre os Suboscines (Passeriformes), a família Furnariidae se destaca por sua excepcional diversificação e adaptação ecológica (MOYLE, et al., 2009). Existem cerca de 307 espécies de furnariídeos, o que a torna a quarta maior família americana de aves (WINKLER et al., 2020).



**Figura 1:** Espécies da família Furnariidae (Passeriformes, Aves): a) *Synallaxis frontalis*; b) *Anumbius annumbi*; c) *Pseudoseisura lophotes*. Fotos: Luciano Lopes Marques.

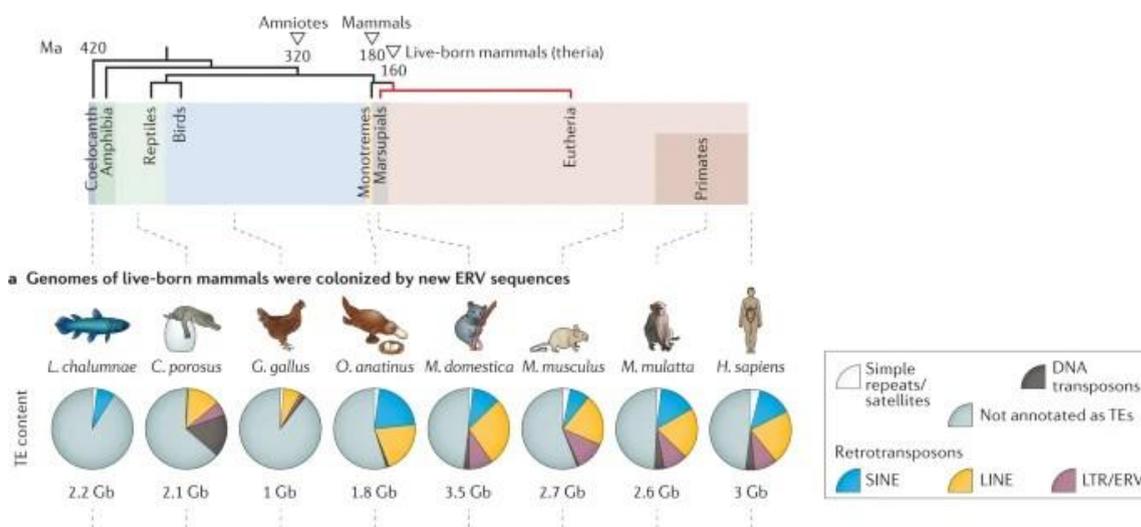
### 3.2 Citogenética de Aves

A citogenética abrange qualquer tipo de estudo referente aos cromossomos, isolados ou em conjunto, tanto relativo a sua evolução e variabilidade quanto sua morfologia, função, organização e replicação (GUERRA, 2004). Ela 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 (Bandeamento C), localização das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NOR) e a identificação das regiões ricas em Adenina e Timina (AT) e Citosina e Guanina (CG) (Bandeamento G) (DE OLIVEIRA et al., 2006). 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. Portanto, pesquisar e estabelecer as características cromossômicas é de grande importância para obter informações sobre a filogenia das espécies, além de contribuir para a melhor compreensão do papel dos rearranjos cromossômicos na especiação (KRETSCHMER et al., 2018a).

Um cariótipo traz muitas informações sobre características genéticas de uma espécie ou linhagem celular (MASABANDA et al., 2004). Além disso, a detecção de rearranjos cromossômicos fornece importantes dados que podem ser utilizados em análises filogenéticas (KRETSCHMER et al., 2021a). Nas primeiras análises cromossômicas os cariótipos eram comparados baseando-se no número total de cromossomos e na posição do centrômero. Nessa época, já foi observado que o complemento cromossômico das espécies de aves observadas era bastante peculiar, diferindo do cariótipo dos mamíferos por apresentar-se bimodal, ou seja, formado por dois grupos distintos de cromossomos: macrocromossomos e microcromossomos (DE OLIVEIRA et al., 2006), uma das razões pela qual este grupo é tão pouco estudado em comparação a outros vertebrados. Na Classe Aves, os machos são homogaméticos (ZZ) e as fêmeas heterogaméticas (ZW) (BELTERMAN & DE BOER, 1984).

Desde a metade do século XX, com o avanço das técnicas de cultivo celular e os tratamentos químicos foi possível melhorar consideravelmente a qualidade das preparações cromossômicas (BARCELLOS et al., 2022). Assim, ampliou-se o número de espécies cariotipadas, porém a classe permaneceu um grupo pouco estudado citogeneticamente. Atualmente, estima-se que aproximadamente 9,83% das aves tenham sido estudadas por métodos citogenéticos, e o número diploide da maioria dos indivíduos estudados está entre  $2n = 78$  e  $2n = 82$ . No entanto, existem espécies que se divergem deste padrão, com números diploides bem acima ou abaixo dessa média, como as espécies *Falco columbarius* (Falconiformes,  $2n = 40$ ), *Melopsittacus undulatus* (Psittaciformes,  $2n = 58$ ), *Corythaixoides concolor* (Musophagiformes,  $2n = 142$ ) *Alcedo atthis* (Coraciiformes,  $2n = 138$ ) (DEGRANDI et al., 2020a).

Os genomas das aves são altamente conservados em termos de número de cromossomos e ordem dos genes (ZHANG et al., 2014). Em um nível funcional, apesar dos microcromossomos representarem apenas 23% do tamanho médio do genoma das aves, eles contêm cerca de 50% dos genes, sendo ricos em GC e densos em genes (MCQUEEN et al., 1998; BURT, 2002; FERGUSON-SMITH et al., 2005; WARREN et al., 2017). O grau de estabilidade do genoma presente nos macrocromossomos de aves também se estende aos microcromossomos, demonstrando uma consistência no cariótipo, que é raramente vista em outras classes (O'CONNOR, 2019).



**Figura 2:** Proporção de seqüências repetitivas e as subclasses de Tetrápodes. Sentf & Macfarlan, 2021.

Degrandi e colaboradores elaboraram uma base de dados contendo as aves que foram cariotipadas até o ano de 2023, apresentando as ordens, famílias, e respectivas espécies. Passeriformes apresentam um baixo número de espécies cariotipadas e em outras ordens como Phaethontiformes, Mesitornithiformes e Leptosomiformes não foram encontrados nenhum dado a respeito de seus cariótipos (DEGRANDI et. al., 2020a). Em resumo, apesar dos cariótipos geralmente conservados, as aves apresentam alguma variabilidade

cromossômica interessante, tanto em relação ao número diplóide quanto à morfologia cromossômica, embora a maioria dos dados seja baseada apenas nos macrocromossomos (KRETSCHMER et al., 2018a).

### **3.3 Sequências repetitivas em Aves**

Os genomas eucarióticos, além de serem compostos por sequências únicas, contêm também grandes quantidades de DNA repetitivo, classificado em sequências moderadamente ou altamente repetitivas de acordo com seu grau de repetição (LÓPEZ-FLORES & GARRIDO-RAMOS, 2012). Até recentemente, o tamanho do genoma era conhecido em apenas 2% das espécies de aves (a proporção mais baixa entre os vertebrados). Os dados mostram que o genoma das aves é extremamente constante, com um tamanho médio de 1,4 pg de DNA (GREGORY, 2017). As sequências repetitivas desempenham um papel fundamental na geração de variações genéticas entre diferentes espécies e até mesmo entre indivíduos dentro de uma mesma população. Além disso, elas contribuem para processos essenciais, como a replicação do DNA (LI et al., 2002), recombinação genética (BIET, et al., 1999) e determinação dos cromossomos sexuais em plantas (KUBAT et al., 2008), répteis (POKORNÁ, et al., 2011), peixes (CIOFFI et al., 2010;) e aves (DE OLIVEIRA et al., 2017). Em resumo, essas sequências repetidas desempenham um papel essencial na organização estrutural e funcional do genoma como um todo (BIÉMONT & VIEIRA, 2006). Além disso, elas podem estar envolvidas em rearranjos cromossômicos, incluindo deleções, duplicações, inversões e translocações recíprocas, contribuindo significativamente para as variações cromossômicas observadas em muitos grupos (KIDWELL, 2002).

Os microssatélites são repetições em tandem distribuídas por todo o genoma de todos os organismos estudados até o momento e podem ser encontrados em regiões de codificação de proteínas e não codificantes, incluindo sequências regulatórias. Os microssatélites têm um comportamento mutacional característico. O fator mais importante é o número de unidades repetidas: quanto mais unidades repetidas, mais instável a região, presumivelmente porque loci mais longos têm maior probabilidade de parear incorretamente durante a replicação do DNA (ELLEGREN, 2004). Entre as aves, espécies pertencentes à ordem Piciformes, como os

pica-paus, mostram uma quantidade relativamente maior de sequências repetitivas, onde o acúmulo dessas sequências é provavelmente responsável pelo aumento do tamanho do cromossomo Z (DE OLIVEIRA et al., 2017). Outros exemplos em que essas sequências se mostram importantes evolutivamente, é no cariótipo de *Myiopsitta monachus*, que tem o menor número diplóide entre os Psittaciformes e em espécies de andorinhas (Passeriformes) que possuem um cromossomo W excepcionalmente grande, devido ao acúmulo de sequências de microssatélites (FURO et al., 2017; BARCELLOS et al., 2019).

Entre outras sequências de DNA repetitivo em tandem, existem o RNA ribossômico (rRNA) e repetições curtas de telômeros em tandem. Essas são classes de sequências repetitivas que desempenham diferentes funções no genoma. Os genes de RNA ribossômico (rDNA) desempenham um papel vital na síntese de proteínas, pois constitui o componente estrutural principal e catalítico dos ribossomos. Na maioria dos eucariotos, o rDNA consiste em unidades repetidas organizadas em tandem localizados na NOR (PROKOPOWICH et al., 2003). A maioria das espécies de aves têm apenas um par de microcromossomos que carregam esses *clusters*. No entanto, algumas espécies mostraram um número maior de pares de cromossomos com genes ribossômicos, chegando até seis pares de microcromossomos e até mesmo em macrocromossomos, sendo considerado como o estado derivado devido a translocações após a amplificação dos genes ribossômicos (STITOU et al., 1997, DEGRANDI et al., 2020b).

Como as estruturas mais distais dos cromossomos eucarióticos, os telômeros desempenham um papel crítico na manutenção de sua estabilidade e função. O uso de sondas de sequência telomérica revelou que, às vezes, essas sequências podem ser encontradas em posições intersticiais (ITS, Sequências Teloméricas Intersticiais) e geralmente são interpretadas como remanescentes de fusões cromossômicas anteriores (NANDA, 2002; NISHIDA et al., 2013). Em aves, o uso de sequências teloméricas como sondas produz sinais terminais, onde sinais muito mais brilhantes são observados nos microcromossomos em comparação com macrocromossomos. Além disso, sequências teloméricas intersticiais (ITS) foram observadas em diferentes grupos de aves, especialmente em grupos mais basais (NANDA, 2002). No cromossomo 3 de *Falco columbarius*, por exemplo, ITS foram cruciais para a identificação de uma fusão ancestral (NISHIDA et al., 2008). Em Passeriformes, estudos em espécies de quatro famílias diferentes de Suboscines e Oscines, algumas delas não foi detectado nenhuma ITS, enquanto em Turdidae e Fringillidae detectaram inúmeras ITS, que ainda não foram explicadas filogeneticamente (DERJUSHEVA et al., 2004).

Até hoje, essas sequências repetitivas (microssatélites) foram analisadas em 28 espécies de aves (MATSUBARA et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2017; FURO et al., 2017; KRETSCHMER et al., 2018b; BARCELLOS et al., 2019; GUNSKI et al., 2019; DE SOUZA et al., 2020; KRETSCHMER et al., 2020a, b; KRETSCHMER et al., 2021b; TURA et al., 2023), um número considerado baixo em relação à diversidade do grupo. Apesar disso, mesmo com poucos dados, diferentes tipos de sondas baseadas em sequências repetitivas têm contribuído para a nossa compreensão da organização do genoma das aves.

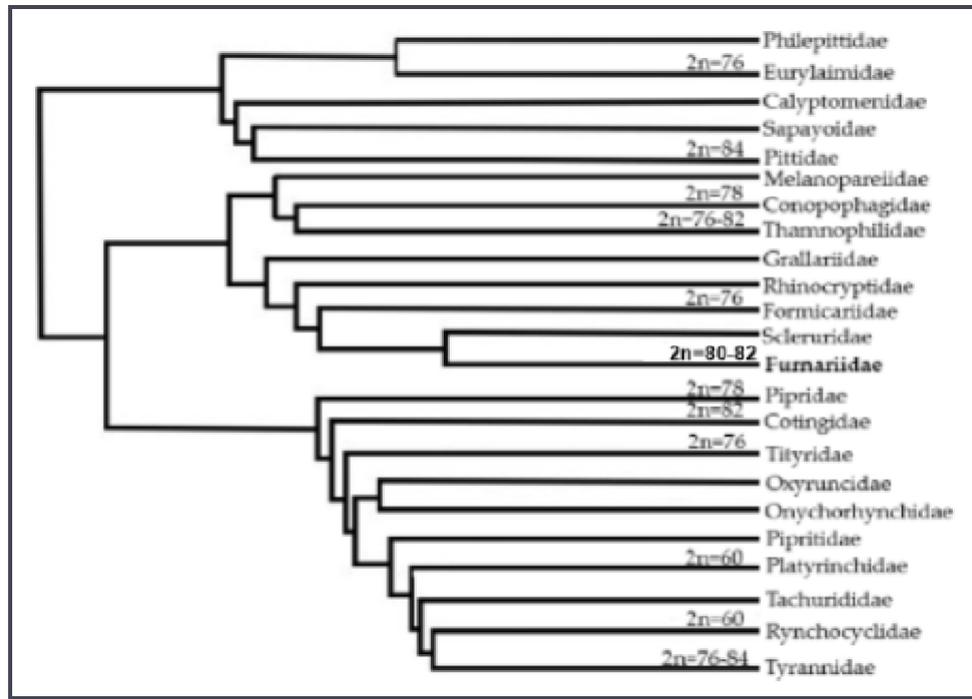
### 3.4 Características citogenéticas da família Furnariidae

Os furnarídeos representam uma família de aves que pertence à ordem Passeriformes e está distribuída principalmente na América Central e do Sul. Essa família compreende 307 espécies conhecidas como furnarídeos e que possuem uma ampla variedade de formas e tamanhos e suas características comuns incluem bicos fortes e curvos, caudas longas e penas adaptadas para escalar e construir ninhos (WINKLER et al., 2020).

Por mais que esta família apresente uma grande diversidade de espécies, quando se trata de dados citogenéticos este número é extremamente baixo, com seis espécies analisadas por citogenética clássica: *Sittasomus griseicapillus* ( $2n = 82$ ), *Lepidocolaptes angustirostris* ( $2n = 82$ ), *Glyphorynchus spirurus* ( $2n = 80$ ), *Synallaxis frontalis* ( $2n = 82$ ), *Cranioleuca obsoleta* ( $2n = 82$ ) e *Syndactyla rufosuperciliata* ( $2n = 82$ ); e quatro por citogenética molecular, das quais *S. frontalis* e *G. spirurus* foram analisadas por pintura cromossômica com sondas de *Gallus gallus* e *Burhinus oedicephalus*, enquanto nas espécies *S. frontalis*, *Cranioleuca obsoleta* e *Syndactyla rufosuperciliata* foi utilizado um conjunto de sondas de sequências repetitivas com o intuito de mapear essas sequências em seus cariótipos (BARBOSA et al., 2013; KRETSCHMER et al., 2018b; RIBAS et al., 2018; DEGRANDI et al., 2020a; TURA et al., 2023).

O cariótipo de *Glyphorynchus spirurus* segue o padrão mais comum observado em Passeriformes e na maioria das espécies de aves estudadas até o momento, semelhante ao cariótipo ancestral putativo de aves (PAK) ( $2n = 80$ ). Porém, difere de outras duas espécies de Furnariidae, *S. griseicapillus* e *L. angustirostri*, ambas com  $2n = 82$  e cariótipos semelhantes que diferem de *G. spirurus* por mudanças estruturais em macrocromossomos (provavelmente inversões) e por terem microcromossomos adicionais resultantes de fissões em *G. spirurus*. O cromossomo Z de *S. frontalis* e *S. rufosuperciliata* é submetacêntrico, ao contrário da

morfologia acrocêntrica encontrada em *S. griseicapillus* e *L. angustirostris* e *C. obsoleta* (BARBOSA et al., 2013; KRETSCHMER et al., 2018b; TURA et al., 2023).



**Figura 3.** Filogenia das famílias da ordem Passeriformes e seus respectivos números diploides (KUMA et al., 2022, com alterações).

Até hoje, foram conduzidas análises de pintura cromossômica em apenas 27 espécies de Passeriformes, principalmente com sondas de *Gallus gallus* (GGA) e *Leucopternis albicollis* (LAL) (GUTTENBACH et al., 2003; DERJUSHEVA et al., 2004; NANDA et al., 2007; KRETSCHMER et al., 2014, 2015, 2021c; DOS SANTOS et al., 2015; DOS SANTOS et al., 2017; BÜLAU et al., 2018; RODRIGUES et al., 2018; ARCELLOS et al., 2020; RIBAS et al., 2021). Algumas espécies foram analisadas usando sondas cromossômicas sugerindo que alguns rearranjos ocorreram no início da história dos Passeriformes, antes da divisão em duas subordens. Entre os furnarídeos, somente duas espécies foram analisadas por pintura cromossômica até hoje, *S. frontalis* e *G. spirurus* (KRETSCHMER et al., 2018b; RIBAS et al., 2018). Em *S. frontalis*, a hibridização das sondas GGA revelou correspondências em grande parte dos macrocromossomos ancestrais, com a exceção de GGA1 e GGA2, os quais demonstraram hibridização em múltiplos pares de cromossomos. A análise de pintura cromossômica usando sondas dos macrocromossomos 1–9 de *Gallus gallus* (GGA) identificou a ocorrência de fissão nos cromossomos 1, 2 e 4 em *Glyphorynchus spirurus*. Esses resultados confirmam que a

fissão centrada no GGA1 é uma característica compartilhada pelo grupo filogenético composto por Strigiformes, Passeriformes, Columbiformes e Falconiformes. Além disso, a fissão do GGA-2 foi relatada pela primeira vez em Passeriformes (RIBAS et al., 2018).

Quando trata-se de sequências simples repetitivas analisadas por FISH, apenas um trabalho envolvendo furnarídeos foi publicado, e seus resultados mostraram que essas sequências revelaram uma distinta diferenciação nos dois subgrupos, Suboscines e Oscines, sugerindo que cada espécie passou por diferentes acúmulos de DNA repetitivo após sua divergência. Além disso, no que diz respeito ao cromossomo W, notou-se que as espécies de Oscines apresentaram uma maior acumulação de sequências repetitivas em comparação com as Suboscines (TURA et al., 2023).

#### **4. CAPÍTULO I**

### **EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA DE SUBOSCINES: DIVERSIDADE CARIOTÍPICA E TENDÊNCIAS EVOLUTIVAS EM FURNARÍDEOS (PASSERIFORMES, FURNARIIDAE)**

# Chromosomal Evolution of Suboscines: Karyotype Diversity and Evolutionary Trends in Ovenbirds (Passeriformes, Furnariidae)

Victoria Tura<sup>a</sup> Rafael Kretschmer<sup>b</sup> Francisco de Menezes Cavalcante Sassi<sup>c</sup>  
Renata Luiza Rosa de Moraes<sup>c</sup> Suziane Alves Barcellos<sup>a</sup>  
Vitor Oliveira de Rosso<sup>a</sup> Marcelo Santos de Souza<sup>a</sup> Marcelo de Bello Cioffi<sup>c</sup>  
Ricardo J. Gunski<sup>a</sup> Analía del Valle Garnero<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Diversidade Genética Animal, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, Brazil;

<sup>b</sup>Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil;

<sup>c</sup>Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil

## Keywords

Chromosome Cytogenetics Birds Simple short repeats  
Comparative genomic hybridization

## Abstract

Furnariidae (ovenbirds) is one of the most diversified families in the Passeriformes order and Suboscines suborder. Despite the great diversity of species, cytogenetic research is still in its early stages, restricting our knowledge of their karyotype evolution. We combined traditional and molecular cytogenetic analyses in three representative species, *Synallaxis frontalis*, *Syndactyla rufosuperciliata*, and *Cranioleuca obsoleta*, to examine the chromosomal structure and evolution of ovenbirds. Our findings revealed that all the species studied had the same diploid number ( $2n = 82$ ). Differences in chromosomal morphology of some macrochromosomes indicate the presence of intrachromosomal rearrangements. Although the three species only had the 18S rDNA on one microchromosome pair, chromosomal mapping of six simple short repeats revealed a varied pattern of chromosome distribution among them, suggesting that each species underwent different repetitive DNA accumulation upon their divergence.

The interspecific comparative genomic hybridization experiment revealed that the Furnariidae species investigated carry centromeric regions enriched in similar repetitive sequences, bolstering the Furnariidae family's karyotype conservation. Nonetheless, the outgroup species *Turdus rufiventris* (Turdidae) demonstrated an advanced stage of sequence divergence with hybridization signals that were almost entirely limited to a few microchromosomes. Overall, the findings imply that Furnariidae species have a high degree of chromosomal conservation, and we could also observe a differentiation of repetitive sequences in both Passeriformes suborders (Suboscines and Oscines). © 2023 S. Karger AG, Basel

## Introduction

Passeriformes is the largest avian order, with more than 6,000 widely distributed species that show an extraordinary morphological and ecological diversity [Ericson et al., 2014]. The order is divided into two suborders: Oscines (vocal learners), comprising 776 genera and roughly 80% of all Passeriformes species, and Suboscines (vocal non-learners), which has 284 genera,

and represents the Passeriformes' most basal lineage [Feduccia, 1999; Selvatti et al., 2015]. Among the Suboscines, Furnariidae (ovenbirds) is represented by species of small birds that are widespread in tropical forests (from Mexico to South America) and are renowned for their enormous variety in nest construction [Zyskowski and Prum, 1999].

Despite such a wide range of behavior, morphology, and ecology [Moyle et al., 2009], about 40% of all species so far show evolutionary stability of around 78–80 chromosomes [Degrandi et al., 2020a].

Most bird species studied thus far contain 80 chromosomes, with a few big macrochromosomes (20) and numerous indistinguishable microchromosomes (60) [Santos and Gunski, 2006; Griffin et al., 2007; Kretschmer et al., 2018a]. Except for woodpeckers, most birds have a low number of repetitive DNAs in comparison to other tetrapod vertebrates, as well as a compact genome that originated predominantly because of lineage-specific erosion of repetitive elements, major segmental deletions, and gene loss [Szarski, 1976; Burt, 2002; Zhang et al., 2014; de Oliveira et al., 2017]. Furthermore, avian genomes exhibit a remarkable degree of evolutionary stability at the levels of nucleotide sequence, gene synteny, and chromosomal organization [Burt, 2002; Zhang et al., 2014; Gregory, 2022]. An important feature that differentiates the karyotype of Oscines from that of Suboscines is the presence of a germline-restricted chromosome, which is a chromosome that is only present during meiosis of songbirds [Torgasheva et al., 2019]. All members of this group have a ZZ/ZW sex chromosome system, with the Z chromosome being more conserved and often bigger than the W [Schartl et al., 2016]. The W chromosome, on the other hand, displays substantial variability, although it is usually small and mostly heterochromatic, as found in Passeriformes [dos Santos et al., 2015; Barcellos et al., 2019].

Cytogenetics encompasses any kind of study concerning chromosomes, isolated or in conjunction with each other, condensed or distended, and concerns their evolution and variability as well as their morphology, function, organization, and replication [Guerra, 1988]. Since the middle of the 20th century, with the advance of cell culture techniques and chemical treatments, it has been possible to considerably improve the quality of chromosome preparations [Barcellos et al., 2022]. Most of the karyological data in birds are based on classical cytogenetic techniques, involving conventional staining and chromosomal banding methods, such as C-banding and Ag-NOR staining [Sumner, 1972; Guerra, 1988; Degrandi et al., 2020a]. Banding resolution stands as a limitation

in the identification of chromosome homology and comparative studies, which limits deeper studies in chromosomes. The improvement of the FISH technique permitted and progressed towards more precise cytogenetic investigations, becoming a crucial tool for cytogenetic studies in birds, as well as clarifying phylogenies in some families. This resulted in the ability to identify and localize DNA sequences at particular locations along the chromosomes [Kretschmer et al., 2018a, 2021a].

Studies that mapped rDNA through FISH are quite common in vertebrates. Whereas, simple short repeats (SSRs) can be used to select the desirable allele when the gene of interest is known [Christiakov et al., 2006; Mazzoleni et al., 2018]. There is a classification according to the type of repetitive sequences where microsatellites can present two or more different motifs in tandem. It can be defined as perfect or imperfect, when they are composed by only perfect repetitions and when the repetitive sequences are interrupted by distinct nucleotides that are not repeated, respectively. The most common choices for molecular analysis are the sequences that contain two, three or four nucleotide repeats [Selkoe and Toonen, 2006]. Even though repetitive sequences constitute only a minor fraction of avian genomes, study of this genomic component has been useful in understanding the evolution of sex chromosomes and chromosomal differentiation [Cioffi and Bertollo, 2012; Kretschmer et al., 2018b]. Microsatellites, for example, have recently been analyzed in oscine species, where they preferentially accumulate in centromeric, pericentromeric, or telomeric areas of both macro- and microchromosomes and display a unique pattern in sex chromosomes [Barcellos et al., 2019; Kretschmer et al., 2021b]. In swallows with larger W chromosomes, a huge concentration of distinct microsatellite sequences was detected on this sex chromosome throughout its length, but the saffron finch, which has a typical small-sized W chromosome, displayed dispersed signals, similar to autosomes. In contrast, the saffron finch's Z chromosome revealed a substantial overall accumulation in its short arms [Barcellos et al., 2019; Kretschmer et al., 2021b]. Although these studies helped to improve our understanding of sex chromosome evolution and chromosome differentiation in Passeriformes species, the dynamics of repetitive DNA sequences in this group have received little attention because no similar study involving members of Suboscines has been conducted so far.

Based on the FISH technique, Kallioniemi et al. [1992] developed comparative genomic hybridization (CGH), a molecular cytogenetic method for detecting imbalanced

chromosomal rearrangements (i.e., duplications, deletions, and copy number variation) between two DNA sources. After being utilized to identify chromosomal abnormalities in tumor cells compared to normal cells [Kallioniemi et al., 1992], it is now being used to detect chromosomal rearrangements between species, as previously demonstrated by de Oliveira et al. [2017] and Cioffi et al. [2019]. Recent CGH investigations suggest that the two nightingale species (Oscines) diverged in centromeric repetitive sequences in most macro- and microchromosomes [Poignet et al., 2021].

Except for some Tyranni species, suboscine members have a typical avian karyotype with approximately 80 chromosomes [Degrandi et al., 2020a]. Considering only Furnariidae, there is a significant lack of knowledge about the chromosomal complement of this family, with less than 10% of the recognized species karyotyped and a smaller number of studies incorporating molecular cytogenetic methods, such as FISH, performed to date [Kretschmer et al. 2018c; de Souza et al., 2019; Degrandi et al., 2020a].

In order to get a more comprehensive understanding of the mechanisms underlying the chromosomal evolution of ovenbird species, we used a combination of conventional and molecular cytogenetic methodologies on *Synallaxis frontalis*, *Syndactyla rufosuperciliata*, and *Cranioleuca obsoleta* (the last two being analyzed for the first time). These methods were used to examine their karyotype structure, repetitive DNA distribution, and interspecific genomic divergences.

## Materials and Methods

### Samples

We collected 3 species of the Furnariidae family, *S. rufosuperciliata* (3 \), *C. obsoleta* (2 \), and *S. frontalis* (2 \, 2 \\_), and 1 species of the Turdidae family, *Turdus rufiventris* (4 \). The individuals were collected in three municipalities of Rio Grande do Sul (Brazil), São Gabriel, Porto Vera Cruz, and Pelotas. Data collection was performed according to the protocols approved by the Animal Ethics Committee (CEUA 019/2020) and Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO 61047-3, 33860-2, and 81564-1).

### Chromosomal Preparations and Classical Cytogenetics

Metaphases were obtained from distinct preparations: bone marrow direct, fibroblast or embryo cell culture [Sasaki et al., 1968; Garnero and Gunski, 2000; Barcellos et al., 2022]. C-banding analysis was performed according to Sumner [1972], with minor modifications. After incubation at 60°C for 1 h, slides were treated with 0.2 N HCl at 42°C for 10 min, then in 5% Ba(OH)<sub>2</sub> also at 42°C for 3 min and finally treated with 2× SSC at 60°C for 1 h and 30 min. Chromosomes were counterstained

using 0.7 μL propidium iodide (50 μg/mL) mounted in 20 μL of Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) [Lui et al., 2012]. The chromosome number was determined by counting 20–30 metaphases.

### Repetitive DNA Mapping by FISH

For the detection of the 45S ribosomal DNA (rDNA)-bearing chromosomes, we have isolated the 18S rDNA sequence from the *Ocyurus chrysurus* (Perciformes: Lutjanidae) genome [White et al., 1990] and labeled it in green by nick-translation with Atto448-dUTP, following the manufacturer's instructions (Jena Biosciences, Jena, Germany). The repetitive sequences (CA)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub>, (CGG)<sub>n</sub>, (GAA)<sub>n</sub>, (CAG)<sub>n</sub>, and (GAG)<sub>n</sub> were directly labeled with Cy-3 during the synthesis [Kubat et al., 2008]. FISH experiments were done following the methodology described in Kretschmer et al. [2022]. Chromosomes were denatured by immersion in 70% formamide (70 mL formamide and 30 mL 2× SSC) at 72°C for 1 min 20 s, and probes were denatured at 86°C for 10 min and cooled at 4°C for at least 5 min before hybridization. Chromosomes were counterstained with Vectashield with DAPI (Vector Laboratories). FISH experiments were done at least twice to confirm the hybridization signals and, in addition, 15–20 metaphases were analyzed to establish the pattern obtained for each microsatellite probe.

### Comparative Genomic Hybridization

DNA from both female and male samples from all species was extracted from the liver tissue by the phenol-chloroform-isoamyl alcohol method [Sambrook and Russell, 2001]. DNA from *S. frontalis* female specimens was chosen as a reference since *Synallaxis* is the most species-rich genus in the family Furnariidae, with 33 recognized species [Remsen, 2003] and used for hybridization against metaphase chromosomes of the other species. The first approach focused on the intraspecific comparison between the female and male genomes of *S. frontalis*. For this purpose, the gDNAs were labeled in red and green with Atto550-dUTP and Atto488-dUTP, respectively, by nick-translation (Jena Biosciences) and hybridized against the female background of *S. frontalis*. To block the repetitive sequences, we used C<sub>0</sub>t-1 DNA (i.e., genomic DNA enriched for highly and moderately repetitive sequences) prepared according to Zwick et al. [1997]. The final probe mixture was composed of 500 ng of female-derived DNA, 500 ng of male-derived gDNA, and 3 μg of male-derived C<sub>0</sub>t-1 DNA. The probe was precipitated with ethanol, and the dry pellets were mixed with hybridization buffer containing 50% formamide, 2× SSC, 10% SDS, 10% dextran sulfate, and Denhardt's buffer at pH 7.0. For the second set of experiments, we also used the female's chromosomes of *S. frontalis* as background and performed an interspecific comparison, using the gDNA of Furnariidae (*C. obsoleta*, *S. frontalis*, and *S. rufosuperciliata*) and Turdidae (*T. rufiventris*) representatives. We labeled the female-derived gDNA of *S. frontalis* with Atto550-dUTP and the female-derived gDNAs of *C. obsoleta*, *T. rufiventris*, and *S. rufosuperciliata* with Atto488-dUTP with the Nick-Translation mix kit (Jena Biosciences). The final probe cocktail for each experiment was composed of 500 ng of female-derived gDNA of *S. frontalis*, 500 ng of female-derived DNA of the compared species, and 3 μg of male-derived C<sub>0</sub>t-1 DNA (1.5 μg of each species), diluted in 10 μL of hybridization buffer. The chosen ratio of probe versus C<sub>0</sub>t-1 DNA was based on previous experiments [de Moraes et al., 2019; Toma et al., 2019;

Sassi et al., 2020]. CGH probes were denatured at 86°C for 8 min, followed by a 37°C pre-hybridization for 40 min and cooled at 4°C and the experiments followed the methodology described in Sember et al. [2018].

#### Microscopy and Image Processing

To confirm the diploid number, karyotype structure and FISH results in at least 30 metaphase spreads were analyzed per individual. Images were captured using an Olympus BX53 microscope (Olympus Corporation, Ishikawa, Japan) coupled with CoolSNAP and processed using ISIS software (MetaSystems). Chromosomes were arranged by size and the morphology was classified according to the centromere position [Guerra, 1988] as metacentric, submetacentric, acrocentric, and telocentric. GNU Image Manipulation Program (GIMP) software was used to assemble the karyotypes.

## Results

#### Karyotype Description and C-Banding

The results showed a diploid number of  $2n = 82$  in all ovenbirds investigated, and  $2n = 78$  in *T. rufiventris*. Both *S. frontalis* and *T. rufiventris* karyotypes have already been published, as  $2n = 82$  [Kretschmer et al., 2018c] and  $2n = 78$  [Kretschmer et al., 2014], respectively, corroborating the present results. Hence, we present the first detailed karyotype description of *C. obsoleta* and *S. rufosuperciliata* (Fig. 1). Pairs 1, 6, and 7 are acrocentric in *S. rufosuperciliata*, while pairs 2, 3, 4, 5, and the Z chromosome are submetacentric (Fig. 1a). Pairs 1, 6, 7, and the Z chromosome are acrocentric in *C. obsoleta*, but the remaining chromosomes are all submetacentric (Fig. 1b). C-positive heterochromatin regions were detected in all three ovenbird species' microchromosomes, and the W chromosomes seem to be entirely heterochromatic (Fig. 2).

#### Chromosomal Distribution of SSRs and 18S rDNA

Microsatellite sequences accumulated mostly on microchromosomes, resulting in a scattered pattern overall. In *C. obsoleta* (Fig. 3) and *S. rufosuperciliata* (Fig. 4), a single chromosome pair showed a strong signal with the  $(CA)_n$  probe as opposed to the scattered pattern reported in *S. frontalis*, which also had a small accumulation on the W chromosome (Fig. 5). Despite the lack of a distinct distribution pattern in *C. obsoleta* chromosomes,  $(GA)_n$  was found in the telomeric region of the short arm of two autosome pairs and the W chromosome of *S. rufosuperciliata*. The same repetitive sequence  $(GA)_n$  was found dispersed in both the macrochromosomes and microchromosomes in *S. frontalis*, with significant signal accumulation on the Z

chromosome (Fig. 3, 5). In *S. rufosuperciliata* and *S. frontalis* chromosomes, no hybridization signal was detected for either  $(GAG)_n$  or  $(GAA)_n$  sequences (Fig. 4, 5), however in *C. obsoleta*, the  $(GAA)_n$  probe accumulated in a single microchromosome pair, whereas  $(GAG)_n$  motifs were distributed over all chromosomes (Fig. 3). Almost all microchromosomes in *C. obsoleta* and *S. rufosuperciliata* were hybridized with  $(CGG)_n$ , whereas signals accumulated in one microchromosome in *S. frontalis*. Furthermore, the  $(GA)_n$  microsatellite was detected in an interstitial block on the q arms of the second pair of *S. frontalis* chromosomes. Finally, whereas few diffused signals for  $(CAG)_n$  were discovered in *C. obsoleta* chromosomes, this pattern was found on nearly all *S. rufosuperciliata* and *S. frontalis* chromosomes (Fig. 3, 5). The sequences  $(GAA)_n$  and  $(GAG)_n$  showed signals only in *C. obsoleta*, while  $(CAG)_n$ ,  $(CGG)_n$ ,  $(GA)_n$ , and  $(CA)_n$  were observed in all species, presenting mostly only weak signals. It was also observed that the  $(CA)_n$  and  $(CGG)_n$  sequences had strong signals on the microchromosomes in all species analyzed. The  $(CGG)_n$  sequence, on the other hand, showed strong signals on the microchromosomes in general, or on a specific pair, in all three Furnariidae species. The findings of microsatellite mapping in all species are summarized in Table 1. The 18S rDNA was mapped to a single microchromosome pair in all species (Fig. 6). In *T. rufiventris*, 18S rDNA has already been analyzed, where signals have been found in three pairs of microchromosomes [Kretschmer et al., 2014].

#### Comparative Genomic Hybridization

Intraspecific genomic hybridizations in *S. frontalis* revealed a conspicuous block of female-specific sequences on the whole W chromosome. Microchromosomes held the most significant accumulation of both female and male-derived genomic probes when compared to macrochromosomes (Fig. 7).

The interspecific comparisons using *S. frontalis* chromosomes showed that they exhibit divergent genomic patterns. The genomic probes of *C. obsoleta*, *S. rufosuperciliata*, and *T. rufiventris* successfully hybridized with the chromosomes of *S. frontalis*. Notably, the Furnariidae species share more repetitive sequences in their genomes than with *T. rufiventris*, especially at the pericentromeric regions (Fig. 8). Furthermore, all the analyzed Furnariidae species showed a similarity of signals on the terminal portion of the short arms of the W chromosome, indicating a conserved state for these species.

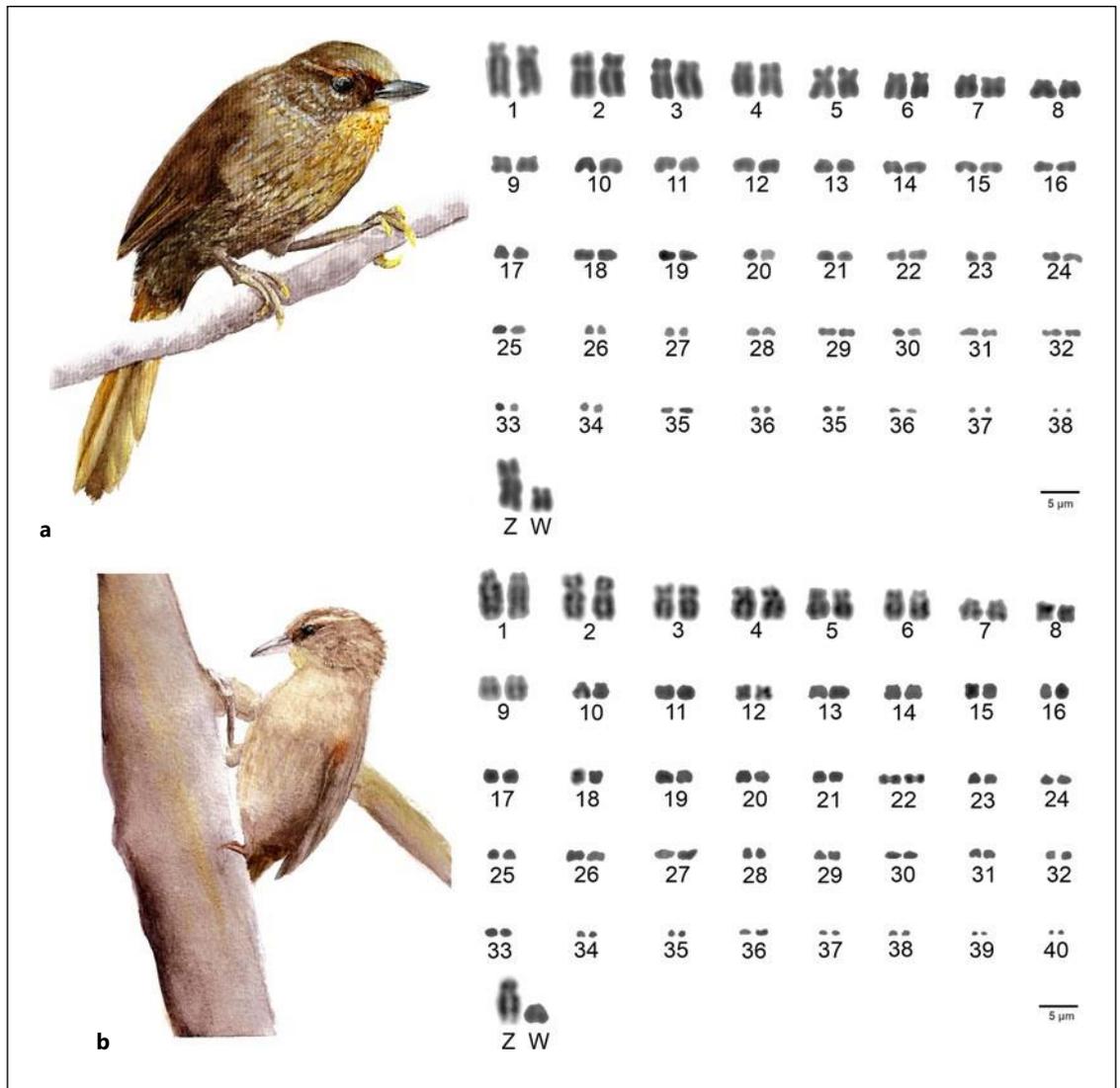


Fig. 1. Images and karyotypes of *S. rufosuperciliata* (a) and *C. obsoleta* (b).

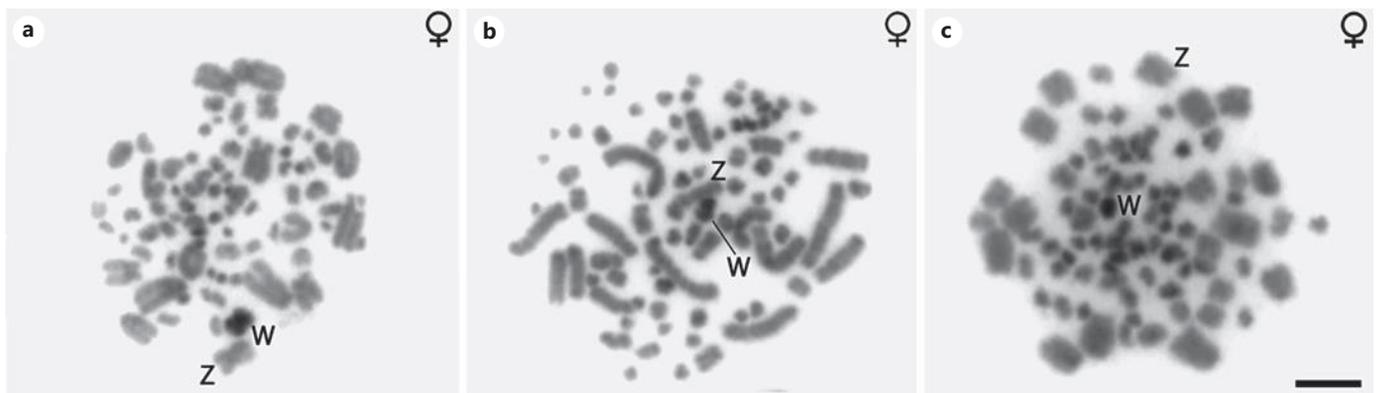


Fig. 2. C-banded female chromosomes of *S. frontalis* (a), *S. rufosuperciliata* (b), and *C. obsoleta* (c). Sex chromosomes are indicated. Scale bar, 10 µm.

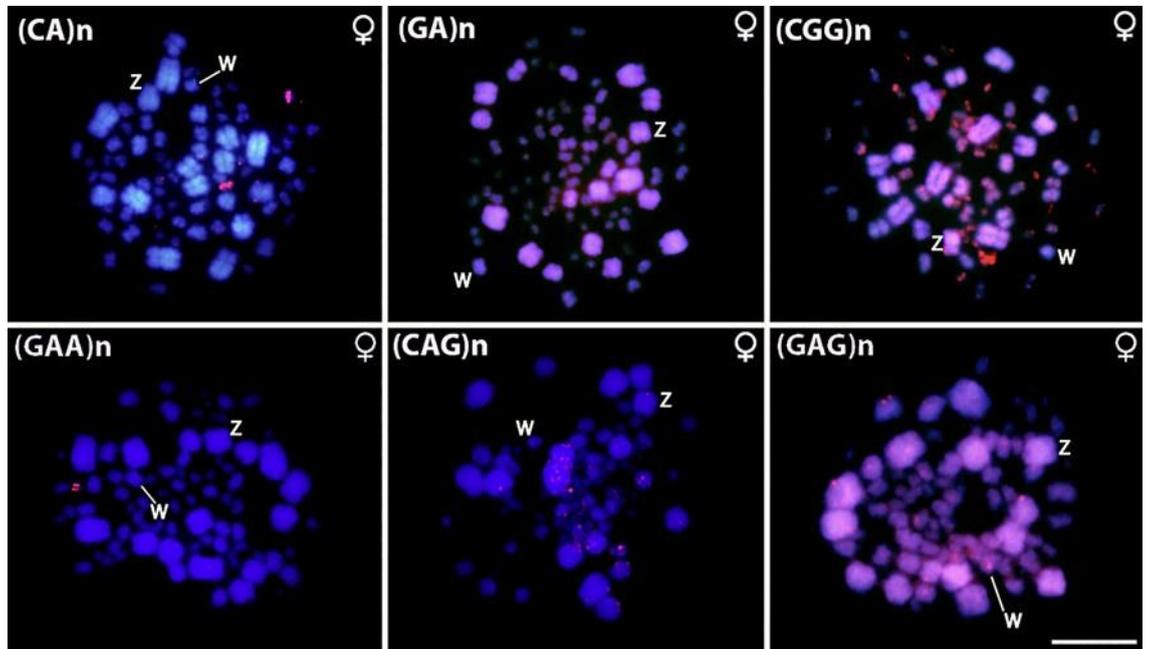


Fig. 3. Distribution of microsatellite sequences on *C. obsoleta* female chromosomes. Sex chromosomes are indicated in the metaphase plates, and the probes used are highlighted in the upper left. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ .

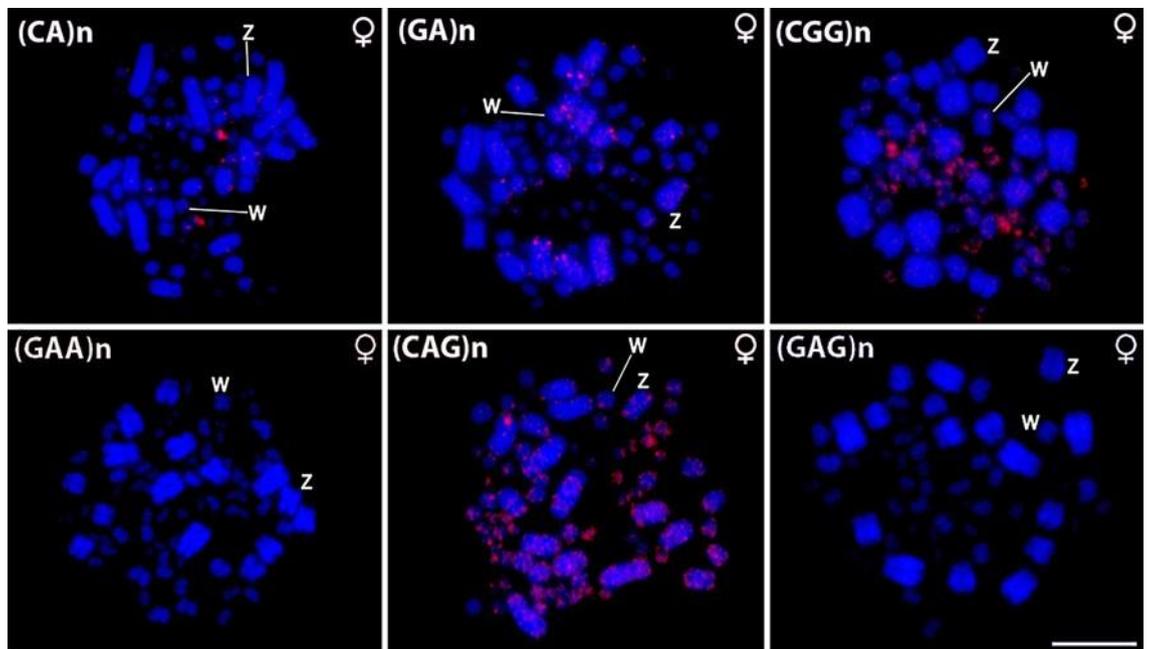


Fig. 4. FISH with microsatellite probes on *S. rufosuperciliata* female chromosomes. Sex chromosomes are indicated in the metaphase plates, and the probes used are highlighted in the upper left. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ .

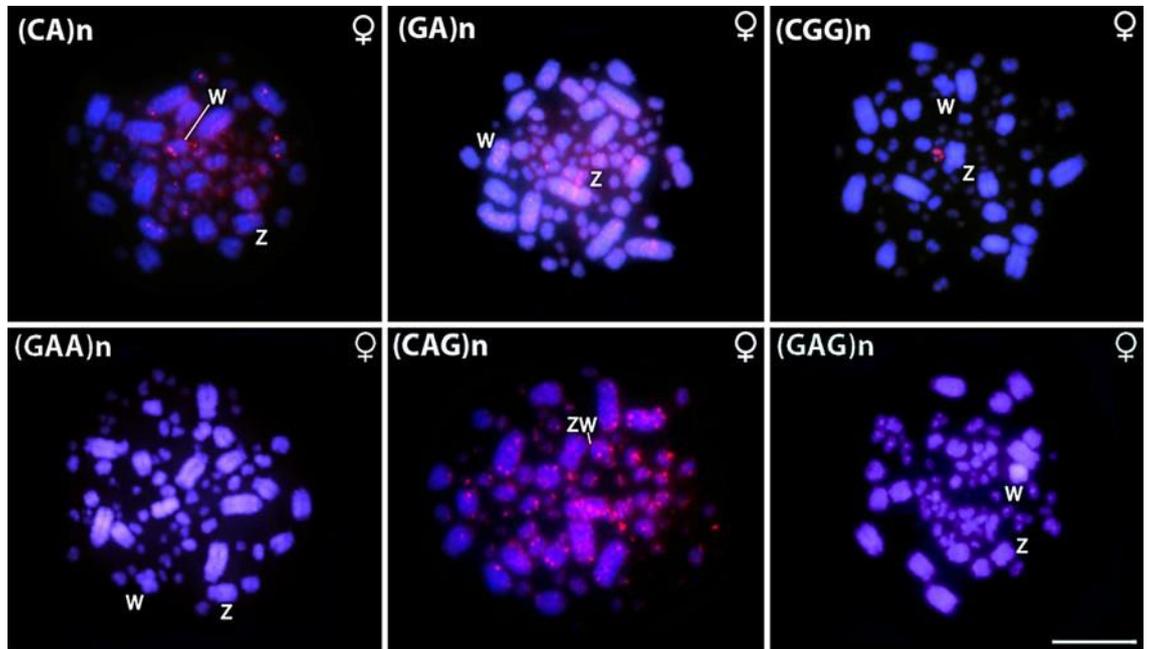


Fig. 5. Microsatellite mapping on *S. frontalis* female chromosomes. Sex chromosomes are indicated in the metaphase plates, and the probes used are highlighted in the upper left. Scale bar, 10  $\mu$ m.

Table 1. Distribution of microsatellite sequences in the Furnariidae species

SSRs	Species		
	<i>Synallaxis frontalis</i>	<i>Syndactyla rufosuperciliata</i>	<i>Cranioleuca obsoleta</i>
(GAG) <sub>10</sub>	–	–	Scattered signals on the telomere regions of macrochromosomes and centromere of W
(CAG) <sub>15</sub>	Scattered signals in all chromosomes but strong signals on the telomere regions of macrochromosomes	Scattered signals in all chromosomes but strong signals on macro- and microchromosomes, and in the telomere of Zp and Zq	Scattered and weak signals on macro- and microchromosomes, Zq
(GAA) <sub>10</sub>	–	–	Strong signal on one pair of microchromosomes
(CGG) <sub>10</sub>	Two pairs of microchromosomes	Strong and scattered signals on all microchromosomes	Strong signals on microchromosomes, scattered on macrochromosomes, Zp
(GA) <sub>15</sub>	Scattered signals in some macro- and microchromosomes, and strong signal on the Z	Telomere of two pairs of macrochromosomes and scattered signals in some microchromosomes; strong signal on Wp	Centromere of macrochromosomes
(CA) <sub>15</sub>	Telomere of Wq	Scattered signals on the microchromosomes but strong signal on one pair of microchromosomes	Strong signal on one pair of microchromosomes

p, short arm; q, long arm.

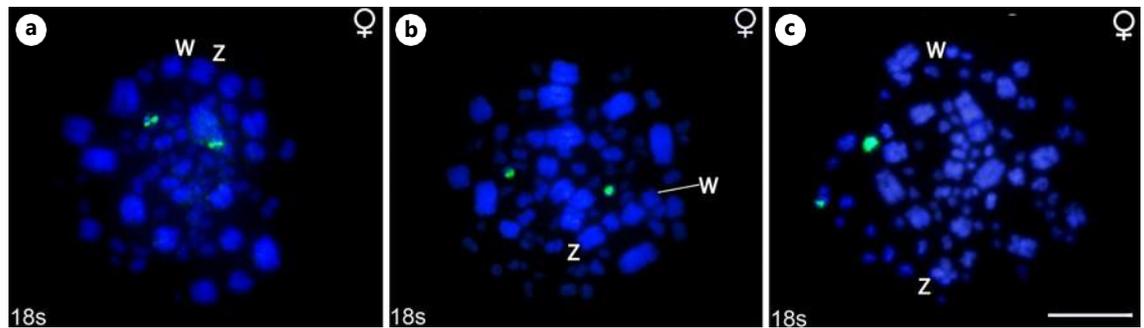


Fig. 6. FISH with 18S rDNA probe (green) in *S. frontalis* (a), *S. rufosuperciliata* (b), and *C. obsoleta* (c) chromosomes (blue). Sex chromosomes are indicated. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ .

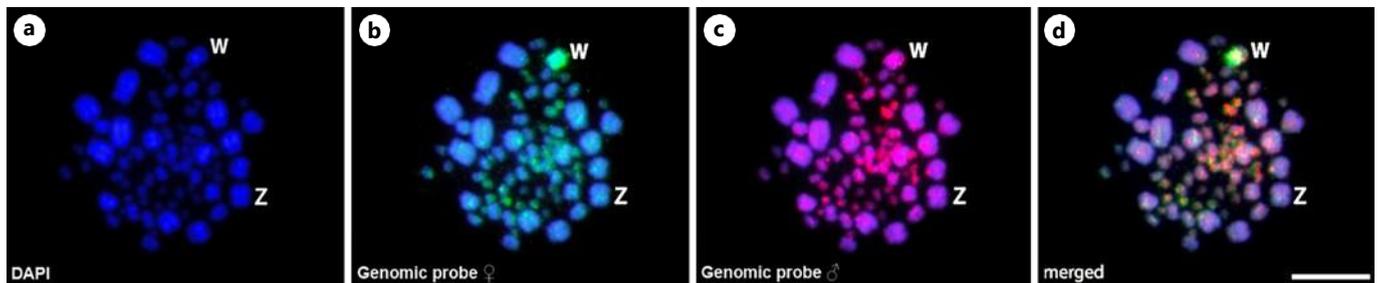


Fig. 7. Female mitotic chromosomes of *S. frontalis* after intraspecific CGH procedure. Female- (green) and male-derived (red) genomic probes were hybridized together. a DAPI image (blue). b Hybridization pattern of the female-derived probe (green). c Hybridization pattern of the male-derived probe (red). d Merged images of both genomic probes and DAPI staining. The common genomic regions for males and females are depicted in yellow. Sex chromosomes are indicated. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ .

## Discussion

Avian evolutionary history has produced an amazing group with diverse adaptations and a vast number of species [Barrowclough et al., 2016]. Despite this tremendous variety, there are currently limited cytogenetic data, particularly for ovenbirds, where the majority of studies are out of date and scarce, making understanding their karyotype evolution difficult [de Lucca and Rocha, 1992]. Here, the chromosomal and genomic organization of three representative ovenbird species (Furnariidae) were studied, with a focus on their repetitive DNA content. Furnariidae is a suborder of the Passeriformes and represents a primitive lineage of the Passeriformes [Feduccia, 1999; Selvatti et al., 2015]. Currently, the majority of cytogenetic investigations in Passeriformes have been conducted in Oscines members; hence, this work contributes to a better knowledge of chromosomal organization and evolution in Suboscines, and thus in birds as a whole.

Karyotypes of several Passeriformes have been recorded, and the majority of them have a typical karyotype structure, such as a diploid number of approximately 80 chromosomes with evident differentiation between macro- and microchromosomes [Degrandi et al., 2020a]. Indeed, our findings on the *S. frontalis* karyotype indicated  $2n = 82$ , the same number as previously published [Kretschmer et al., 2018c, de Souza et al., 2019]. Similarly, both *S. rufosuperciliata* and *C. obsoleta* reported for the first time here, have  $2n = 82$ . Although all species had the same diploid number, we noticed a few modest variations in the chromosome morphology of some autosomal macrochromosomes, indicating that intrachromosomal rearrangements may have played a significant role in ovenbird chromosome evolution. Furthermore, *S. rufosuperciliata* and *S. frontalis* have submetacentric Z chromosomes, but *C. obsoleta* has an acrocentric Z chromosome, indicating that intrachromosomal rearrangements have occurred, such as pericentric inversions. Previous studies have shown that the Z chromosome in birds is generally conserved in size, but not in morphology, due to

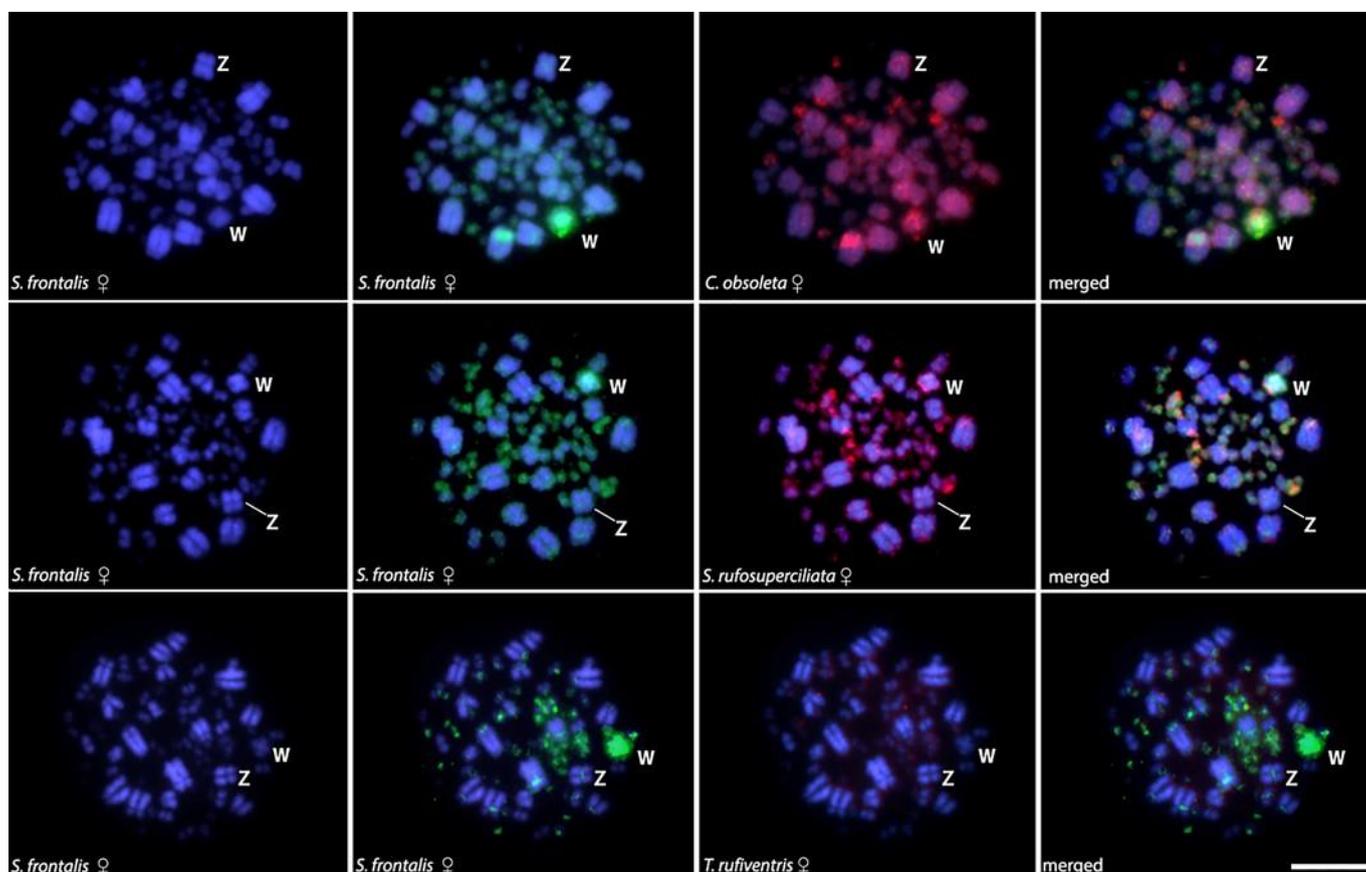


Fig. 8. Female mitotic chromosomes of *S. frontalis* after interspecific CGH procedures. Female- (green) and male-derived (red) genomic probes were hybridized together, and the merged results are presented in the last column. First column: DAPI images (blue). Second column: hybridization pattern of the female-derived probe of *S. frontalis* (green).

Third column: hybridization pattern of the female-derived probes (red) of *C. obsoleta*, *S. rufosuperciliata*, and *T. rufiventris*. Fourth column: merged images of both genomic probes and DAPI staining. The common genomic regions for both species are depicted in yellow. Sex chromosomes are indicated. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ .

intrachromosomal rearrangements [Nanda and Schmid, 2002]. From FISH analyses, comparative chromosome painting has revealed a low degree of chromosomal variation within Passeriformes, although these species share a complex pattern of paracentric and pericentric inversions, and this pattern has been observed in both Oscines and Suboscines. These rearrangements must have occurred before the separation of these two groups [Kretschmer et al., 2014; Rodrigues et al., 2018].

C-banding showed that the W chromosome and several microchromosomes preferentially accumulated constitutive heterochromatin in all the species that were investigated (Fig. 2). The centromeric region of the autosomes and Z chromosome of *S. frontalis* has previously been described, and blocks of constitutive heterochromatin were detected there [Kretschmer et al.,

2018c], whereas the W chromosome was almost entirely heterochromatic. The role of constitutive heterochromatin in sex chromosomal differentiation has already been identified by other groups [Marchal et al., 2004; Yano et al., 2016]. It appears that its accumulation in sex chromosomes is a regular phenomenon during the chromosomal evolution of Passeriformes. Similar patterns of C-positive heterochromatin accumulation in several pairs of microchromosomes were seen in both *S. rufosuperciliata* and *C. obsoleta*, as well as in other Suboscines species [Rodrigues et al., 2018; de Souza et al., 2019]. Similar results were seen in Oscines like *Saltator similis*, *Taeniopygia guttata*, and *Serinus canaria* [dos Santos et al., 2015, 2017], highlighting the general tendency for conservation observed in all bird genomes.

The three species studied in this work all have one pair of microchromosomes containing 18S rDNA genes, which has been postulated as the ancestral state for birds [Nishida-Umehara et al., 2007]. In fact, the genomic organization of these sequences is dynamic, but in most bird species, including basal ones like the emu (*Dromaius novaehollandiae*), they are restricted to one pair of microchromosomes. On the other hand, a larger number of 18S rDNA clusters was found in several Oscines species, including four in *Gubernatrix cristata*, *S. canaria*, and *Turdus albicollis* [dos Santos et al., 2017; Sember et al., 2018; de Moraes et al., 2019; Bülau et al., 2021]. The repetitive nature of the clusters or their intense gene expression activity is related to the location of rDNA sites, which causes chromosomal break hotspots [Huang et al., 2008; Cazaux et al., 2011]. Breaks like this on the chromosome can lead to a variety of rearrangements, including translocations, fusions, duplications, and inversions, which can quickly affect the rDNA site distribution on the chromosome in closely related species [Degrandi et al., 2020b].

Each Furnariidae species has a unique pattern of repetitive DNA hybridization, encompassing the macro- and microchromosomes as well as the sex chromosomes, which indicates species-specific patterns. So far, only four Passeriformes species (*Progne tapera*, *Progne chalybea*, *Pygochelidon cyanoleuca*, and *Sicalis flaveola*) have been studied using chromosomal mapping of SSR sequences [Barcellos et al., 2019; Kretschmer et al., 2021b]. The (GAA)<sub>n</sub> and (GAG)<sub>n</sub> sequences did not show signals in any of the chromosomes in *S. frontalis* and *S. rufosuperciliata*, but when we analyze these sequences in other bird species, there is a different pattern, where in *S. flaveola* it shows very strong and visible signals. The (GAA)<sub>n</sub> sequence, for example, was present in all bird species that have been studied by microsatellites to date (*S. flaveola*, *P. tapera*, *P. chalybea*, and *P. cyanoleuca*) and also shows a pattern of strong markings in all these species, unlike *S. frontalis* and *S. rufosuperciliata*, which showed no signal [Barcellos et al., 2019; Kretschmer et al., 2021b]. We can deduce that *C. obsoleta*, the most derived species among the three Furnariidae species here analyzed, may yet maintain an apomorphic trait because (GAG)<sub>n</sub> and (GAA)<sub>n</sub> are only present in this species.

Despite the presence of interstitial blocks of repetitive DNA, microsatellite accumulations were detected in the centromeric and telomeric regions of several macrochromosomes. According to Cella and Ferreira [1991] and Bueno et al. [2013], the interstitial signals in *S. frontalis* were thought to be driven on by the accumulation of repetitive DNAs in the long arms of the second chromosomal pair. Although the W chromosomes in Oscines are small and comparable to a microchromosome [Chen et al., 2012;

Zhang et al., 2014], there are other species that deviate significantly from this trend, such as swallows, where the W chromosome reaches nearly the size of the Z chromosome [Barcellos et al., 2019]. The size of the W is conserved in Suboscines, as it is in other birds, and both species karyotyped in this study show the same pattern. However, there was no evidence of sex-specific accumulation of these sequences in our study. Because avian genomes contain fewer repetitive sequences than those of other vertebrates [Zhang et al., 2014], there is a huge gap in information relating to avian repetitive DNA fraction of the genome. Except in Piciformes [Kretschmer et al., 2020], cytogenetic studies show that microsatellites accumulate preferentially on W chromosomes [de Oliveira Furo et al., 2017; Barcellos et al., 2019; Gunski et al., 2019]. Furthermore, these motifs are preferentially linked with heterochromatic regions, lending support to the theory that repetitive DNAs are present in condensed and inactive parts of the genome [Ellegren, 2004]. The (CA)<sub>n</sub> and (GA)<sub>n</sub> sequences are found in small amounts on the telomere of the W chromosome in *S. frontalis* and *S. rufosuperciliata*, respectively. Microsatellite probes provided insights into the sex chromosome evolution in the Furnariidae family. For example, the sequences (CGG)<sub>n</sub>, (GAA)<sub>n</sub>, and (GAG)<sub>n</sub> were not detected in the W of the two Furnariidae species, confirming that there was no amplification of these sequences, while a distinct scenario was observed in *C. obsoleta*, which had minor markings of the (CGG)<sub>n</sub> and (GAG)<sub>n</sub> sequences in the W.

Despite the fact that the three species studied here are from distinct genera, our CGH data indicated that their genomes share considerable portions of their repetitive DNA fractions. The presence of repeated DNAs in the centromeric heterochromatic blocks of several chromosomes was revealed in *S. frontalis* when the gDNA was hybridized against its own chromosomal complement. CGH investigations with *C. obsoleta* and *S. rufosuperciliata* gDNA probes revealed multiple overlapping signals in the centromeric regions, indicating that these species' centromeres are enriched in homologous repetitive sequences (Fig. 8). Incompatibilities between quickly evolving centromeric components might be responsible for both centromeric region organization and reproductive isolation of emerging species [Henikoff et al., 2001]. Centromeric repeats are the most quickly changing DNA sequences in eukaryotic genomes, varying even within populations of the same species [Murphy and Karpen, 1998] and between species that naturally hybridize [Poignet et al., 2021]. The interspecific CGH experiment in Oscines indicated that the two nightingale species studied (*Luscinia megarhynchos* and *Luscinia luscinia*) differed

in their centromeric repetitive sequences in all chromosomes. In fact, certain chromosomes demonstrated differences in the copy number of centromeric repeats between species [Poignet et al., 2021]. Concerning the sex chromosomes, the results demonstrated (1) that sequences are still shared in the terminal portion of the short arms of the W chromosomes (as previously proposed by the whole avian order) [Mank and Ellegren, 2007] and (2) the accumulation of species-specific sequences in the long arms of the W chromosome, evidencing a varying degree of W chromosome differentiation between species, accompanied by species-specific patterns of repetitive DNA, as observed in other ZW species from different vertebrate groups [Mank and Ellegren, 2007; Fraïsse et al., 2017; Barcelllos et al., 2019; de Souza et al., 2020; Viana et al., 2020]. The majority of the chromosomes in *S. frontalis* were hybridized by the gDNA probes during intraspecific analysis, highlighting repetitive DNA content (indicated by yellowish signals) and produced strong signals on the W chromosome. That is, both male and female probes hybridized to chromosome W, but the female probe stained roughly half of chromosome W (Wq) more intensively, indicating that the W displayed preferential binding of the corresponding female probe (Fig. 9). Taking all of this into consideration, we propose that each species followed different trajectories in these chromosomes.

## Conclusions

Here we conducted the most comprehensive cytogenetic investigation for any ovenbird species to date, providing an understanding of their chromosomal organization and evolution. The described karyotypes ( $2n = 82$ ) showed a typical avian structure. Our chromosomal mapping of SSRs revealed a reasonable differentiation between these sequences in both suborders (Suboscines and Oscines). In terms of the W chromosome, oscine species accumulated more repetitive sequences preferentially over suboscine ones. To assess significant evolutionary elements of the genomic architecture and composition of other Furnariidae species, as well as to determine if the other members of this family have a common pattern of sequence organization, more studies are still required.

## Acknowledgments

The authors are grateful to all colleagues at the Laboratório de Diversidade Genética Animal from the Universidade Federal do Pampa (RS, Brazil) and Laboratório de Citogenética de Peixes of the Uni-

versidade Federal de São Carlos (SP, Brazil) for their technical support. We are also grateful to Guilherme Castro Franco de Lima for the illustration of the *S. rufosuperciliata* and *C. obsoleta* used in Figure 1.

## Statement of Ethics

All protocols were approved by the Ethics Committee on the use of animals (CEUA 019/2020) and IBAMA (SISBIO 61047-1).

## Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

## Funding Sources

This research was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, Finance Code 001) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Proc. 407285/2021-0). M.B.C. was supported by CNPq (Proc. 302928/2021-9) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 2020/1172-8).

## Author Contributions

Conceptualization: Victoria Tura, Rafael Kretschmer, and Francisco de Menezes Cavalcante Sassi. Data curation: Victoria Tura and Marcelo de Bello Cioffi. Formal analysis: Victoria Tura, Rafael Kretschmer, Francisco de Menezes Cavalcante Sassi, Renata Luiza Rosa de Moraes, Suziane Alves Barcelllos, and Marcelo de Bello Cioffi. Funding acquisition: Marcelo de Bello Cioffi, Ricardo José Gunski, and Analía del Valle Garnero. Investigation: Victoria Tura, Rafael Kretschmer, Francisco de Menezes Cavalcante Sassi, and Marcelo de Bello Cioffi. Methodology: Victoria Tura, Francisco de Menezes Cavalcante Sassi, Renata Luiza Rosa de Moraes, Suziane Alves Barcelllos, and Marcelo Santos de Souza. Project administration: Marcelo de Bello Cioffi and Ricardo José Gunski. Supervision: Rafael Kretschmer, Francisco de Menezes Cavalcante Sassi, Marcelo de Bello Cioffi, Ricardo José Gunski, and Analía del Valle Garnero. Validation: Victoria Tura and Rafael Kretschmer. Visualization: Victoria Tura, Francisco de Menezes Cavalcante Sassi, and Marcelo de Bello Cioffi. Writing – original draft: Victoria Tura, Francisco de Menezes Cavalcante Sassi, Suziane Alves Barcelllos, and Vitor Oliveira de Rosso. Writing – review and editing: Rafael Kretschmer and Francisco de Menezes Cavalcante Sassi. Data curation: Victoria Tura, Renata Luiza Rosa de Moraes, Marcelo de Bello Cioffi, Rafael Kretschmer, Ricardo José Gunski, and Analía del Valle Garnero. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## Data Availability Statement

All data generated or analyzed during this study are included in this article. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

## References

- Barcellos SA, Kretschmer R, de Souza MS, Costa AL, Degrandi TM, dos Santos MS, et al. Karyotype evolution and distinct evolutionary history of the W chromosomes in swallows (Aves, Passeriformes). *Cytogenet Genome Res.* 2019;158(2):98–105.
- Barcellos SA, de Souza MS, Tura V, Pereira LR, Kretschmer R, Gunski RJ, et al. Direct chromosome preparation method in avian embryos for cytogenetic studies: quick, easy and cheap. *DNA.* 2022;2(1):22–9.
- Barrowclough GF, Cracraft J, Klicka J, Zink RM. How many kinds of birds are there and why does it matter? *PLoS One.* 2016;11:e0166307.
- Bueno D, Palacios-Gimenez OM, Cabral-de-Mello DC. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry of the B chromosome and H3 histone spreading. *PLoS One.* 2013;8(6):e66532.
- Bülau SE, Kretschmer R, Furo IO, de Oliveira EHC, de Freitas TRO. Karyotype organization of the endangered species yellow cardinal (*Gubernatrix cristata*). *DNA.* 2021;1(2): 77–83.
- Burt DW. Origin and evolution of avian microchromosomes. *Cytogenet Genome Res.* 2002; 96(1-4):97–112.
- Cazaux B, Catalan J, Veyrunes F, Douzery EJ, Britton-Davidian J. Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots? A case study in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). *BMC Evol Biol.* 2011;11:124.
- Cella DM, Ferreira A. The cytogenetics of *Abracris flavolineata* (Orthoptera, Caelifera, Ommatolampinae, Abracrini). *Brazil J Genet.* 1991;14:315–29.
- Chen N, Bellott DW, Page DC, Clark AG. Identification of avian W-linked contigs by short-read sequencing. *BMC Genomics.* 2012;13:183.
- Christiakov DA, Bart H, Filip AMV. Microsatellite and their genome distribution, evolution, function and applications; a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture.* 2006;255(1-4):1–29.
- Cioffi MB, Bertollo LAC. Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. *Genome Dyn.* 2012;7:197–221.
- Cioffi MB, Ráb P, Ezaz T, Bertollo LAC, Lavoué S, Oliveira EA, et al. Deciphering the evolutionary history of Arowana fishes (Teleostei, Osteoglossiformes, Osteoglossidae): insight from comparative cytogenomics. *Int J Mol Sci.* 2019;20(17):4296.
- Degrandi TM, Barcellos SA, Costa AL, Garner AV, Hass I, Gunski RJ. Introducing the bird chromosome database: an overview of cytogenetic studies in birds. *Cytogenet Genome Res.* 2020a;160(4):199–205.
- Degrandi TM, Gunski RJ, Garner ADV, Oliveira EHC, Kretschmer R, Souza MS, et al. The distribution of 45S rDNA sites in bird chromosomes suggests multiple evolutionary histories. *Genet Mol Biol.* 2020b;43(2): e20180331.
- de Lucca EJ, Rocha GT. Citogenética de Aves. *Bol Mus Para Emílio Goeldi.* 1992;8:33–68.
- de Moraes RLR, Sember A, Bertollo LAC, de Oliveira EA, Ráb P, Hatanaka T, et al. Comparative cytogenetics and neo-Y formation in small-sized fish species of the genus *Pyrhulina* (Characiformes, Lebiasinidae). *Front Genet.* 2019;10:678.
- de Oliveira TD, Kretschmer R, Bertocchi NA, Degrandi TM, de Oliveira EHC, Cioffi MB, et al. Genomic organization of repetitive DNA in woodpeckers (Aves, Piciformes): implications for karyotype and ZW sex chromosome differentiation. *PLoS One.* 2017; 12(1):e0169987.
- de Oliveira Furo I, Kretschmer R, dos Santos MS, de Lima Carvalho CA, Gunski RJ, O'Brien PCM, et al. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Myiopsitta monachus* and *Amazona aestiva* (Psittaciformes, Psittacidae), with emphasis on the sex chromosomes. *Cytogenet Genome Res.* 2017;151(3):151–60.
- de Souza MS, Barcellos S, Costa AL, Kretschmer R, Garner ADV, Gunski RJ. Polymorphism of sooty-fronted spinetail (*Synallaxis frontalis* Aves: Furnariidae): evidence of chromosomal rearrangements by pericentric inversion in autosomal macrochromosomes. *Genet Mol Biol.* 2019;42(1):62–7.
- de Souza MS, Kretschmer R, Barcellos SA, Costa AL, Cioffi MB, de Oliveira EHC, et al. Repeat sequence mapping shows different W chromosome evolutionary pathways in two Caprimulgiformes families. *Birds.* 2020;1: 19–34.
- dos Santos MS, Kretschmer R, Silva FAO, Ledesma MA, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA, et al. Intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus *Saltator* (Thraupidae, Passeriformes) and the occurrence of heteromorphic Z chromosomes. *Genetica.* 2015;143(5):535–43.
- dos Santos MS, Kretschmer R, Frankl-Vilches C, Bakker A, Gahr M, O'Brien PCM, et al. Comparative cytogenetics between two important songbird, models: the zebra finch and the canary. *PLoS One.* 2017;12(1): e0170997.
- Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet.* 2004;5(6): 435–45.
- Ericson PG, Klopstein S, Irestedt M, Nguyen JMT, Nylander JA. Dating the diversification of the major lineages of Passeriformes (Aves). *BMC Evol Biol.* 2014;14:8.
- Feduccia A. *The origin and evolution of birds.* New Haven: Yale University Press; 1999. p. 287–300.
- Fraïsse C, Picard MAL, Vicoso B. The deep conservation of the Lepidoptera Z chromosome suggests a non-canonical origin of the W. *Nat Commun.* 2017;8(1):1486.
- Garnero AV, Gunski RJ. Comparative analysis of the karyotype of *Nothura maculosa* and *Rynchotus rufescens* (Aves: Tinamidae). A case of chromosomal polymorphism. *Nucleus.* 2000;243:64–70.
- Gregory TR. *Animal Genome Size Database.* 2022. <http://www.genomesize.com>
- Griffin DK, Robertson LBW, Tempest HG, Skinner BM. The evolution of the avian genome as revealed by comparative molecular cytogenetics. *Cytogenet Genome Res.* 2007; 117(1-4):64–77.
- Guerra M. Introdução à citogenética geral. *Guanabara Koogan.* 1988;1(1st):142.
- Gunski RJ, Kretschmer R, Santos de Souza M, de Oliveira Furo I, Barcellos SA, Costa AL, et al. Evolution of bird sex chromosomes narrated by repetitive sequences: unusual W chromosome enlargement in *Gallinula melanops* (Aves: Gruiformes: Rallidae). *Cytogenet Genome Res.* 2019;158(3):152–9.
- Henikoff S, Ahmad K, Malik H. The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science.* 2001;293(5532):1098–102.
- Huang J, Ma L, Yang F, Fei SZ, Li L. 45S rDNA regions are chromosome fragile sites expressed as gaps in vitro on metaphase chromosomes of root-tip meristematic cells in *Lolium* spp. *PLoS One.* 2008;3(5):e2167.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 1992;258(5083):818–21.
- Kretschmer R, Gunski RJ, Garner ADV, Furo IO, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA, et al. Molecular cytogenetic characterization of multiple intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus *Turdus* (Turdidae, Passeriformes). *PLoS One.* 2014;9: e103338.
- Kretschmer R, Ferguson-Smith MA, de Oliveira EHC. Karyotype evolution in birds: from conventional staining to chromosome painting. *Genes.* 2018a;9(4):181.
- Kretschmer R, de Oliveira TD, de Oliveira Furo I, Oliveira Silva FA, Gunski RJ, Del Valle Garner A, et al. Repetitive DNAs and shrink genomes: a chromosomal analysis in nine Columbidae species (Aves, Columbiformes). *Genet Mol Biol.* 2018b;41(1):98–106.
- Kretschmer R, de Lima VLC, de Souza MS, Costa AL, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA, et al. Multidirectional chromosome painting in *Synallaxis frontalis* (Passeriformes, Furnariidae) reveals high chromosomal reorganization, involving fissions and inversions. *Comp Cytogenet.* 2018c;12(1):97–110.
- Kretschmer R, Furo IO, Cioffi MB, Gunski RJ, Garner ADV, O'Brien PCM, et al. Extensive chromosomal fissions and repetitive DNA accumulation shaped the atypical karyotypes of two Ramphastidae (Aves: Piciformes) species. *Biol J Linn Soc.* 2020;130(4):839–49.

- Kretschmer R, Franz I, de Souza MS, Garnero ADV, Gunski RJ, de Oliveira EHC, et al. Cytogenetic evidence clarifies the phylogeny of the family Rhynchocyclidae (Aves: Passeriformes). *Cells*. 2021a;10:2650.
- Kretschmer R, Rodrigues BS, Barcellos SA, Costa AL, Cioffi MB, Garnero ADV, et al. Karyotype evolution and genomic organization of repetitive DNAs in the saffron finch, *Sicalis flaveola* (Passeriformes, Aves). *Animals*. 2021b;11(5):1456.
- Kretschmer R, Santos MS, Furo IO, Oliveira EHC, Cioffi MB. FISH—in birds. In: Liehr T, editor. *Cytogenetics and Molecular Cytogenetics*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 2022. p. 263–76.
- Kubat Z, Hobza R, Vyskot B, Kejnovsky E. Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. *Genome*. 2008;51(5):350–6.
- Lui RL, Blanco DR, Moreira-Filho O, Margarido VP. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotech Histochem*. 2012;87(7):433–8.
- Mank JE, Ellegren H. Parallel divergence and degradation of the avian W sex chromosome. *Trends Ecol Evol*. 2007;22(8):389–91.
- Marchal JA, Acosta MJ, Nietzel H, Sperling K, Bullejos M, Díaz de la Guardia R, et al. X chromosome painting in *Microtus*: origin and evolution of the giant sex chromosomes. *Chromosome Res*. 2004;12(8):767–76.
- Mazzoleni S, Rovatsos M, Schillaci O, Dumas F. Evolutionary insight on localization of 18S, 28S rDNA genes on homologous chromosomes in Primates genomes. *Comp Cytogenet*. 2018;12(1):27–40.
- Moyle RG, Chesser RT, Brumfield RT, Tello JG, Marchese DJ, Cracraft J. Phylogeny and phylogenetic classification of the antbirds, ovenbirds, woodcreepers, and allies (Aves: Passeriformes: infraorder Furnariidae). *Cladistics*. 2009;25(4):386–405.
- Murphy TD, Karpen GH. Centromeres take flight: alpha satellite and the quest for the human centromere. *Cell*. 1998;93(3):317–20.
- Nanda I, Schmid M. Conservation of avian Z chromosomes as revealed by comparative mapping of the Z-linked aldolase B gene. *Cytogenet Genome Res*. 2002;96(1-4):176–8.
- Nishida-Umehara C, Tsuda Y, Ishijima J, Ando J, Fujiwara A, Matsuda Y, et al. The molecular basis of chromosome orthologies and sex chromosomal differentiation in palaeognathous birds. *Chromosome Res*. 2007;15(6):721–34.
- Poignet M, Johnson MP, Altmanová M, Majtánová Z, Dedukh D, Albrecht T, et al. Comparison of karyotypes in two hybridizing passerine species: conserved chromosomal structure but divergence in centromeric repeats. *Front Genet*. 2021;12:768987.
- Remsen JV. Family Furnariidae (ovenbirds). In: del Hoyo J, Elliott A, Christie DA, editors. *Handbook of the Birds of the World*. Barcelona: Lynx Edicions; 2003. p. 162–357.
- Rodrigues BS, Kretschmer R, Gunski RJ, Garnero ADV, O'Brien PCM, Ferguson-Smith M, et al. Chromosome painting in tyrant flycatchers confirms a set of inversions shared by Oscines and Suboscines (Aves, Passeriformes). *Cytogenet Genome Res*. 2017;153(4):205–12.
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Santos LP, Gunski RJ. Revisão de dados citogenéticos sobre a avifauna brasileira. *Rev Brasil Ornitol*. 2006;14:35–45.
- Sasaki M, Ikeuchi T, Maino SA. Feather pulp culture for avian chromosomes with notes on the chromosomes of the peafowl and the ostrich. *Experientia*. 1968;24:1923–9.
- Sassi FMC, Hatanaka T, Moraes RLR, Toma GA, Oliveira EA, Liehr T, et al. An insight into the chromosomal evolution of Lebiasinidae (Teleostei, Characiformes). *Genes*. 2020;11(4):365.
- Schartl M, Schmid M, Nanda I. Dynamics of vertebrate sex chromosome evolution: from equal size to giants and dwarfs. *Chromosoma*. 2016;125(3):553–71.
- Selkoe KA, Toonen RJ. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett*. 2006;9(5):615–29.
- Selvatti AP, Gonzaga LP, Russo CA. A Paleogene origin for crown passerines and the diversification of the Oscines in the New World. *Mol Phylogenet Evol*. 2015;88:1–15.
- Sember A, Bertollo LAC, Ráb P, Yano CF, Hatanaka T, de Oliveira EA, et al. Sex chromosome evolution and genomic divergence in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Front Genet*. 2018;9:71.
- Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res*. 1972;75(1):304–6.
- Szarski H. Cell size and nuclear DNA content in vertebrates. *Int Rev Cytol*. 1976;44:93–111.
- Toma GA, de Moraes RLR, Sassi FMC, Bertollo LAC, de Oliveira EA, Rab P, et al. Cytogenetics of the small-sized fish, *Copeina guttata* (Characiformes, Lebiasinidae): novel insights into the karyotype differentiation of the family. *PLoS One*. 2019;14(12):e0226746.
- Torgasheva AA, Malinovskaya LP, Zadesenets KS, Karamysheva TV, Kizilova EA, Akberdina EA, et al. Germline-restricted chromosome (GRC) is widespread among songbirds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(24):11845–50.
- Viana PF, Ezaz T, de Bello Cioffi M, Liehr T, Al-Rikabi ABH, Goll LG, et al. Landscape of snake sex chromosomes evolution spanning 85 MYR reveals ancestry of sequences despite distinct evolutionary trajectories. *Sci Rep*. 2020;10(1):12499.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press; 1990. p. 315–22.
- Yano CF, Bertollo LAC, Liehr T, Troy WP, Cioffi MB. W chromosome dynamics in *Triportheus* species (Characiformes, Triporthidae)—an ongoing process narrated by repetitive sequences. *J Hered*. 2016;107(4):342–8.
- Zhang G, Li C, Li Q, Li B, Larkin DM, Lee C, et al. Comparative genomics reveals insights into avian genome evolution and adaptation. *Science*. 2014;346(6215):1311–20.
- Zwick MS, Hanson RE, Islam-Faridi MN, Stelly DM, Wing RA, Price HJ, et al. A rapid procedure for the isolation of C0t-1 DNA from plants. *Genome*. 1997;40(1):138–42.
- Zyskowski K, Prum RO. Phylogenetic analysis of the nest architecture of neotropical ovenbirds (Furnariidae). *The Auk*. 1999;116(4):891–911.

## **5. CAPÍTULO 2**

**Este capítulo será enviado como artigo para a revista “Cytogenetic and Genome Research”**

**EVOLUÇÃO GENÔMICA EM FURNARIIDAE (AVES, PASSERIFORMES):  
SEQUÊNCIAS REPETITIVAS EVIDENCIAM FUSÕES CROMOSSÔMICAS**

## **Evolução Genômica em Furnariidae (Aves, Passeriformes): sequências repetitivas evidenciam fusões cromossômicas**

Victoria Tura<sup>1</sup>, Vitor Oliveira de Rosso<sup>1</sup>, Ricardo José Gunski, Rafael Kretschmer<sup>2</sup>, Edivaldo Herculano Correa de Oliveira<sup>3</sup>, Fabiano Pimentel Torres<sup>1</sup>, Suziane Alves Barcellos<sup>1</sup>, Marcelo Santos de Souza<sup>1</sup> and Analía del Valle Garnero<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Diversidade Genética Animal, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel 97300-162, Brasil; <sup>2</sup> Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 96010-900, Brasil; <sup>3</sup> Laboratório de Tecidos e Citogenética, SAMAM, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua 67030-000, Pará, Brazil.

### **RESUMO**

Os furnarídeos pertencem à uma das famílias mais diversificadas dentro da ordem Passeriformes (Aves). Apesar da abundância de espécies nessa família, a pesquisa em citogenética ainda está em uma fase inicial, limitando nosso entendimento sobre a evolução de seus padrões cromossômicos. Aqui descrevemos pela primeira vez a espécie *Heliobletus contaminatus* ( $2n = 82$ ), incluindo análises de 10 microssatélites ((CAA)<sub>n</sub>, (CGG)<sub>n</sub>, (CAT)<sub>n</sub>, (GAG)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub>, (CAG)<sub>n</sub>, (CG)<sub>n</sub>, (GAA)<sub>n</sub> e (TA)<sub>n</sub>), seqüências teloméricas e rDNA 18S, por meio de Hibridização *in situ* fluorescente (FISH). As diferenças na morfologia cromossômica de alguns macrocromossomos com outros furnarídeos indicam a presença de rearranjos intracromossômicos. A espécie apresentou algumas diferenças em relação à distribuição de heterocromatina em comparação com outras espécies estudadas de furnarídeos. Além disso, o mapeamento de seqüências repetitivas demonstrou padrões variáveis, com marcações nos macro e microcromossomos, além dos cromossomos sexuais Z e principalmente o W. A análise também incluiu a identificação de seqüências 18S rDNA em um par de microcromossomos de *H. contaminatus*, sugerindo que essa configuração pode representar o estado ancestral das aves. Foi detectada a presença de seqüências teloméricas em locais intersticiais (ITS) dos macrocromossomos, sugerindo vestígios de fusões cromossômicas prévias e eventos de rearranjo genômico durante a evolução deste furnarídeo. De modo geral, os resultados implicam que essa espécie de Furnariidae têm um alto grau de conservação, e com possíveis fusões cromossômicas, contribuindo para o entendimento da evolução cromossômica e genômica das aves, especialmente dentro da ordem Passeriformes.

## 5.1 INTRODUÇÃO

Estima-se que 10% das aves tenham sido estudadas por métodos citogenéticos, e a maioria dos indivíduos desta classe apresenta um número diploide ( $2n$ ) que varia entre  $2n = 78$  a  $2n = 82$  (Degrandi et al., 2020a). Além disso, esses animais possuem poucos pares de macrocromossomos, que são fáceis de observar e caracterizar morfológicamente, e muitos pares de microcromossomos, que apresentam dificuldades na interpretação métrica (Guerra, 2004).

Entre os Suboscines (Passeriformes), a família Furnariidae destaca-se por sua diversificação e adaptação ecológica (Moyle et al., 2009). Existem 307 espécies de furnarídeos, se tornando a quarta maior família de aves das Américas (Winkler et al., 2020). Os Passeriformes possuem o maior número de espécies analisadas por citogenética clássica (Santos e Gunski, 2006). Dentre os Furnariidae, apenas seis espécies foram descritas citogeneticamente - *Sittasomus griseicapillus* ( $2n = 82$ ), *Lepidocolaptes angustirostris* ( $2n = 82$ ), *Glyphorynchus spirurus* ( $2n = 80$ ), *Synallaxis frontalis* ( $2n = 82$ ), *Cranioleuca obsoleta* ( $2n = 82$ ) e *Syndactyla rufosuperciliata* ( $2n = 82$ ) (Barbosa et al., 2013; Ribas et al., 2018; Kretschmer et al., 2018a; Tura et al., 2023).

Diferentemente de outros tetrápodes, o genomas das aves possui apenas uma pequena quantidade de DNA repetitivo (4-10%) que desempenha papéis importantes na estrutura dos cromossomos e na organização do genoma (George et al., 2012). A relevância dessas sequências repetitivas na evolução dos cromossomos sexuais foi demonstrada nos últimos anos (Kretschmer et al., 2018b). Em Piciformes, foi observado a presença de sequências repetitivas nos cromossomos sexuais. De fato, a aplicação de sondas de microssatélites (SSRs) em três espécies de pica-paus mostra que o cromossomo Z é o maior elemento no cariótipo, devido a essas sequências (de Oliveira et al., 2017). A espécie *Myiopsitta monachus* possui o menor número diplóide entre os Psittaciformes e um grande cromossomo W, relacionado também a sequências de microssatélites (Furo et al., 2017). E, entre os Passeriformes, a alta quantidade dessas sequências encontradas no cromossomo W de andorinhas, esclarecendo o diferente tamanho deste cromossomo comparado a outros Passeriformes. Até o momento, apenas sete espécies de Passeriformes (*P. tapera*, *P. chalybea*, *P. cyanoleuca*, *S. flaveola*, *S. frontalis*, *C. obsoleta* e *S. rufosuperciliata*) foram analisadas com mapeamento cromossômico de SSRs por Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH), as quais três delas são furnarídeos (Barcellos et al., 2019; Kretschmer et al., 2021; Tura et al., 2023). Os dados ressaltam o impacto do DNA repetitivo na diferenciação dos cromossomos

sexuais (Barcellos et al., 2019). Na mesma perspectiva, espécies da subordem Oscines acumulam mais sequências repetitivas do que as Suboscines, mostrando que esses dois grupos tiveram trajetórias moleculares diferentes (Tura et al., 2023).

Informações sobre a distribuição do DNA ribossômico (rDNA) 18/28S e 5S são restritas a algumas espécies de aves, especialmente com o uso de sondas de FISH (Kretschmer et al., 2018b). Os genes rDNA são importantes para a função celular, pois codificam o rRNA envolvido na biogênese dos ribossomos (Shaw e Brown, 2012). A identificação dos cromossomos que carregam o rDNA 45S é realizada pela técnica de absorção de nitrato de prata (Ag-NOR) (Howell e Black, 1980). Experimentos de FISH são mais apropriados para esse tipo de estudo, pois identificam os cromossomos portadores usando sondas para os genes que compõem o agrupamento rDNA, mesmo quando eles não estão ativos (O'Connor, 2008). Nas aves, o local do rDNA 45S está predominantemente em um único par de microcromossomos. No entanto, variações deste padrão são encontradas, com algumas espécies tendo o rDNA localizado em mais de um par de microcromossomos ou em macrocromossomos (Degrandi et al., 2020b).

Os telômeros são sequências repetitivas de nucleotídeos localizadas nas regiões terminais dos cromossomos de eucariotos, funcionando como escudos para proteger os cromossomos de mecanismos de reparo do DNA (de Lange, 2009). No âmbito das investigações da evolução do cariótipo, um dos indicadores moleculares altamente promissores relacionados a rearranjos cromossômicos engloba os locais teloméricos intersticiais (ITSs), que se tornam discerníveis por meio de FISH empregando a sonda (TTAGGG)<sub>n</sub>, conforme explicado por Meyne et al. em 1990. A presença de ITSs foi revelada em toda a arquitetura cromossômica de quase todas as espécies de aves examinadas (Nanda et al., 2002). No entanto, a correspondência precisa entre a ocorrência de ITSs e as complexidades dos rearranjos cromossômicos dentro dos táxons de aves permanece escassa.

Apesar dos avanços recentes em estudos citogenéticos, ainda existem algumas relações incompreensíveis dentro da família Furnariidae com poucos dados sobre sua organização genômica. A fim de aprofundar nossa compreensão da evolução cromossômica em espécies de Furnariidae, foi utilizada uma combinação de metodologias citogenéticas convencionais e moleculares em *Heliobletus contaminatus*.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Amostras

Foi coletado um indivíduo da família Furnariidae (Passeriformes), *Heliobletus contaminatus* (01♀), através de redes de neblina tipo *mist nest*, posicionada em local sombreado na mata nativa no município de Santana da Boa Vista, Rio Grande do Sul (Brasil). A captura dos animais e coleta de amostras biológicas respeita os protocolos aprovados pelo Comitê de Ética Animal (CEUA 019/2020) e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO 61047-4, 33860-2 e 81564-1).

### 5.2.2 Preparações cromossômicas e citogenética clássica

Metáfases foram obtidas a partir de culturas de células de medula óssea em crescimento rápido (Garnero e Gunski, 2000). A análise de bandamento C foi realizada de acordo com Summer (1972), com pequenas modificações. Após incubação a 60°C por 1 hora, as lâminas foram tratadas com HCl 0,2 mol/L a 42°C por 10 minutos, em seguida com Ba(OH)<sub>2</sub> 5% (m/v) também a 42°C por 3 minutos e finalmente tratadas com 2xSSC a 60°C por 1 hora e 30 minutos. Os cromossomos foram corados usando Giemsa 0,5% (v/v) em tampão fosfato mol/L pH 6,8. O número de cromossomos foi determinado contando 20-30 metáfases.

### 5.2.3 Mapeamento de DNA Repetitivo por Hibridização in situ Fluorescente (FISH)

Para a detecção dos cromossomos portadores do DNA ribossômico 45S (rDNA), isolamos a sequência do gene 18S rDNA do genoma de *Gallus gallus* (Galliformes, Aves) utilizando os primers (5'-GGATCTTGGGATCGAGCTGG-3') e (5'-AGACACAAGCTGAGCCAGTC-3'), e marcamos em vermelho por nick-translation com Atto550-dUTP, seguindo as instruções do fabricante (Jena Biosciences, Jena, Alemanha). As sequências repetitivas (CAA)<sub>n</sub>, (CGG)<sub>n</sub>, (CAT)<sub>n</sub>, (GAG)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub>, (CAG)<sub>n</sub>, (CG)<sub>n</sub>, (GAA)<sub>n</sub> e (TA)<sub>n</sub> foram diretamente marcadas com Cy-3 durante a síntese (Kubat et al., 2008). Os experimentos de FISH foram realizados seguindo a metodologia descrita por Kretschmer e colaboradores (2022). Os cromossomos foram desnaturados por imersão em 70% de formamida a 72°C por 1 min e 20 seg, e as sondas foram desnaturadas a 80°C por 10 minutos e resfriadas a 4°C por pelo menos 5 minutos antes da hibridização. Os cromossomos foram corados com 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). O experimento de FISH foi realizado pelo menos duas vezes para confirmar os sinais de hibridação e, o número de metáfases analisadas para estabelecer o padrão obtido para cada sonda de microssatélite foi de 15 a 20.

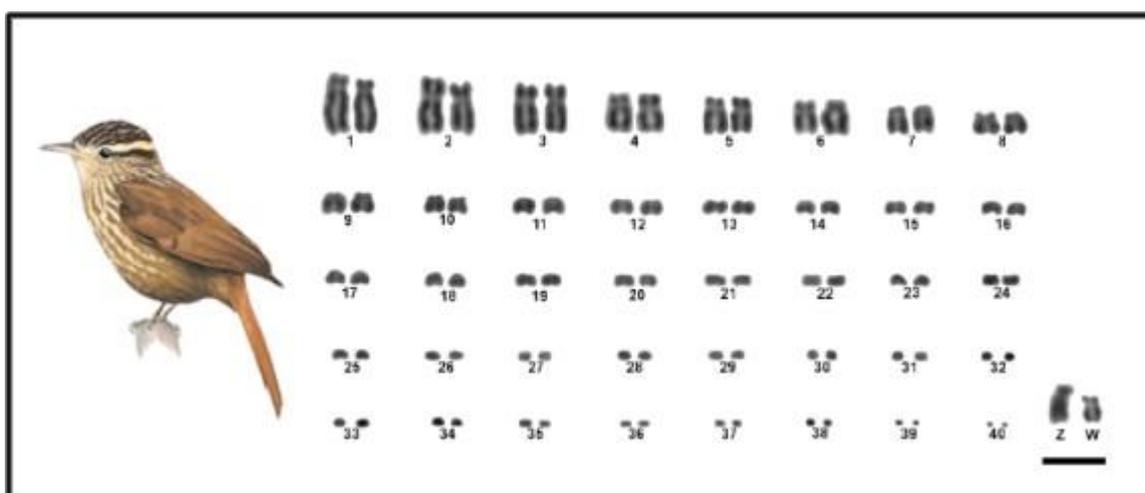
### 5.2.4 Microscopia e Processamento de Imagens

Para confirmar o número diplóide, a estrutura do cariótipo e os resultados de FISH, foram analisadas pelo menos 20 metáfases por indivíduo. As imagens foram capturadas utilizando um microscópio Olympus BX53 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japão). Os cromossomos foram organizados por tamanho e a morfologia foi classificada de acordo com a posição do centrômero (Guerra, 2004), como metacêntricos, submetacêntricos, acrocêntricos e telocêntricos. O *software* GNU Image Manipulation Program (GIMP) foi utilizado para montar os cariótipos.

## 5.3 RESULTADOS

### 5.3.1 Descrição cariotípica e bandeamento C

*Heliobletus contaminatus* apresenta um número diploide de  $2n = 82$ , em consonância com os cariótipos conservados frequentemente identificados dentro de Passeriformes. O par 1 é acrocêntrico, enquanto os pares 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e os cromossomos sexuais Z e W são submetacêntricos (Figura 1). Foi observada uma diferença de tamanho entre os cromossomos do par 2 em alguns cariótipos da espécie analisada (Figura 2; Tabela 1). Regiões de heterocromatina constitutiva foram detectadas nos microcromossomos da espécie, e o cromossomo W mostrou heterocromatina positiva somente na região telomérica do braço curto, enquanto o Z apresentou fracos sinais no braço curto. Enquanto isso, os pares 1 e 2 apresentaram marcações no centrômero e também blocos intersticiais localizados no braço longo (Figura 3).

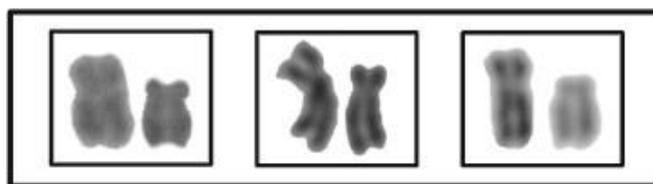


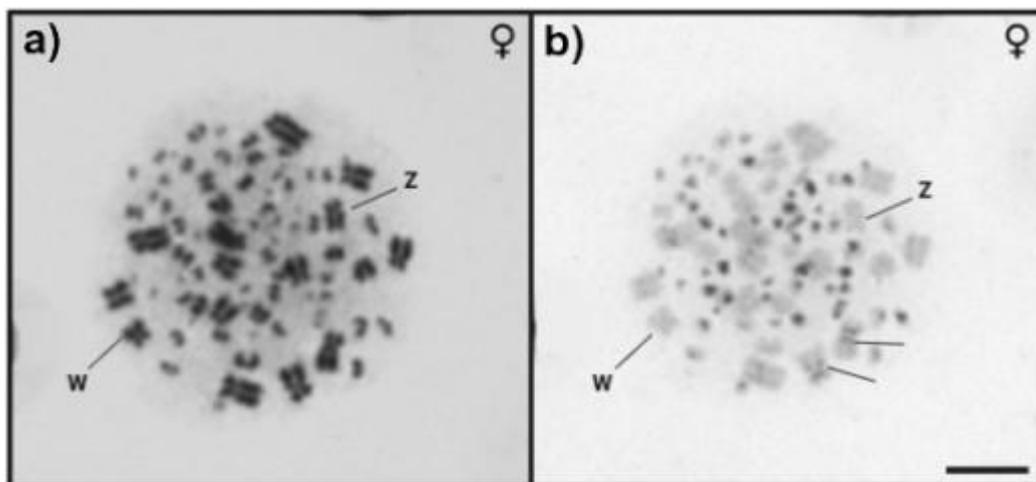
**Figura 1.** Cariótipo da espécie *H. contaminatus* ( $2n = 82$ ). Barra de escala = 5  $\mu\text{m}$ . Ilustração: Birds of the World

**Tabela 1:** Morfologia dos cromossomos de *H. contaminatus* por análise biométrica.

Cromossomo	r	ic	Tamanho médio	Desvio padrão	Morfologia
1	4,96	18,25	39,51	5,07	A
2	2,62	28,85	33,38	8,15	SM
3	3,16	25,27	31,51	4,90	SM
4	2,58	29,15	23,89	3,91	SM
5	2,81	28,33	23,74	2,88	SM
6	2,86	27,38	20,42	2,55	SM
7	3,96	26,53	19,19	3,57	SM
8	2,66	28,02	12,41	1,83	SM
9	2,79	26,65	12,39	1,76	SM
10	2,45	29,02	10,49	1,94	SM
Z	2,43	30,04	26,91	5,67	SM
W	2,29	31,45	16,66	1,82	SM

r = razão entre braços, ic = índice centromérico, A = Acrocêntrico, SM= Submetacêntrico

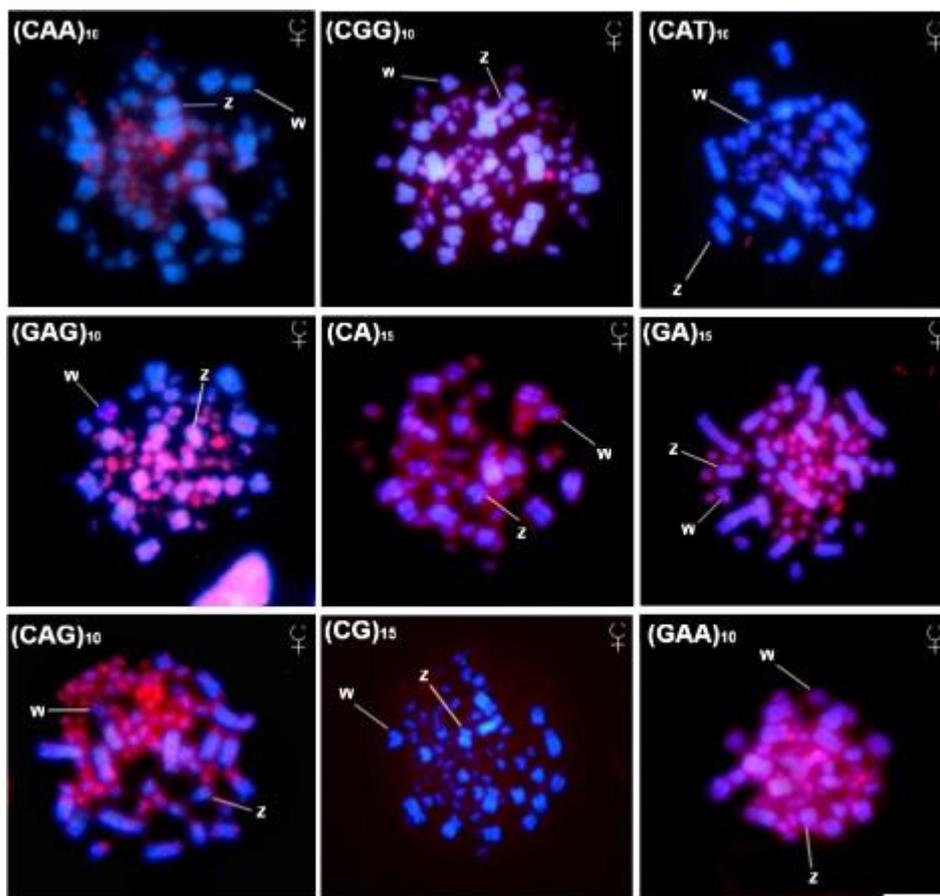
**Figura 2:** Alterações encontradas e observadas no par cromossômico 2 de *H. contaminatus*.



**Figura 3.** Análise sequencial de Giemsa (a) e Banda C (b) em cromossomos de *Heliobletus contaminatus* (fêmea). Cromossomos sexuais e blocos heterocromáticos intersticiais estão indicados. Barra de escala = 5  $\mu$ m.

### 5.3.2 Sequências simples repetitivas (SSRs)

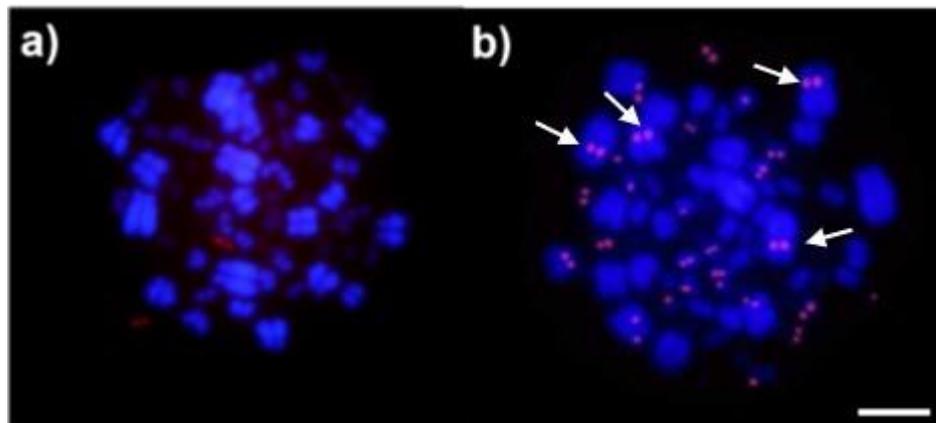
As sequências de microssatélites se acumularam principalmente nos microcromossomos, resultando em um padrão geral disperso (Figura 4). Observou-se sinais de  $(CAA)_n$  nos primeiros dois pares de macrocromossomos e no braço longo do Z. Entretanto, outras sequências hibridizam apenas em um par de microcromossomos, como  $(CGG)_n$  e  $(CAT)_n$ .  $(GAG)_n$  apresentou sinais fortes principalmente nos microcromossomos e no cromossomo W. A sequência  $(CA)_n$  também apresentou marcação nos cromossomos sexuais Z, no braço longo, e W, nas regiões terminais do braço longo, além de marcar em alguns pares de macrocromossomos. As sequências  $(GAG)_n$  e  $(CAG)_n$  foram as que mais apresentaram sinais em todos os cromossomos.  $(GAA)_n$  apresentou sinais somente nos microcromossomos. Das dez sondas utilizadas, duas não apresentaram nenhum sinal na espécie analisada,  $(CG)_n$  e  $(TA)_n$ .



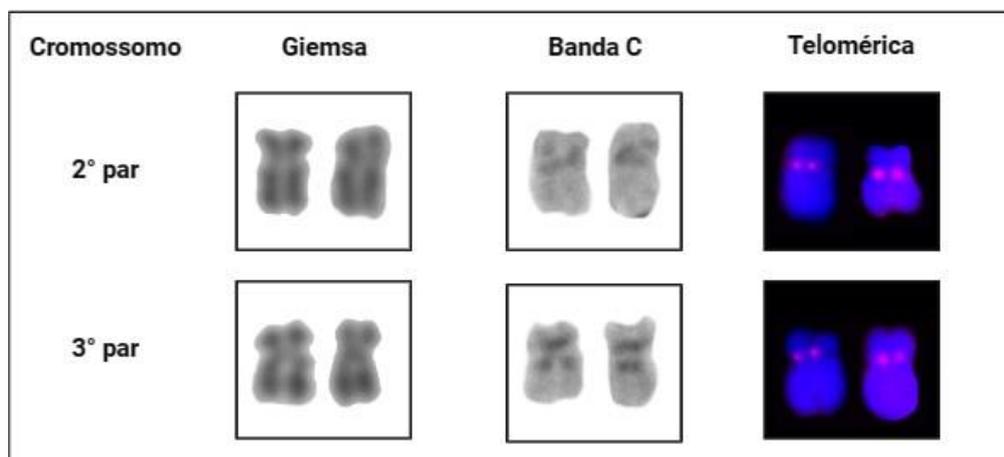
**Figura 4:** Mapeamento de microssatélites nos cromossomos de *Heliobletus contaminatus* (fêmea). Os cromossomos sexuais estão indicados nas imagens e cada sonda é destacada no canto superior esquerdo. Barra de escala = 5  $\mu$ m

### 5.3.3 rDNA e telomérica

*Clusters* de rDNA 18S foram encontrados em apenas um par de microcromossomos (Figura 5). Em experimentos utilizando sondas teloméricas (TTAGGG)<sub>5</sub>, foram encontrados sinais nas regiões terminais de todos os cromossomos, com exceção de sequências teloméricas intersticiais observadas na região telomérica dos pares 2 e 3 (Figura 6).



**Figura 5:** Localização das sequências 18S rDNA (a) e telomérica (b) em metáfases de fêmea de *H. contaminatus*. As setas indicam marcações intersticiais (ITS). Barra de escala = 5  $\mu$ m



**Figura 6:** Análises sequenciais de Giemsa, Banda C e Sequência Telomérica do 2° e 3° pares cromossômicos de *H. contaminatus*. Observou-se blocos heterocromáticos e a presença de sequências teloméricas intersticiais em ambos os cromossomos e nas mesmas regiões.

## 5.4 DISCUSSÃO

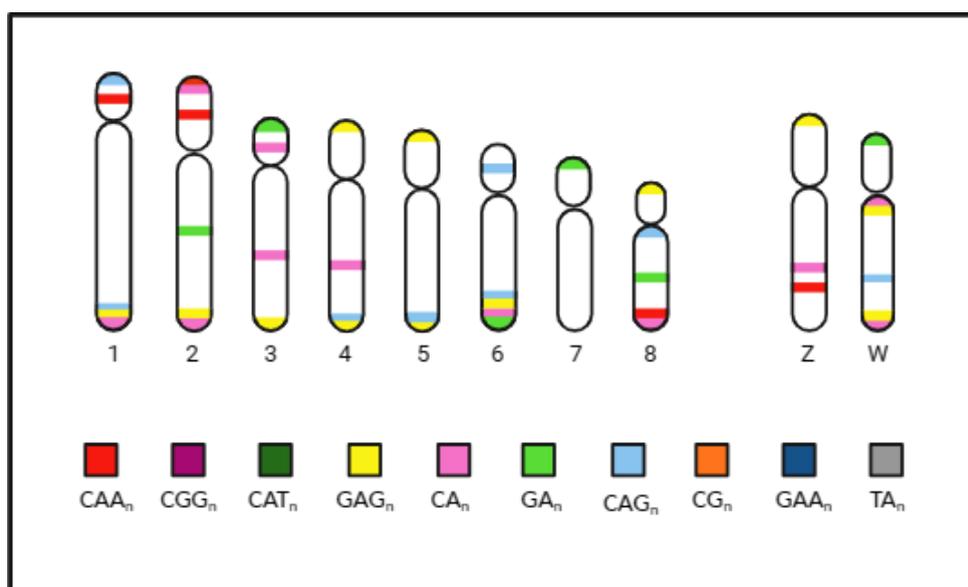
A espécie descrita neste trabalho, *H. contaminatus* (trepadorzinho), mostrou um número diploide conservado de 82 cromossomos, em concordância com pesquisas prévias na mesma família (Barbosa et al., 2013; Ribas et al., 2018; Kretschmer et al., 2018a, Tura et al., 2023). O primeiro par de *H. contaminatus* apresentou morfologia acrocêntrica, enquanto o par 2 é submetacêntrico, semelhante aos das espécies *S. rufosuperciliata* e *C. obsoleta* (Tura et al., 2023). O cromossomo sexual Z de *H. contaminatus* é submetacêntrico, como visto em *Synallaxis frontalis* (Kretschmer et al., 2018a; de Souza et al., 2020) e o W também é submetacêntrico, diferente de *C. obsoleta* e *S. rufosuperciliata*, em que o W é acrocêntrico

(Tura et al., 2023). Observaram-se bandas C-positivas em regiões intersticiais nos pares 2 e 3 de macrocromossomos e marcações fortes nos microcromossomos. A acumulação de heterocromatina constitutiva nos cromossomos sexuais é um evento comum na trajetória da evolução cromossômica dos Passeriformes, todavia, *H. contaminatus* mostra padrões distintos. O cromossomo sexual Z não apresentou heterocromatina (Figura 2). O cromossomo W foi encontrado sinais apenas na região telomérica, divergente do comumente visto em Passeriformes (dos Santos et al., 2015; Barcellos et al., 2019).

A espécie de Furnariidae analisada apresenta um padrão de hibridização de DNA repetitivo que abrange tanto os macrocromossomos quanto os microcromossomos, bem como os cromossomos sexuais (Figuras 4 e 7). A sequência  $(GAA)_n$  foi utilizada em todas as espécies de aves previamente estudadas por meio de microssatélites e, em todas as espécies, essa sequência demonstrou um padrão de marcações significativas. Nota-se que em outros furnariídeos, *S. frontalis* e *S. rufosuperciliata* não exibiram essa sequência em suas análises (Tura et al., 2023). No entanto, em *H. contaminatus* observou-se sinais fortes dessa sequência nos microcromossomos. Já  $(CGG)_n$  foi encontrada somente nos microcromossomos, característica comum com as andorinhas (Passeriformes), como reportado por Barcellos et al., (2019), enquanto em *Nyctibius griseus* (Nyctibiiformes) ela é encontrada no cromossomo sexual W (de Souza et al., 2020). A sequência de microssatélite  $(CAA)_n$  foi identificada nos pares 1, 2 e 8, além de aparecer no braço longo do cromossomo Z. Essa sequência foi observada também no cromossomo Z do canário da terra e em espécies de andorinhas, no cromossomo W (Barcellos et al., 2019; Kretschmer et al., 2021).

Adicionalmente,  $(CAT)_n$  exclusivamente detectado em microcromossomos, em contraposição a outras espécies pertencentes a mesma ordem, como em *P. cyanoleuca* e *P. tapera*, onde a mesma foi observada tanto nas regiões teloméricas de macrocromossomos quanto no cromossomo W (Barcellos et al., 2019). A sequência  $(CAG)_n$  mostra-se presente nas regiões teloméricas dos pares 1, 4, 5, 6 e 8 do trepadorzinho, além do braço longo do W, característica compartilhada com o W de espécies de andorinhas e com o cromossomo Z do canário-da-terra (Barcellos et al., 2019; Kretschmer et al., 2021). No entanto  $(GAG)_n$  mostra um padrão disperso e presente em todos os cromossomos, menos no par 7, um padrão diferente visto em furnariídeos, os quais *S. frontalis* e *S. rufosuperciliata* não foram detectados sinais desta sequência (Tura et al., 2023). A sequência  $(CA)_n$  mostrou-se presente em macro e microcromossomos, com marcação também no braço longo do cromossomo Z. Em todos os outros furnariídeos analisados até hoje por essa sequência, identificou-se sinais somente nos microcromossomos de *C. obsoleta*, *S. rufosuperciliata*, e no cromossomos W de

*S. frontalis*. A sequência  $(TA)_n$  não apresentou sinais em nenhum dos cromossomos em *H. contaminatus*. Não obstante, cabe ressaltar que esta investigação representa a primeira análise desta sequência em furnarídeos. Em outras aves da ordem Passeriformes, verificou-se uma presença significativa dessa sequência em microcromossomos, bem como no cromossomo W. (Barcellos et al., 2019). A sequência  $(CG)_n$  também não apresentou sinais em *H. contaminatus*, traço em comum com outros Passeriformes analisados até hoje, sugerindo que esta característica pode ter sido adquirida antes da divisão das ordens.



**Figura 7:** Ideograma representando a distribuição e localização de sequências de microsatélites nos pares de cromossomos 1-8, Z e W de *H. contaminatus*.

Apesar de sua posição filogenética, *H. contaminatus* manteve o caráter plesiomórfico de apresentar clusters de 18S rDNA em apenas um par de microcromossomos (Figura 5a), como ocorre na maioria das espécies de aves analisadas até o momento, incluindo alguns grupos basais como Paleognatas (*Rhea americana*, *Crypturellus tataupa*, *Tinamus solitarius* e *Pterocnemia pennata*) (Garnero et al., 2006; Nishida-Umehara et al., 2007; Degrandi et al., 2020b). A organização genômica dessas sequências é altamente variável, mas, na maioria das espécies de aves, incluindo espécies basais como o emu (*Dromaius novaehollandiae*), esses genes são tipicamente encontrados em um único par de microcromossomos (Nishida et al., 2007).

Os telômeros desempenham um papel crucial na preservação da estabilidade e funcionalidade dessas estruturas genéticas (Nanda, 2002). A utilização de sondas contendo

sequências teloméricas em *H. contaminatus* revelou, além de sinais nos telômeros de todos os cromossomos, marcações intersticiais (ITS) nos pares 2 e 3 (Figura 5b). Adicionalmente, esses locais não teloméricos coincidiram com blocos de heterocromatina constitutiva centromérica (Figura 6), indicando possíveis vestígios de fusões cromossômicas, como já relatado em aves e outros vertebrados como mamíferos, peixes, répteis e anfíbios (Meyne et al., 1990; Nanda et al., 2002; Nishida et al., 2007; Rovatsos et al., 2011; Rovatsos et al., 2014; Schmid e Steinlein, 2016; de Oliveita et al., 2017; Mazzoleni et al., 2017; Srikulnath et al., 2019). Em alguns casos, as sequências teloméricas antigas e não funcionais podem ser mantidas no ponto de fusão, resultando em um sinal de hibridização (TTAGGG)<sub>n</sub> na região pericentromérica. Os telômeros desempenham um papel crucial na preservação da estabilidade e funcionalidade dessas estruturas genéticas (Nanda, 2002). As regiões centroméricas dos cromossomos consistem em uma variedade de famílias de DNA repetitivo, e esses elementos repetitivos têm uma tendência a serem duplicados, amplificados ou transpostos ao longo do tempo (Horvath et al., 2000). Quando ocorre uma fusão cromossômica, um dos resultados pode ser a redução ou até mesmo a completa perda das sequências teloméricas, porém, em *H. contaminatus* sugerimos duas hipóteses: i) que sequências teloméricas antigas e não funcionais foram mantidas no ponto de fusão, resultando em sinais de hibridização; ii) sequências repetitivas acabaram ficando semelhantes à sequências teloméricas.

Considerando que a espécie *H. contaminatus* apresenta rearranjos cromossômicos em sua trajetória evolutiva é importante ressaltar que estudos comparativos de genética de aves sugerem que as fusões e fissões cromossômicas (rearranjos robertsonianos) desempenharam um papel importante na diversificação de padrões cariotípicos nas aves existentes (Kretschmer et al., 2018b). Um exemplo de ITS no braço longo de um macrocromossomo é na espécie *Falco columbarius*, fato que foi fundamental para a identificação de uma fusão ancestral (Nishida et al., 2008). A observação de que, apesar da extensa conservação de sintenia, os padrões de hibridização intersticiais de (TTAGGG)<sub>n</sub> são altamente variáveis entre espécies de aves e sugere que rearranjos genômicos envolvendo os locais intersticiais ocorreram durante a radiação das aves (Nanda, 2002). Por outro lado, o encurtamento gradual e a degradação de matrizes não funcionais podem resultar na perda de locais de hibridização não teloméricos de (TTAGGG)<sub>n</sub> (Nanda, 2002). Embora *H. contaminatus* (Suboscines) tenha revelado a presença de ITS, é importante notar que estudo em espécies pertencentes a quatro famílias distintas de Suboscines e Oscines não identificaram quaisquer ITS (Rodrigues et al., 2018 e dos Santos et al., 2017). Por outro lado,

pesquisas realizadas em aves das famílias Turdidae e Fringillidae relataram a ocorrência de numerosas ITS, como descrito por Derjusheva et al. (2004) e Nanda (2002).

## 5.5 CONCLUSÃO

Foi realizada a análise citogenética da espécie *Heliobletus contaminatus* (Furnariidae, Passeriformes), fornecendo uma compreensão de sua organização e evolução cromossômica. O cariótipo descrito ( $2n = 82$ ) apresenta um padrão típico de aves. Nosso mapeamento cromossômico de SSRs revelou uma diferenciação razoável com outros furnarídeos. Em termos do cromossomo W, a espécie acumulou sequências repetitivas. Foi também evidenciada possíveis fusões cromossômicas na evolução cariotípica da espécie. Para estabelecer a presença de um padrão comum de organização de sequências e rearranjos cromossômicos entre os demais membros da família, são necessários estudos adicionais como a pintura cromossômica, no entanto, é crucial ampliar o número de exemplares.

**REFERÊNCIAS**

BARBOSA, M.O.; SILVA, R.B.; CORREIA, V.C.S.; SANTOS, L.P.; GARNERO, A.D.V.; GUNSKI, R.J. Nucleolar organizer regions in *Sittasomus griseicapillus* and *Lepidocolaptes angustirostris* (Aves, Dendrocolaptidae): evidence of a chromosome inversion. **Genetics and Molecular Biology**, 2013, 36 (1), 070–073. doi:10.1590/S1415-47572013000100010

BARCELLOS, S.A.; DE SOUZA, M.S.; TURA, V.; PEREIRA, L.R.; KRETSCHMER, R.; GUNSKI, R.J. Direct Chromosome Preparation Method in Avian Embryos for Cytogenetic Studies: Quick, Easy and Cheap. **DNA**, 2022, 2, 22-29. <https://doi.org/10.3390/dna2010002>

BARCELLOS, S.A.; KRETSCHMER, R.; DE SOUZA, M.S.; COSTA, A.L.; DEGRANDI, T.M.; DOS SANTOS, M. S. et al., Karyotype Evolution and Distinct Evolutionary History of the W Chromosomes in Swallows (Aves, Passeriformes). **Cytogenetic and Genome Research**, 2019, 158(2), 98-105. doi:10.1159/000500621

CAZAUX, B.; CATALAN, J.; VEYRUNES, F.; DOUZERY, E.J.; BRITTON-DAVIDIAN, J. Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots? A case study in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). **BMC Evol Biol**. 2011, 11:124

DE LANGE, T. How telomeres solve the end-protection problem. **Science**, 2009, 326(5955), 948-952.

DE OLIVEIRA, T.D.; KRETSCHMER, R.; BERTOCCHI, N.A.; DEGRANDI, T. M.; DE OLIVEIRA, E.H.C.; CIOFFI, M.D.B. et al. Genomic organization of repetitive DNA in woodpeckers (Aves, Piciformes): Implications for karyotype and ZW sex chromosome differentiation. **PLoS One**, 2017, 12(1), e0169987.

DE SOUZA, M.S.; KRETSCHMER, R.; BARCELLOS, S.A.; COSTA, A.L.; CIOFFI, M.B.; DE OLIVEIRA, E.H.C. et al. Repeat Sequence Mapping Shows Different W Chromosome Evolutionary Pathways in Two Caprimulgiformes Families. **Birds**, 2020, 1(1), 19–34. doi:10.3390/birds1010004

DE SOUZA, M.S.D.; BARCELLOS, S.A.; COSTA, A.L.; KRETSCHMER, R.; GARNERO, A.D.V.; GUNSKI, R.J. Polymorphism of Sooty-fronted Spinetail (*Synallaxis frontalis* Aves: Furnariidae): Evidence of chromosomal rearrangements by pericentric inversion in autosomal macrochromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, 2019, 42, 62-67

DEGRANDI, T.M.; BARCELLOS, S.A.; COSTA, A.L.; GARNERO, A.D.V.; HASS, I.; GUNSKI, R.J. Introducing the Bird Chromosome Database: An Overview of Cytogenetic Studies in Birds. **Cytogenetic and Genome Research**, 2020a, 160(4), 199-205. doi:10.1159/000507768

DEGRANDI, T.M.; GUNSKI, R.J.; GARNERO, A.D.V.; OLIVEIRA, E.H.C.D.; KRETSCHMER, R., SOUZA, M.S. et al. The distribution of 45S rDNA sites in bird

chromosomes suggests multiple evolutionary histories. **Genetics and Molecular Biology**, 2020a, 43.

DERJUSHEVA, S.; KURGANOVA, A.; HABERMAN, F.; GAGINSKAIA, E. high chromosome conservation detected by comparative chromosome painting in chicken, pigeon and passerine birds. **Chromosome Research**, 2004, 12, 715–723

DOS SANTOS, M.S.; KRETSCHMER, R.; SILVA, F.A.O.; LEDESMA, M.A.; O'BRIEN, P.C.M. et al. Intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus *Saltator* (Thraupidae, Passeriformes) and the occurrence of heteromorphic Z chromosomes. **Genetica**, 2015, 143:535–543.

DOS SANTOS, M.S.; KRETSCHMER, R.; FRANKL-VILCHES, C.; BAKKER, A.; GAHR, M.; O'BRIEN, P.C.M. et al. Comparative Cytogenetics between Two Important Songbird Models: The Zebra Finch and the Canary. **PLoS One**, 2017, 12(1), e0170997. doi:10.1371/journal.pone.0170997

FURO, I.O.; KRETSCHMER, R.; DOS SANTOS, M.S.; DE LIMA C.C.A.; GUNSKI, R.J.; O'BRIEN, P.C.M. et al. Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Myiopsitta monachus* and *Amazona aestiva* (Psittaciformes, Psittacidae) with Emphasis on the Sex Chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, 2017 151(3), 151-160. doi:10.1159/000464458

GARNERO, A.V.; GUNSKI, R.J. Comparative analysis of the karyotype of *Nothura maculosa* and *Rynchotus rufescens* (Aves: Tinamidae). A case of chromosomal polymorphism. **Nucleus**, 2000, 243:64–70

GARNERO, A.V.; LEDESMA, M.A.; GUNSKI, R.J. Alta homeologia cariotípica na família Tinamidae (Aves: Tinamiformes). 2006, **Revista Brasileira de Ornitologia**, 14(1), 53-58.

GEORGE, C.M.; ALANI, E. Multiple cellular mechanisms prevent chromosomal rearrangements involving repetitive DNA. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, 2012, 47(3), 297-313.

GUERRA, M. (2004). FISH: Conceitos e aplicações na citogenética. Sociedade Brasileira de Genética.

HORVATH, J. E.; SCHWARTZ, S.; EICHLER, E.E. The mosaic structure of human pericentromeric DNA: a strategy for characterizing complex regions of the human genome. **Genome Research**, 2000, 10(6), 839-852.

HOWELL, W.T.; BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, 1980, 36(8), 1014-1015.

HUANG J.; MA, L.; YANG, F.; FEI, S.Z.; LI, L. 45S rDNA regions are chromosome fragile sites expressed as gaps in vitro on metaphase chromosomes of root-tip meristematic cells in *Lolium spp.* **PLoS One**, 2008, 3(5):e2167

KRETSCHMER R.; SANTOS M.S.; FURO, I.O.; DE OLIVEIRA E.H.C.; CIOFFI M.B.; FISH-in birds. (2022) In: Liehr T, editor. Cytogenetics and Molecular Cytogenetics. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; p. 263–76.

KRETSCHMER, R., DE LIMA, V.L.C., DE SOUZA, M.S., COSTA, A.L., O'BRIEN, P.C., FERGUSON-SMITH, M. A. et al. Multidirectional chromosome painting in *Synallaxis frontalis* (Passeriformes, Furnariidae) reveals high chromosomal reorganization, involving fissions and inversions. **Comparative cytogenetics**, 2018a, 12(1), 97.

KRETSCHMER, R., FERGUSON-SMITH, M.A.; DE OLIVEIRA, E. H. C. Karyotype Evolution in Birds: From Conventional Staining to Chromosome Painting. **Genes**, 2018b, 9: 181.

KRETSCHMER, R.; RODRIGUES, B.S.; BARCELLOS, S.A.; COSTA, AL.; CIOFFI, M.B.; GARNERO, A.D.V. et al. Karyotype Evolution and Genomic Organization of Repetitive DNAs in the Saffron Finch, *Sicalis flaveola* (Passeriformes, Aves). **Animals**, 2021, 11(5), 1456. doi:10.3390/ani11051456

KUBAT, Z.; DEJONG, H.; HOBZA, R.; VYSKOT, B.; KEJNOVSKY, E. Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. **Genome**, 2008, 51(5), 350–356. doi:10.1139/g08-024

MAZZOLENI, S.; SCHILLACI, O.; SINEO, L.; DUMAS, F. Distribution of interstitial telomeric sequences in primates and the pygmy tree shrew (Scandentia). **Cytogenetic and Genome Research**, 2017, 151(3), 141-150.

MEYNE, J.; BAKER, R.J.; HOBART, H.H.; HSU, T.C.; RYDER, O.A.; WARD, O.G. et al. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. **Chromosoma**, 1990, 99, 3-10.

MOYLE, R.G.; R. TERRY, C.; ROBB, T.B.; TELLO, J.G.; MARCHESE, D.J.; CRACRAFT, J. Phylogeny and phylogenetic classification of the antbirds, ovenbirds, woodcreepers, and allies (Aves: Passeriformes: infraorder Furnariides). **Cladistics**, 2009, 25(4), 386–405. doi:10.1111/j.1096-0031.2009.00259.x

NANDA, I.; KARL, E.; GRIFFIN, D.K.; SCHARTL, M.; SCHMID, M. Chromosome repatterning in three representative parrots (Psittaciformes) inferred from comparative chromosome painting. **Cytogenetic and Genome Research**, 2007, 117(1-4), 43–53. doi:10.1159/000103164

NANDA, I.; SCHRAMA, D.; FEICHTINGER, W.; HAAF, T.; SCHARTL, M.; SCHMID, M. Distribution of telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in avian chromosomes. **Chromosoma**, 2002, 111(4), 215–227. doi:10.1007/s00412-002-0206-4

NISHIDA, C.; ISHIJIMA, J.; ISHISHITA, S.; YAMADA, K.; GRIFFIN, D.K.; YAMAZAKI, T.; MATSUDA, Y.. Karyotype Reorganization with Conserved Genomic

Compartmentalization in Dot-Shaped Microchromosomes in the Japanese Mountain Hawk-Eagle (*Nisaetus nipalensis orientalis*, Accipitridae). **Cytogenetic and Genome Research**, 2013, 141(4), 284–294. doi:10.1159/000352067

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**, 2008, 16(1), 171–181. doi:10.1007/s10577-007-1210-6

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**, 2007, 15, 721-734.

O'CONNOR, R.E.; ROMANOV, M.N.; KIAZIM, L.G.; BARRETT, P.M.; FARRÉ, M.; DAMAS, J. et al. Reconstruction of the diapsid ancestral genome permits chromosome evolution tracing in avian and non-avian dinosaurs. **Nature communications**, 2018, 9(1), 1883.

RIBAS, T.F.A.; NAGAMACHI, C.Y.; ALEIXO, A.; PINHEIRO, M.L.S.; O' BRIEN, P.C.M.; FERGUSON-SMITH, M.A.; PIECZARKA, J.C. et al. Chromosome painting in *Glyphorynchus spirurus* (Vieillot, 1819) detects a new fission in Passeriformes. **PLoS One**, 2018, 13(8), e0202040.

RODRIGUES, B.S.; KRETSCHMER, R.; GUNSKI, R.J.; GARNERO, A.D.V.; O'BRIEN, P.C.M.; FERGUSON-SMITH, M.; DE OLIVEIRA, E.H.C. Chromosome Painting in Tyrant Flycatchers Confirms a Set of Inversions Shared by Oscines and Suboscines (Aves, Passeriformes). **Cytogenetic and Genome Research**, 2018, 153(4), 205-212. doi:10.1159/000486975

ROVATSOS, M.T.; MARCHAL, J.A.; ROMERO-FERNÁNDEZ, I.; CANO-LINARES, M.; FERNÁNDEZ, F.J.; GIAGIA-ATHANASOPOULOU, E.B.; SÁNCHEZ, A. Molecular and physical characterization of the complex pericentromeric heterochromatin of the vole species *Microtus thomasi*. **Cytogenetic and Genome Research**, 2014, 144(2), 131-141.

ROVATSOS, M.T.; MARCHAL, J.A.; ROMERO-FERNÁNDEZ, I.; FERNÁNDEZ, F.J.; GIAGIA-ATHANASOPOULOU, E.B.; SÁNCHEZ, A. Rapid, independent, and extensive amplification of telomeric repeats in pericentromeric regions in karyotypes of arvicoline rodents. **Chromosome Research**, 2011, 19, 869-882.

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

SCHERTHAN, H.; JERRATSCH, M.; LI, B.; SMITH, S.; HULTÉN, M.; LOCK, T.; DE LANGE, T. Mammalian meiotic telomeres: protein composition and redistribution in relation to nuclear pores. **Molecular biology of the cell**, 2000, 11(12), 4189-4203.

SCHMID, M.; STEINLEIN, C. Chromosome banding in Amphibia. XXXIV. Intrachromosomal telomeric DNA sequences in Anura. **Cytogenetic and Genome Research**, 2016, 148(2-3), 211-226

SRIKULNATH, K.; AZAD, B.; SINGCHAT, W.; EZAZ, T. Distribution and amplification of interstitial telomeric sequences (ITSs) in Australian dragon lizards support frequent chromosome fusions in Iguania. **PLoS One**, 2019, 14(2), e0212683.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp Cell Research**, 1972, 75(1):304–6.

TURA V.; KRETSCHMER, R.; SASSI, F.M.C.; DE MORAES R.L.R.; BARCELLOS S.A.; DE ROSSO, V.O. et al. Chromosomal evolution of Suboscines: Karyotype diversity and evolutionary trends in Ovenbirds (Passeriformes, Furnariidae). **Cytogenetic Genome Research**, 2023, 644-656. doi: 10.1159/000530428.

WINKLER, D.W.; BILLERMAN, .M.; LOVETTE, I.J. (2020). Ovenbirds and Woodcreepers (Furnariidae), version 1.0. In *Birds of the World* (S. M. Billerman, B. K. Keeney, P. G. Rodewald, and T. S. Schulenberg, Editors). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA. <https://doi.org/10.2173/bow.furnar2.01>

## 6. CAPÍTULO 3

**Este capítulo será enviado como artigo para a revista “Cytogenetic and Genome Research”**

**DESCRIÇÃO CARIOTÍPICA DE *Anumbius annumbi* (FURNARIIDAE):  
CROMOSSOMO Z REVELA UMA SINGULARIDADE EVOLUTIVA EM  
PASSERIFORMES**

## Descrição cariotípica de *Anumbius annumbi*: cromossomo Z revela uma singularidade evolutiva em Passeriformes

Victoria Tura<sup>1</sup>, Vitor Oliveira de Rosso<sup>1</sup>, Suziane Alves Barcellos<sup>1</sup>, Marcelo Santos de Souza<sup>1</sup>, Rafael Kretschmer<sup>2</sup>, Fabiano Pimentel Torres<sup>1</sup>, Edivaldo Herculano Correa de Oliveira<sup>3</sup>, Ricardo José Gunski e Analía del Valle Garneró<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Diversidade Genética Animal, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel 97300-162, Brasil; <sup>2</sup> Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 96010-900, Brasil; <sup>3</sup> Laboratório de Tecidos e Citogenética, SAMAM, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua 67030-000, Pará, Brazil.

### RESUMO

Entre as aves, as espécies com o sistema de determinação de sexo ZZ/ZW geralmente apresentam diferenças significativas na morfologia e no tamanho entre os cromossomos Z e W (sendo o W geralmente de menor tamanho que o Z). No presente estudo relatamos pela primeira vez o cariótipo do cochicho (*Anumbius annumbi* - Furnariidae) por meio de citogenética clássica e molecular, incluindo mapeamento de sequências repetitivas (GA)<sub>n</sub>, (GAG)<sub>n</sub>, (CG)<sub>n</sub>, (CGG)<sub>n</sub> e (CAG)<sub>n</sub> por meio de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH). A espécie possui 2n = 82 (11 pares de macrocromossomos e 30 pares de microcromossomos) com o cromossomo Z sendo o maior do complemento, fato incomum e nunca relatado em Passeriformes. O mapeamento cromossômico de sequências simples repetitivas (SSRs) revelou variações em algumas sequências comparadas a outros Passeriformes. As sequências de microssatélites se acumularam nos macro e microcromossomos, e observamos que três dessas sequências estão notavelmente amplificadas no cromossomo Z da espécie *A. annumbi*. Esse acúmulo pode fornecer uma explicação para o fato de o cromossomo Z ser o maior elemento no cariótipo desta espécie. De modo geral, os resultados implicam que essa espécie de Furnariidae (*A. annumbi*) tem um alto grau de conservação cromossômica, apesar do cromossomo Z ser incomum, mas é necessário conduzir análises adicionais utilizando sequências repetitivas e realizar pintura cromossômica com sondas de cromossomos inteiros para uma compreensão mais completa dessa dimensão.

## 6.1 INTRODUÇÃO

A Família Furnariidae (Aves, Passeriformes) representa um grupo com 307 espécies distribuídas por toda a região neotropical, ocupando uma ampla diversidade de biomas terrestres e tipos de habitats (Winkler et al., 2020). De acordo com Marcondes e Brumfield (2019), as espécies de furnarídeos evoluíram para apresentar plumagens mais escuras em ambientes com menor luminosidade. Dentre os furnarídeos, a espécie *Anumbius annumbi*, única do gênero *Anumbius*, vive em áreas semiabertas, e sua dieta consiste em insetos, suas larvas e ovos que caçam no chão (Winkler et al., 2020).

Os cromossomos das aves podem ser divididos em dois grupos distintos em termos de tamanho: macrocromossomos e microcromossomos. Os macrocromossomos, que compreendem os primeiros 10 pares de cromossomos, geralmente têm um comprimento de 5-6  $\mu\text{m}$ , enquanto os microcromossomos são mais numerosos e possuem menos de 2,5  $\mu\text{m}$  de comprimento (Rodionov, 1996; Ellegren, 2010). Quanto ao sistema de cromossomos sexuais, as fêmeas são heterogaméticas (ZW), enquanto os machos homogaméticos (ZZ) (Wang et al., 2014). A única exceção descrita até o momento é *Pygoscelis adeliae* (Sphenisciformes) com um sistema de cromossomos sexuais múltiplos: os machos têm os cromossomos  $Z_1Z_1Z_2Z_2$  e as fêmeas têm cromossomos  $Z_1Z_2W$  (Gunki et al., 2017). A maioria das espécies de aves possui um número diplóide ( $2n$ ) elevado, com aproximadamente 80 cromossomos (Degrandi et al., 2020), e os furnarídeos também não fogem desse padrão, apresentando  $2n$  entre 80 e 82 cromossomos (Barbosa et al., 2013; Ribas et al., 2018; de Souza et al., 2019; Tura et al., 2023).

O cromossomo Z contém de 7% a 10% do genoma, é conservado em tamanho e em geral apresenta o tamanho do quarto ou quinto maior par cromossômico, mas com a morfologia variável, devido a rearranjos que são comuns para este elemento do genoma (Nanda, 2002). O cromossomo W é heterocromático e possui alta variabilidade de tamanho em diferentes espécies, contudo geralmente é menor que o cromossomo Z (Schmid et al., 2005). Os Passeriformes possuem o maior número de espécies analisadas por citogenética clássica (Santos e Gunki, 2006). Apesar da família Furnariidae ser a quarta maior família de aves das Américas (Winkler et al., 2020), apenas seis espécies foram descritas citogeneticamente (*Sittasomus griseicapillus*, *Lepidocolaptes angustirostris*, *Glyphorynchus spirurus*, *Synallaxis frontalis*, *Cranioleuca obsoleta* e *Syndactyla rufosuperciliata*) (Barbosa et al., 2013; Ribas et al., 2018; de Souza et al., 2019; Tura et al., 2023). Todas as espécies apresentaram número diploide padrão visto em outros Passeriformes (Degrandi et al., 2020).

O DNA repetitivo é composto por sequências idênticas ou semelhantes que podem estar dispostas em tandem (uma ao lado da outra) ou dispersas por todo o genoma (Martins, 2007). Com o avanço nas técnicas de sequenciamento e anotação de genomas, ficou evidente que essa fração do genoma é mais extensa do que se imaginava inicialmente (Kordis, 2010; Zhang et al., 2014). Os microssatélites ou SSRs (repetições de sequências simples) são pequenas repetições dispostas em tandem intercaladas em todo o genoma dos eucariotos, e podem estar associadas à heterocromatina ou em regiões eucromáticas (Martins, 2007). A família Picidae (pica-paus) apresenta a maior proporção de sequências repetitivas no genoma entre as aves, atingindo até 22% da quantidade total de DNA na espécie *Picoides pubescens*, onde o elemento transponível CR1 é um dos componentes mais importantes (de Oliveira et al., 2017; Bertocchi et al., 2018). Até o momento, apenas sete espécies de Passeriformes (*P. tapera*, *P. chalybea*, *P. cyanoleuca*, *S. flaveola*, *S. frontalis*, *C. obsoleta* e *S. rufosuperciliata*) foram analisadas com mapeamento cromossômico de SSRs. Kretschmer e colaboradores (2021a) compararam três SSRs em comum em Passeriformes, e fica claro que esta ordem tem um maior número de sinais do que as espécies de Psittaciformes (Furo et al., 2017), por exemplo, sugerindo que essas sequências não estão envolvidas na grande diferença observada na organização cariotípica entre Passeriformes e Psittaciformes.

Até o momento, existe apenas um estudo publicado envolvendo sequências repetitivas em Suboscines. Sequências repetitivas foram encontradas dispersas tanto em macrocromossomos quanto em microcromossomos de três espécies da família Furnariidae. Além disso, foram observados sinais localizados nas regiões teloméricas dos cromossomos sexuais e, de modo geral, os resultados implicam que essas espécies de Furnariidae têm um alto grau de conservação cromossômica, além de ser observada uma diferenciação de sequências repetitivas em ambas as subordens de Passeriformes (Suboscines e Oscines) (Tura et al., 2023). Um padrão notável de hibridização de SSRs tem sido documentado nos cromossomos sexuais das aves. Em geral, as SSRs tendem a se acumular nos cromossomos sexuais W (Furo et al., 2017; Barcellos et al., 2019; Gunski et al., 2019; Kretschmer et al., 2021b). Por outro lado, os Piciformes apresentaram extensos sinais de hibridização de SSRs no cromossomo Z em todas as espécies analisadas até o momento, sugerindo que isso pode ser a principal causa de seu aumento de tamanho (de Oliveira et al., 2017; Kretschmer et al., 2020). Portanto, esses estudos enfatizam o papel da acumulação de DNAs repetitivos específicos de cada espécie nos cromossomos sexuais das aves.

A seguir, apresentamos informações citogenéticas detalhadas para o *Anumbius annumbi* (Cochicho), incluindo a análise do cariótipo padrão corado com Giemsa (descrito

aqui pela primeira vez), bandamento C e mapeamento de DNA repetitivo por meio de FISH. Esses dados promoverão uma maior compreensão da evolução cromossômica e genômica na família Furnariidae, que, até o presente momento, está carente de informações.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.2.1 Amostras e preparações cromossômicas

Metáfases foram obtidas a partir de culturas de fibroblastos de biópsias de pele e cultura rápida de embriões seguindo os protocolos de Sasaki (1968) e Barcellos et al. (2022), respectivamente. Através de redes de neblina tipo *mist nest*, foi coletada uma espécie da família Furnariidae, *Anumbius annumbi* (03♀). Os indivíduos foram coletados em dois municípios do Rio Grande do Sul (Brasil), Caçapava e Dom Pedrito. Os embriões foram coletados em seu ambiente natural na cidade de Caçapava. A coleta dos indivíduos foi realizada de acordo com os protocolos aprovados pelo Comitê de Ética Animal (CEUA 019/2020) e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO 61047-3, 33860-2 e 81564-1). As células foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 15% de soro fetal bovino, 2% de penicilina-estreptomicina e 1% de L-glutamina a 37°C. Cromossomos em metáfase foram obtidos por protocolos padrão, incluindo tratamento com colchicina (1 hora), solução hipotônica (0,075 M KCl, 15 minutos) e fixação com metanol/ácido acético na proporção de 3:1.

### 6.2.2 Citogenética clássica

A análise de bandas C foi realizada de acordo com Sumner (1972), com pequenas modificações. Após incubação a 60°C por 1h, as lâminas foram tratadas com HCl 0,2N a 42°C por 10 min, depois em Ba(OH)<sub>2</sub> 5% também a 42°C por 2 min e 45 segundos, 1 min em HCl 0,2N em temperatura ambiente e, por fim, tratadas com 2xSSC a 60°C por 1h e 30 min. Os cromossomos foram corados usando Giemsa 0,5% (v/v) em tampão fosfato mol/L pH 6,8. O número de cromossomos foi determinado contando 20-30 metáfases.

### 6.2.3 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de sequências simples repetitivas (SSRs)

Cinco sondas simples de repetição curta (SSR) foram utilizadas: (GA)<sub>n</sub>, (GAG)<sub>n</sub>, (CG)<sub>n</sub>, (CGG)<sub>n</sub> e (CAG)<sub>n</sub>. Os microssatélites foram diretamente marcados com

Streptavidina-Cy3 durante a síntese (Kubat, 2008). Os experimentos de FISH foram realizados de acordo com a metodologia descrita em Kretschmer et al. 2022. Os cromossomos foram desnaturados por imersão em 70% de formamida (70 ml de formamida e 30 ml de 2xSSC) a 72 °C por 1 minuto e 20 segundos e as sondas foram desnaturadas a 86 °C por 10 minutos e resfriadas a 4 °C por pelo menos 5 minutos antes da hibridização. Os cromossomos foram contra-corados com Vectashield com DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). O experimento de FISH foi feito pelo menos duas vezes para confirmar os sinais de hibridização e, além disso, o número de metáfases analisadas para estabelecer o padrão obtido para cada sonda de microssatélite foi de 15 a 20.

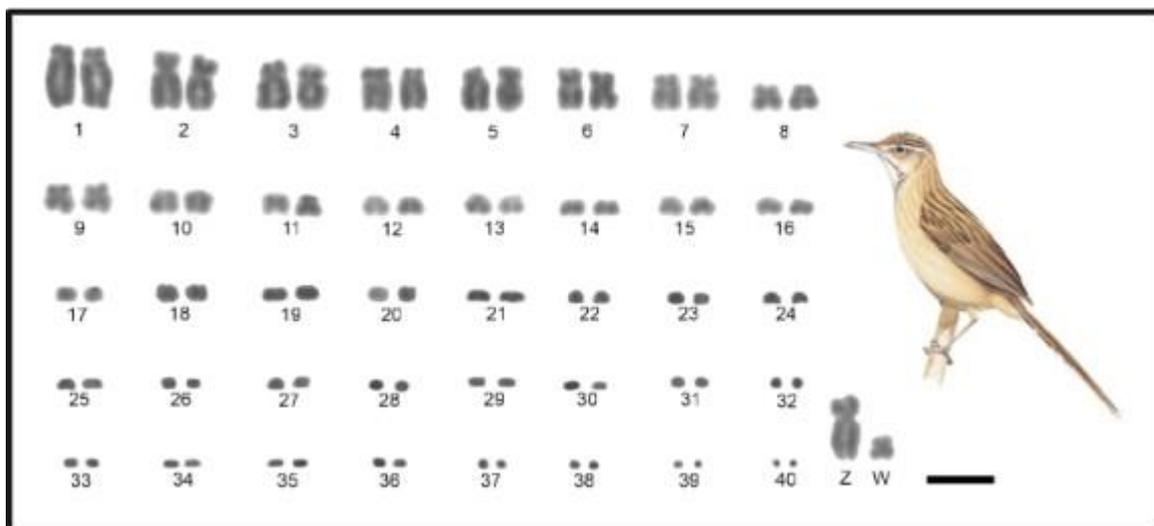
#### 6.2.4 Análise microscópica e processamento de imagens

Pelo menos 30 metáfases foram analisadas por indivíduo para confirmar o número diplóide e a estrutura do cariótipo. As imagens foram capturadas utilizando um microscópio Olympus BX53 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japão). Os cromossomos foram classificados como metacêntricos, submetacêntricos, acrocêntricos e telocêntricos com base em suas proporções de braços, seguindo a classificação de Guerra (2004). O software GNU Image Manipulation Program (GIMP) foi usado para montar os cariótipos.

### 6.3 RESULTADOS

#### 6.3.1 Descrição cariotípica e bandeamento C

Os resultados mostraram um número diplóide de  $2n = 82$  na espécie investigada, corroborando o cariótipo conservado comumente observado nesta família. Os pares 1, 2, 3, 4, 5 e 6 são acrocêntricos, enquanto os pares 7, 8, 9, e 10 são telocêntricos (Tabela 1). O cromossomo W mostrou-se metacêntrico e o Z acrocêntrico, sendo o maior cromossomo do complemento, fato incomum para Passeriformes. Heterocromatina constitutiva foi observada nas regiões centroméricas em poucos macrocromossomos e em alguns microcromossomos (Figura 2). O cromossomo W apresentou uma forte marcação no centrômero, braço curto e em parte do braço longo, enquanto o Z não apresentou nenhuma banda.

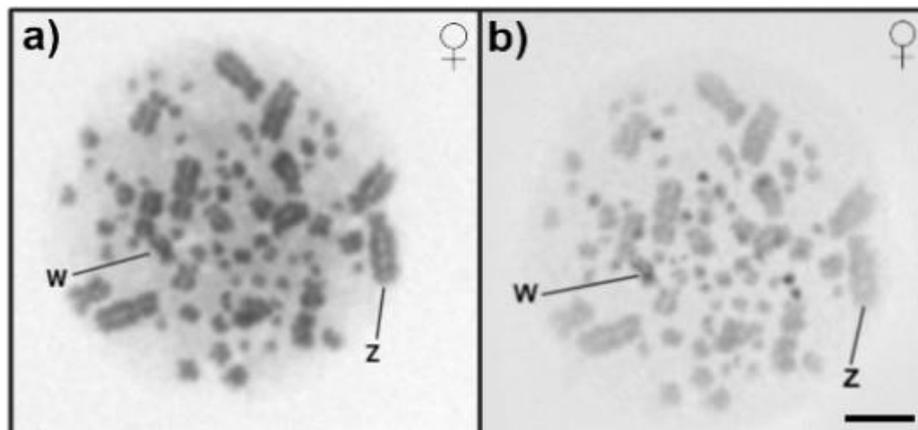


**Figura 1:** Cariótipo de uma fêmea de *Anumbius annumbi* ( $2n = 82$ ). Barra de escala = 5  $\mu\text{m}$ . Ilustração: Birds of the World

**Tabela 1:** Morfologia dos cromossomos de *Anumbius annumbi* por análise biométrica.

Cromossomo	r	ic	Morfologia
1	5,74	15,13	A
2	3,60	22,16	A
3	6,25	14,24	A
4	5,15	16,93	A
5	4,40	19,32	A
6	4,41	18,91	A
7	-	0	T
8	-	0	T
9	-	0	T
10	-	0	T
Z	3,68	21,78	A
W	1,18	45,94	M

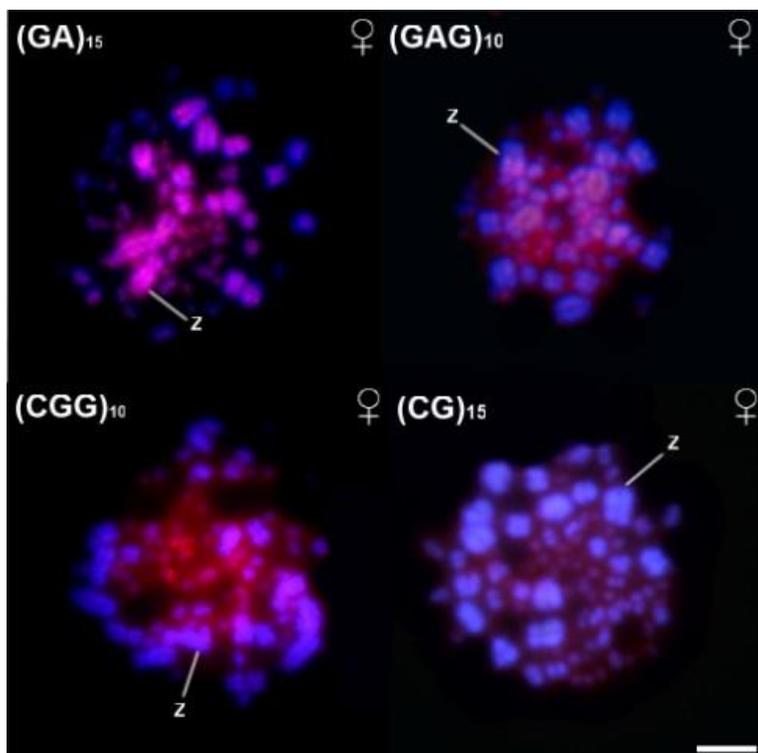
r = razão entre braços, ic = índice centromérico, A = Acrocêntrico, T = Telocêntrico, M = Metacêntrico



**Figura 2:** Análise sequencial com Giemsa (a) e banda C (b) em cromossomos de *Anumbius annumbi* (fêmea). Cromossomos sexuais estão indicados. Barra de escala = 5  $\mu$ m.

### 6.3.2 Hibridização *in situ* fluorescente com SSRs

As seqüências de microssatélites se acumularam nos macro e microcromossomos. Observou-se sinais de  $(GA)_n$  e  $(CAG)_n$  nos primeiros pares de macrocromossomos e sinais dispersos nos microcromossomos.  $(GAA)_n$  apresentou sinais mais fortes nos dois primeiros pares de macrocromossomos e nos microcromossomos.  $(CGG)_n$  mostrou fortes sinais somente nos microcromossomos, enquanto  $(CG)_n$  não demonstrou nenhum sinal. No cromossomo Z foi identificado duas seqüências em seu braço longo,  $(GA)_n$  e  $(GAA)_n$ .

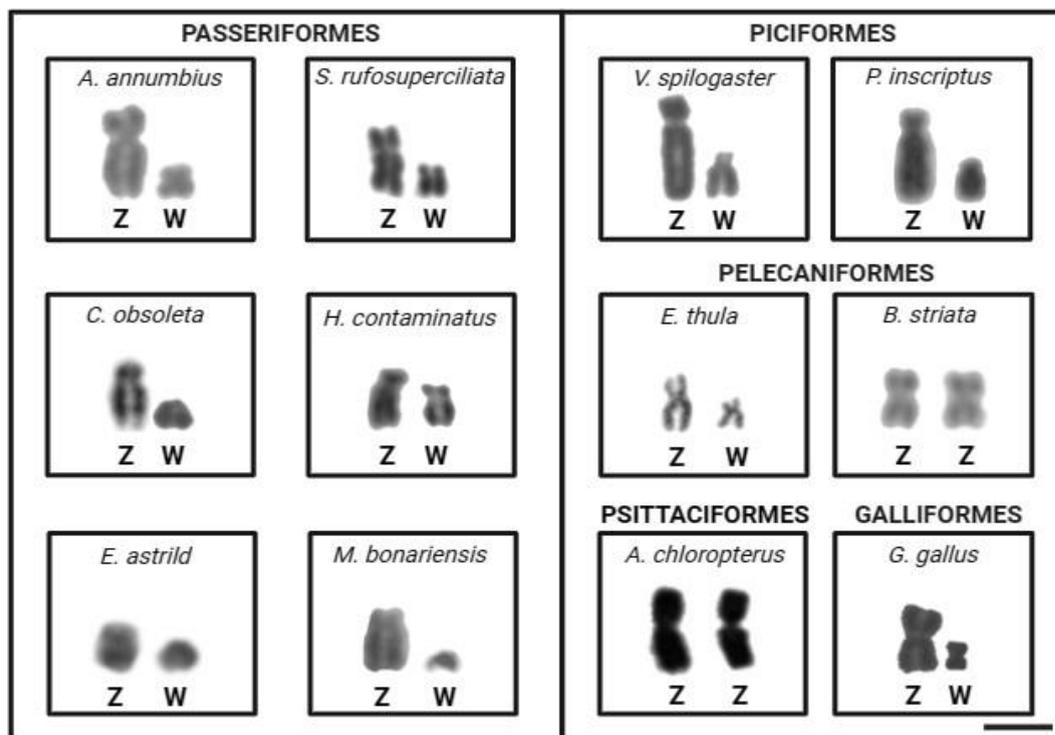


**Figura 3:** Mapeamento de microssatélites nos cromossomos de *Anumbius annumbi* (fêmea). O cromossomo sexual Z é indicado na placa metafásica e cada sonda é destacada no canto superior esquerdo. Barra de escala = 5  $\mu\text{m}$ .

#### 6.4. DISCUSSÃO

Apesar dessa enorme variedade de espécies, os dados citogenéticos atuais das aves são limitados, especialmente no caso dos furnarídeos, em que a maioria dos estudos está desatualizado e é escassa, dificultando a compreensão da evolução deste grupo.

Um cariótipo típico de aves é encontrado na espécie *Anumbius annumbi*, com  $2n = 82$ . Embora a maioria das espécies desta família tenham o mesmo número diploide, observou-se algumas variações na morfologia cromossômica de alguns macrocromossomos, indicando que os rearranjos intracromossômicos podem ter desempenhado um papel significativo na evolução dos cromossomos de furnarídeos. Os macrocromossomos apresentaram duas morfologias, acrocêntrica e telocêntrica, enquanto os cromossomos sexuais Z e W são acrocêntrico e metacêntrico, respectivamente (Figura 1). Por outro lado, o cromossomo Z da espécie analisada mostrou-se maior do que o primeiro par, fato inédito em Passeriformes. Em *A. annumbi*, o cromossomo Z é acrocêntrico, semelhante a *C. obsoleta* e *G. spirurus*, enquanto em *S. rufosuperciliata* e *S. frontalis* ele apresenta morfologia submetacêntrica (Ribas et al., 2018; de Souza et al., 2019; Tura et al., 2023). Em aves, somente duas famílias de Piciformes (Picidae e Ramphastidae) possui espécies que exibem um Z grande e maior que todos os outros cromossomos do complemento cariotípico (de Oliveira et al., 2017; Kretschmer et al., 2020) (Figura 4). O cromossomo W mostrou-se quase totalmente heterocromático, marcando o centrômero e o braço longo, enquanto o Z não teve marcações positivas de heterocromatina constitutiva.



**Figura 4:** Diferenciação do cromossomo sexual Z em algumas ordens da Classe Aves (de Oliveira et al., 2017; Furo et al., 2017; Kretschmer et al., 2020; Tura et al., 2023, com modificações). Barra de escala: 5  $\mu$ m; exceto para *V. spilogaster* e *A. chloropterus*.

Dentre as sequências repetitivas dispersas, sequências de microssatélites têm sido utilizadas para explorar mecanismos evolutivos, especialmente a diferenciação de cromossomos sexuais, em diferentes grupos aviários, mostrando diferentes padrões (Kretschmer et al., 2018a). Cinco sequências de microssatélites em *A. annumbi* foram analisadas:  $(GA)_n$ ,  $(GAG)_n$ ,  $(CGG)_n$ ,  $(CAG)_n$  e  $(CG)_n$ , demonstraram um padrão disperso de sinais. Até o momento, apenas sete espécies de Passeriformes (*Progne tapera*, *P. chalybea*, *Pygochelidon cyanoleuca*, *Sicalis flaveola*, *Cranioleuca obsoleta*, *Synallaxis frontalis* e *Syndactyla rufosuperciliata*) foram estudadas usando o mapeamento cromossômico de sequências SSRs (Barcellos et al., 2019; Kretschmer et al., 2021a; Tura et al., 2023). A sequência  $(GAG)_n$  apresentou sinais em macro e microcromossomos. No entanto, essa mesma sequência não mostrou sinais em nenhum dos cromossomos em *S. frontalis* e *S. rufosuperciliata*. Contrastando com o padrão observado em outras espécies de passeriformes, como em *S. flaveola*, com sinais muito fortes e visíveis (Kretschmer et al., 2021a; Tura et al., 2023). Além disso, observou-se sinais fortes desta sequência no braço longo do cromossomo Z. Quase todos os microcromossomos em *C. obsoleta* e *S. rufosuperciliata* foram hibridizados com  $(CGG)_n$ , enquanto os sinais se acumularam em um microcromossomo em *S. frontalis*.

(Tura et al., 2023). O cochicho também apresentou fortes sinais, apenas em microcromossomos. Em *A. annumbi*, a sequência  $(CAG)_n$  foi observada tanto em macro como em microcromossomos, como já visto em outros furnarídeos, onde esse padrão é encontrado em quase todos os cromossomos de *S. rufosuperciliata* e *S. frontalis*, apesar de *C. obsoleta* apresentar poucos sinais (Tura et al., 2023). Em outros Passeriformes, como as andorinhas e canário-da-terra, esta sequência mostrou-se presente em todos os cromossomos, inclusive no Z e W (Barcellos et al., 2019; Kretschmer et al., 2021a). A sequência  $(GA)_n$  apresentou hibridização na maioria dos cromossomos de *A. annumbi*, inclusive no braço longo do Z (Figura 3), em contraste com uma espécie de andorinha (*P. chalybea*), onde ocorreu marcação exclusivamente nos microcromossomos e no cromossomo W. Além disso, em outros furnarídeos essa sequência apareceu em todos os cromossomos de *S. frontalis* e *S. rufosuperciliata*, enquanto em *C. obsoleta* não esteve presente (Tura et al., 2023). A sequência  $(CG)_n$  não apresentou sinais em nenhum dos cromossomos de *A. annumbi*, característica observada também em outros Passeriformes (Barcellos et al., 2019). No entanto, em Picidae e Ramphastidae (Piciformes) esta sequência apresentou sinais em macrocromossomos e no Z (de Oliveira et al., 2017; Kretschmer et al., 2020).

Foram observados sinais de hibridização no cromossomo Z em *A. annumbi*, com as sequências  $(GA)_n$  e  $(GAG)_n$  localizadas especificamente no braço longo desse cromossomo sexual. Além disso,  $(CGG)_n$  apresentou sinais de baixa intensidade na região telomérica deste cromossomo. Isso sugere que, assim como em outros Passeriformes, essa espécie também seguiu trajetórias evolutivas semelhantes em relação ao acúmulo de sequências repetitivas. Em Piciformes, o DNA repetitivo foi uma das causas do aumento do cromossomo Z nas espécies, mas extensas fissões cromossômicas envolvendo os cinco primeiros cromossomos ancestrais (GGA1–5) também foram um dos motivos (de Oliveira et al., 2017; Kretschmer et al., 2020). Em geral, o acúmulo de sequências repetitivas nos cromossomos W tem sido demonstrado em espécies das ordens Psittaciformes, Columbiformes, Gruiformes e Passeriformes (Furo et al., 2017; Kretschmer et al., 2018b; Gunski et al., 2019; Barcellos et al., 2019). Além disso, um grande acúmulo de sequências de microssatélites no cromossomo Z foi sugerido como a principal causa do aumento desse cromossomo em pica-paus e tucanos (de Oliveira et al., 2017, Kretschmer et al., 2020). Levando tudo isso em consideração, propomos que esta espécie seguiu trajetórias parecidas com outros Passeriformes em relação às sequências

repetitivas. Em outros grupos de organismos, análises de sequências repetitivas têm relacionado seu acúmulo ao processo de diferenciação dos cromossomos sexuais, como em plantas, répteis e, em maior proporção, peixes (Kubat, 2008; Pokorná et al, 2011; Schneider et al., 2013).

Os resultados da banda C em *A. annumbi* indicaram uma baixa porcentagem de heterocromatina constitutiva, restrita a regiões peri e centromérica do cromossomo W, alguns macro e microcromossomos, enquanto o Z não apresentou marcações positivas. Adicionalmente, as repetições simples curtas (SSRs) aqui testadas foram preferencialmente acumuladas nos microcromossomos e no cromossomo Z, não mostrando relação com as regiões de heterocromatina constitutiva, sugerindo que o cromossomo sexual aviário é mais complexo do que postulado anteriormente, como já visto em outros estudos (Kretschmer et al., 2021b). Estudos apontam o envolvimento da heterocromatina constitutiva e do DNA repetitivo na diferenciação de grandes cromossomos sexuais W (Gunki et al., 2017). Além disso, vários autores têm proposto que regiões ricas em sequências repetitivas, como blocos de heterocromatina, podem atuar como uma barreira à progressão da inativação dos cromossomos sexuais meióticos (Ratomponirina et al., 1986; Vozdova et al., 2016). Embora a SSR apresente padrões distintos de distribuição entre aves, essas sequências tendem a se acumular preferencialmente nos microcromossomos e no W, geralmente associadas à heterocromatina constitutiva (Kretschmer et al., 2018; Barcellos et al., 2019). Em Neognathae, os cromossomos sexuais são geralmente altamente diferenciados, com os cromossomos W sendo heterocromáticos e ricos em repetições (Smeds, et al., 2015; Xu, et al., 2019). De modo geral, a ausência de heterocromatina constitutiva na região centromérica do cromossomo Z de *A. annumbi* poderia estar relacionada a possíveis deleções, indicando que este cromossomo ainda está em um processo de diferenciação.

## 6.5. CONCLUSÃO

Foi realizada uma análise citogenética da espécie *Anumbius annumbi* para uma compreensão de sua organização e evolução cromossômica. O cariótipo descrito ( $2n = 82$ ) apresenta um padrão típico de aves. Porém, o cromossomo sexual Z apresentou um tamanho incomum, maior do que o primeiro par de autossomos, fato nunca visto em Passeriformes. O mapeamento cromossômico de sequências simples repetitivas revelou uma diferenciação entre algumas sequências entre Passeriformes (Suboscines e Oscines). De modo geral, pode-se dizer que nossa análise de FISH com sondas de microssatélites mostrou que três dessas sequências

são encontradas amplificadas no cromossomo Z da espécie *A. annumbi*, da família Furnariidae. Isso poderia explicar o fato de por que o Z é o maior elemento do cariótipo, mas são necessárias mais análises posteriores com sequências repetitivas e também com elementos transponíveis para explicar esse tamanho incomum.

## REFERÊNCIAS

- BARBOSA, M.O.; SILVA, R.B.; CORREIA, V.C.S.; SANTOS, L.P.; GARNERO, A.D.V.; GUNSKI, R.J. Nucleolar organizer regions in *Sittasomus griseicapillus* and *Lepidocolaptes angustirostris* (Aves, Dendrocolaptidae): evidence of a chromosome inversion. **Genetics and Molecular Biology**, 2013, 36 (1), 070–073. doi:10.1590/S1415-47572013000100010
- BARCELLOS, S.A.; DE SOUZA, M.S.; TURA, V.; PEREIRA, L.R.; KRETSCHMER, R.; GUNSKI, R.J. Direct Chromosome Preparation Method in Avian Embryos for Cytogenetic Studies: Quick, Easy and Cheap. **DNA**, 2022, 2, 22-29. <https://doi.org/10.3390/dna2010002>
- BARCELLOS, S.A.; KRETSCHMER, R.; DE SOUZA, M.S.; COSTA, A.L.; DEGRANDI, T.M.; DOS SANTOS, M. S. et al., Karyotype Evolution and Distinct Evolutionary History of the W Chromosomes in Swallows (Aves, Passeriformes). **Cytogenetic and Genome Research**, 2019, 158(2), 98-105. doi:10.1159/000500621
- BERTOCCHI, N.A.; DE OLIVEIRA, T.D.; GARNERO, A.D.V.; COAN, R.L.B.; GUNSKI, R.J.; MARTINS, C.; TORRES, F.P. Distribution of CR1-like transposable element in woodpeckers (Aves Piciformes): Z sex chromosomes can act as a refuge for transposable elements. **Chromosome Research**, 2018, 26, 333-343.
- DE OLIVEIRA, T.D.; KRETSCHMER, R.; BERTOCCHI, N.A.; DEGRANDI, T.M.; DE OLIVEIRA, E.H.C.; CIOFFI, M.D. et al. Genomic organization of repetitive DNA in woodpeckers (Aves, Piciformes): Implications for karyotype and ZW sex chromosome differentiation. **PLoS One**, 2017, 12(1), e0169987.
- DE SOUZA, M.S.D.; BARCELLOS, S.A.; COSTA, A.L.; KRETSCHMER, R.; GARNERO, A.D.V.; GUNSKI, R.J. Polymorphism of Sooty-fronted Spinetail (*Synallaxis frontalis* Aves: Furnariidae): Evidence of chromosomal rearrangements by pericentric inversion in autosomal macrochromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, 2019, 42, 62-67
- DEGRANDI, T.M.; BARCELLOS, S.A.; COSTA, A.L.; GARNERO, A.D.V.; HASS, I.; GUNSKI, R.J. Introducing the Bird Chromosome Database: An Overview of Cytogenetic Studies in Birds. **Cytogenetic and Genome Research**, 2020, 160(4), 199-205. . doi:10.1159/000507768
- ELLEGREN, H. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetic**, 2004, 5:435–445.
- ELLEGREN, H. Evolutionary stasis: the stable chromosomes of birds. **Trends in ecology & evolution**, 2010, 25(5), 283-291.
- FURO, I.O.; KRETSCHMER, R.; DOS SANTOS, M.S.; DE LIMA C.C.A.; GUNSKI, R.J.; O'BRIEN, P.C.M. et al. Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Myiopsitta monachus* and *Amazona aestiva* (Psittaciformes, Psittacidae) with Emphasis on the Sex Chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, 2017. doi:10.1159/000464458

GUERRA, M. (2004). FISH: Conceitos e aplicações na citogenética. Sociedade Brasileira de Genética.

GUNSKI, R.J.; KRETSCHMER, R.; DE SOUZA, M.S; FURO, I.O.; BARCELLOS, S.A.; COSTA, A.L. et al. Evolution of Bird Sex Chromosomes Narrated by Repetitive Sequences: Unusual W Chromosome Enlargement in *Gallinula melanops* (Aves: Gruiformes: Rallidae). **Cytogenetic and Genome Research**, 2019, 152-159. doi:10.1159/000501381

GUNSKI, R.J.; CAÑEDO, A.D.; GARNERO, A.D.V.; LEDESMA, M.A.; CORIA, N.; MONTALTI, D. et al. Multiple sex chromosome system in penguins (Pygoscelis, Spheniscidae). **Comparative Cytogenetic**, 2017, 11, 541–552

KORDIS, D. Transposable elements in reptilian and avian (sauropsida) genomes. **Cytogenetic and genome research**, 2010, 127(2-4), 94-111.

KRETSCHMER R.; SANTOS M.S.; FURO, I.O.; DE OLIVEIRA E.H.C.; CIOFFI M.B.; FISH-in birds. (2022) In: Liehr T, editor. Cytogenetics and Molecular Cytogenetics. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; p. 263–76.

KRETSCHMER, R.; FERGUSON-SMITH, M.A.; DE OLIVEIRA, E. H. C. Karyotype Evolution in Birds: From Conventional Staining to Chromosome Painting. **Genes**, 2018a; 9: 181.

KRETSCHMER, R.; DE OLIVEIRA, T.D.; FURO, I.O.; SILVA, F.A.O.; GUNSKI, R.J.; GARNERO, A.V.; CIOFFI, M.B.; DE OLIVEIRA, E.H.C.; DE FREITAS, T.R.O. Repetitive DNAs and shrink genomes: A chromosomal analysis in nine Columbidae species (Aves, Columbiformes). **Genet. Mol. Biol.**, 2018b, 41, 98–106.

KRETSCHMER, R.; FURO, I.O.; CIOFFI, M.B.; GUNSKI, R.J.; GARNERO, A.D.V.; O'BRIEN, P.C.M.; FERGUSON-SMITH, M.A.; DE FREITAS, T.R.O.; DE OLIVEIRA, E.H.C. Extensive chromosomal fissions and repetitive DNA accumulation shaped the atypical karyotypes of two Ramphastidae (Aves: Piciformes) species. **Biological Journal of the Linnean Society**, 2020, 130, 839–849

KRETSCHMER, R.; GUNSKI, R.J.; GARNERO, A.D.V.; DE FREITAS, T.R.O.; TOMA, G.A.; CIOFFI, M.B.; DE OLIVEIRA, E.H.C.; O'CONNOR, R.E.; GRIFFIN, D.K. Chromosomal analysis in *Crotophaga ani* (Aves, Cuculiformes) reveals extensive genomic reorganization and an unusual Z-autosome Robertsonian translocation. **Cells**, 2021a, 10, 4.

KRETSCHMER, R.; RODRIGUES, B.S.; BARCELLOS, S.A.; COSTA, AL.; CIOFFI, M.B.; GARNERO, A.D.V. et al. Karyotype Evolution and Genomic Organization of Repetitive DNAs in the Saffron Finch, *Sicalis flaveola* (Passeriformes, Aves). **Animals**, 2021b, 11(5), 1456. doi:10.3390/ani11051456

KUBAT, Z.; DEJONG, H.; HOBZA, R.; VYSKOT, B.; KEJNOVSKY, E. Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. **Genome**, 2008, 51(5), 350–356. doi:10.1139/g08-024

MARCONDES, R.S.; BRUMFIELD, R.T. Fifty shades of brown: Macroevolution of plumage brightness in the Furnariida, a large clade of drab Neotropical passerines. **Evolution**, 2019, 73, 704–719.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. **Fish cytogenetics**, 2007, 421, 452.

NANDA, I.; SCHRAMA, D.; FEICHTINGER, W.; HAAF, T.; SCHARTL, M.; SCHMID, M. Distribution of telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in avian chromosomes. **Chromosoma**, 2002, 111(4), 215–227. doi:10.1007/s00412-002-0206-4

POKORNÁ, M., KRATOCHVÍL, I.; KEJNOVSKÝ, E. Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). **BMC genetics**, 2011, 12(1), 90–0. doi:10.1186/1471-2156-12-90

RATOMPONIRINA, C.; VIEGAS-PÉQUIGNOT, E.; DUTRILLAUX, B.; PETTER, F.; RUMPLER, Y. Synaptonemal complexes in Gerbillidae: Probable role of intercalated heterochromatin in gonosome-autosome translocations. **Cytogenetic Cell Genetic**, 1986, 43, 161–167.

RIBAS, T.F.A.; PIECZARKA, J.C.; GRIFFIN, D.K.; KIAZIM, L.G.; NAGAMACHI, C.Y.; FERGUSON-SMITH, M.A. et al. Analysis of multiple chromosomal rearrangements in the genome of *Willisornis vidua* using BAC-FISH and chromosome painting on a supposed conserved karyotype. **Bmc ecology and evolution**, 2021, 21(1), 1-12.

RODIONOV, A.V. Micro vs. macro: structural-functional organization of avian micro- and macrochromosomes. **Genetika**, 1996, 32(5), 597-608.

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

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**, 1968, 24:1923–1929.

SCHMID, M.; NANDA, I.; BURT, D.W. Second report on chicken genes and chromosomes 2005. **Cytogenetic and genome research**, 2005, 109(4), 415-479.

SCHNEIDER, C.H.; GROSS, M.C.; TERCENIO, M.L.; ARTONI, R.F.; VICARI, M.R.; MARTINS, C.; FELDBERG, E. Chromosomal evolution of neotropical cichlids: the role of repetitive DNA sequences in the organization and structure of karyotype. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 2013, 23, 201-214.

SMEDS, L.; KAWAKAMI, T.; BURRI, R.; BOLIVAR, P.; HUSBY, A.; QVARNSTROM, A. et al. Genomic identification and characterization of the pseudoautosomal region in highly differentiated avian sex chromosomes. **Nature Communication**, 2014, 5, 5448

SUMNER, A. A simple technique for demonstrating centromere heterochromatin. **Experimental Cell Research**, 1972, 75:304-306.

TURA V.; KRETSCHMER, R.; SASSI, F.M.C.; DE MORAES R.L.R.; BARCELLOS S.A.; DE ROSSO, V.O. et al. Chromosomal evolution of Suboscines: Karyotype diversity and evolutionary trends in Ovenbirds (Passeriformes, Furnariidae). **Cytogenetic Genome Research**, 2023, 644-656. doi: 10.1159/000530428.

VOZDOVA, M.; RUIZ-HERRERA, A.; FERNANDEZ, J.; CERNOHORSKA, H.; FROHLICH, J.; SEBESTOVA, H. et al. Meiotic behaviour of evolutionary sex-autosome translocations in Bovidae. **Chromosome Research**, 2016, 24, 325–338.

XU, L.; WA SIN, S.Y.; GRAYSON, P.; EDWARDS, S.V.; SACKTON, T.B. Evolutionary Dynamics of Sex Chromosomes of Paleognathous Birds. **Genome Biology Evolution**, 2019, 11, 2376–2390

WINKLER, D.W.; BILLERMAN, .M.; LOVETTE, I.J. (2020). Ovenbirds and Woodcreepers (Furnariidae), version 1.0. In *Birds of the World* (S. M. Billerman, B. K. Keeney, P. G. Rodewald, and T. S. Schulenberg, Editors). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA. <https://doi.org/10.2173/bow.furnar2.01>

ZHANG, G.; LI, C.; LI, Q.; LI, B.; LARKIN, D. M.; LEE. et al. Comparative genomics reveals insights into avian genome evolution and adaptation. **Science**, 2014, 346(6215),1311–1320. doi:10.1126/science.1251385

## 7. CONCLUSÃO

As análises de sequências repetitivas por Hibridização in situ Fluorescente (Tabela 1) e citogenética clássica em cinco espécies de Furnariidae, *S. frontalis*, *S. rufosuperciliata*, *C. obsoleta*, *H. contaminatus* e *A. annumbi*, permitiu concluir que:

1. Todas as espécies analisadas apresentam cariótipos típicos para as aves, com um número diplóide de 82 cromossomos.
2. Embora todas as espécies analisadas aqui tenham o mesmo número diploide, observou-se algumas variações modestas na morfologia cromossômica de alguns macrocromossomos autossômicos, indicando que os rearranjos intracromossômicos podem ter desempenhado um papel significativo na evolução dos cromossomos de furnarídeos.
3. *S. frontalis*, *S. rufosuperciliata*, *C. obsoleta* mostraram que seguiram trajetórias diferentes na evolução cariotípica envolvendo sequências repetitivas, podendo mostrar um padrão diferente visto em Oscines;
4. A evolução cariotípica de *H. contaminatus* foi evidenciada por blocos intersticiais teloméricos, sugerindo que sua trajetória evolutiva envolveu possíveis fusões cromossômicas. Além disso, a maioria das sequências repetitivas mostrou-se presente no genoma da espécie;
5. Em todas as cinco espécies de furnarídeos analisadas aqui, todas apresentaram sinais em um par de microcromossomos quando utilizada a sonda de rDNA (18S);
6. Em *A. annumbi*, o cromossomo Z apresentou-se acrocêntrico e o maior elemento do complemento cromossômico, evento nunca relatado em Passeriformes.
7. As sequências repetitivas analisadas demonstraram um padrão disperso, em que algumas espécies hibridizaram sequências em comum ((CAG)<sub>10</sub> , (CGG)<sub>10</sub> , (GA)<sub>10</sub>); enquanto, a sequência (CG)<sub>15</sub> não mostrou nenhum sinal nas espécies analisadas.

**Tabela 1:** Mapeamento cromossômico de sequências de microssatélites na família Furnariidae (Passeriformes, Suboscines).

Sequências simples repetitivas										
Espécie	(GAG) <sub>n</sub>	(CAG) <sub>n</sub>	(CGG) <sub>n</sub>	(CAA) <sub>n</sub>	(GAA) <sub>n</sub>	(CAT) <sub>n</sub>	(CA) <sub>n</sub>	(GA) <sub>n</sub>	(CG) <sub>n</sub>	(TA) <sub>n</sub>
<i>S. frontalis</i>	-	+	+	x	-	x	+	+	x	x
<i>C. obsoleta</i>	+	+	+	x	+	x	+	+	x	x
<i>S. rufosuperciliata</i>	-	+	+	x	-	x	+	+	x	x
<i>H. contaminatus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>A. annumbi</i>	+	+	+	+	x	x	x	x	-	x

(+) sinais positivos de hibridização; (-) nenhum sinal de hibridização; (x) não realizado

## REFERÊNCIAS

- BARBOSA, M.O.; SILVA, R.B.; CORREIA, V.C.S.; SANTOS, L.P.; GARNERO, A.D.V.; GUNSKI, R.J. Nucleolar organizer regions in *Sittasomus griseicapillus* and *Lepidocolaptes angustirostris* (Aves, Dendrocolaptidae): evidence of a chromosome inversion. **Genetics and Molecular Biology**, 2013, 36 (1), 070–073. doi:10.1590/S1415-47572013000100010
- BARCELLOS, S.A.; KRETSCHMER, R.; DE SOUZA, M.S.; COSTA, A.L.; DEGRANDI, T.M.; DOS SANTOS, M. S. et al., Karyotype Evolution and Distinct Evolutionary History of the W Chromosomes in Swallows (Aves, Passeriformes). **Cytogenetic and Genome Research**, 2019, 158(2), 98-105. doi:10.1159/000500621
- BARCELLOS, S.A.; DE SOUZA, M.S.; TURA, V.; PEREIRA, L.R.; KRETSCHMER, R.; GUNSKI, R.J. Direct Chromosome Preparation Method in Avian Embryos for Cytogenetic Studies: Quick, Easy and Cheap. **DNA**, 2022, 2, 22-29. <https://doi.org/10.3390/dna2010002>
- BARROWCLOUGH, G.F.; CRACRAFT, J.; KLIČKA, J.; ZINK, R.M.; GREEN, A.J. How Many Kinds of Birds Are There and Why Does It Matter? **PLoS One**, 2016, 11(11), e0166307. doi:10.1371/journal.pone.0166307
- BED'HOM, B.; PHILIPPE, C.; ZUZANA, G.; SIBYLE MOULIN; A.B.; VITALY, V. Characterization of the atypical karyotype of the black-winged kite *Elanus caeruleus* (Falconiformes: Accipitridae) by means of classical and molecular cytogenetic techniques. **Chromosome Research**, 2003, , 11(4), 335–343. doi:10.1023/a:1024091923939
- BELTERMAN, R.H.R.; & DE BOER, L.E.M. A karyological study of 55 species of birds, including karyotypes of 39 species new to cytology. **Genetica**, 1984, 65(1), 39-82.
- BENEDITO, E. (2015). *Biologia e ecologia de vertebrados*. Rio de Janeiro: Roca.
- BIET, E.; SUN, J.S.; DUTREIX, M. Conserved sequence preference in DNA binding among recombination proteins: an effect of ssDNA secondary structure. **Nucleic Acids Research**, 1999, 27(2), 596–600. doi:10.1093/nar/27.2.596
- BÜLAU, S.E.; KRETSCHMER, R.; GUNSKI, R.J.; GARNERO, A.D.V.; O'BRIEN, P.C.M.; FERGUSON-SMITH, M.A. et al. Chromosomal polymorphism and comparative chromosome painting in the rufous-collared sparrow (*Zonotrichia capensis*). **Genetics and Molecular Biology**, 2018, 41(4), 799–805. doi:10.1590/1678-4685-gmb-2017-0367
- BURT, D.W. Origin and evolution of avian microchromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, 2002, 96(1-4), 97–112. doi:10.1159/000063018
- CHARLESWORTH, B.; CHARLESWORTH, D. (2000). The degeneration of Y chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 2000, 355 (1403), 1563-1572.
- CHRISTIDIS, L. (1990). *Chordata 3. Animal cytogenetics 4: Aves*. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Germany, 55–57.
- CIOFFI, M.B.; BERTOLLO, A.C. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. **Implications for genome change and karyoevolution in fish**, 2010 , 10(1), 271–0. doi:10.1186/1471-2148-10-271

DE OLIVEIRA, E.H.C.; TAGLIARINI, M.M.; NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C. Comparação genômica em aves através de sondas cromossomo-específicas. **Revista Brasileira de Ornitologia**, 2006, 14, 47-52.

DE OLIVEIRA, T.D.; KRETSCHMER, R.; BERTOCCHI, N.A.; DEGRANDI, T.M.; DE OLIVEIRA, E.H.C.; CIOFFI, M.D. et al. Genomic organization of repetitive DNA in woodpeckers (Aves, Piciformes): Implications for karyotype and ZW sex chromosome differentiation. **PLoS One**, 2017, 12(1), e0169987.

DE SOUZA, M.S.; KRETSCHMER, R.; BARCELLOS, S.A.; COSTA, A.L.; CIOFFI, M.B.; DE OLIVEIRA, E.H.C. et al. Repeat Sequence Mapping Shows Different W Chromosome Evolutionary Pathways in Two Caprimulgiformes Families. **Birds**, 2020, 1(1), 19–34. doi:10.3390/birds1010004

DEGRANDI, T.M.; GUNSKI, R.J.; GARNERO, A.D.V.; OLIVEIRA, E.H.C.D.; KRETSCHMER, R., SOUZA, M.S. et al. The distribution of 45S rDNA sites in bird chromosomes suggests multiple evolutionary histories. **Genetics and Molecular Biology**, 2020a, 43.

DEGRANDI, T.M.; BARCELLOS, S.A.; COSTA, A.L.; GARNERO, A.D.V.; HASS, I.; GUNSKI, R.J. Introducing the Bird Chromosome Database: An Overview of Cytogenetic Studies in Birds. **Cytogenetic and Genome Research**, 2020b, 160(4), 199-205. doi:10.1159/000507768

DERJUSHEVA, S.; KURGANOVA, A.; HABERMAN, F.; GAGINSKAIA, E. high chromosome conservation detected by comparative chromosome painting in chicken, pigeon and passerine birds. **Chromosome Research**, 2004, 12, 715–723.

DOS SANTOS, M.S; KRETSCHMER, R.; SILVA, F.A.O.; LEDESMA, M.A.; O'BRIEN, P.C.M.; FERGUSON-SMITH, M.A. et al. Intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus *Saltator* (Thraupidae, Passeriformes) and the occurrence of heteromorphic Z chromosomes. **Genetica**, 2015, 143(5), 535–543. doi:10.1007/s10709-015-9851-4

DOS SANTOS, M.S; KRETSCHMER, R.; FRANKL-VILCHES, C.; BAKKER, A.; GAHR, M.; O'BRIEN, P.C.M. et al. Comparative Cytogenetics between Two Important Songbird, Models: The Zebra Finch and the Canary. **PLoS One**, 2017, 12(1), e0170997. doi:10.1371/journal.pone.0170997

FEDDUCIA, A. (1999). The origin and evolution of birds. New Haven: Yale University Press; p. 287–300.

FERGUSON-SMITH, M.A.; YANG, F.; RENS, W.; O'BRIEN, P.C.M. The impact of chromosome sorting and painting on the comparative analysis of primate genomes. **Cytogenetic and Genome Research**, 2005, 108(1-3), 112–121. doi:10.1159/000080809

FURO, I.O.; KRETSCHMER, R.; DOS SANTOS, M.S.; DE LIMA C.C.A.; GUNSKI, R.J.; O'BRIEN, P.C.M. et al. Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Myiopsitta monachus* and *Amazona aestiva* (Psittaciformes, Psittacidae) with Emphasis on the Sex Chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, 2017, 151(3):151-160 doi:10.1159/000464458

GARRIDO-RAMOS, M.A. The Repetitive DNA Content of Eukaryotic Genomes. **Genome Dynamics**, 2012, 1–28. doi:10.1159/000337118

GREGORY, T.R. Animal Genome Size Database. **2022**. <http://www.genomesize.com>. Acesso em: 15 de maio de 2023.

GUERRA, M. (2004). FISH: Conceitos e aplicações na citogenética. Sociedade Brasileira de Genética.

GUNSKI, R.J.; KRETSCHMER, R.; DE SOUZA, M.S.; FURO, I.O.; BARCELLOS, S.A.; COSTA, A.L. et al. Evolution of Bird Sex Chromosomes Narrated by Repetitive Sequences: Unusual W Chromosome Enlargement in *Gallinula melanops* (Aves: Gruiformes: Rallidae). **Cytogenetic and Genome Research**, 2019, 152-159. doi:10.1159/000501381

GUTTENBACH, M.; NANDA, I.; FEICHTINGER, W.; MASABANDA, J.S.; GRIFFIN, D.K.; SCHMID, M. Comparative chromosome painting of chicken autosomal paints in nine different bird species. **Cytogenetic and Genome Research**, 2003, 103(1-2), 173–184. doi:10.1159/000076309

KAPUSTA, A.; SUH, A.; FESCHOTTE, C. Dynamics of genome size evolution in birds and mammals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2017, 114(8), E1460–E1469. doi:10.1073/pnas.1616702114

KIDWELL, M. G.. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, 2002, 115, 49-63.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Review Genetic**, 2004, 5(6), 435–445. doi:10.1038/nrg1348

ELLEGREN, H. Evolutionary stasis: the stable chromosomes of birds. **Trends in ecology & evolution**, 2010, 25(5), 283-291.

KRETSCHMER, R.; GUNSKI, R.J.; GARNERO, A.D.V.; FURO, I.O.; O'BRIEN, P.C.M.; FERGUSON-SMITH, M.A. et al. Molecular Cytogenetic Characterization of Multiple Intrachromosomal Rearrangements in Two Representatives of the Genus *Turdus* (Turdidae, Passeriformes). **PLoS One**, 2014, 9(7), e103338. doi:10.1371/journal.pone.0103338

KRETSCHMER, R., FRANZ, I., DE SOUZA, M.S., GARNERO, A.D.V., GUNSKI, R.J., DE OLIVEIRA, E.H.C. et al. Cytogenetic evidence clarifies the phylogeny of the family rhynchocyclidae (Aves: passeriformes). **Cells**, 2021a, 10(10), 2650.

KRETSCHMER, R.; RODRIGUES, B.S.; BARCELLOS, S.A.; COSTA, AL.; CIOFFI, M.B.; GARNERO, A.D.V. et al. Karyotype Evolution and Genomic Organization of Repetitive DNAs in the Saffron Finch, *Sicalis flaveola* (Passeriformes, Aves). **Animals**, 2021b, 11(5), 1456. doi:10.3390/ani11051456

KRETSCHMER, R., FURO, I.D.O., CIOFFI, M.D.B., GUNSKI, R.J., GARNERO, A.D.V., O'BRIEN, P. et al. Extensive chromosomal fissions and repetitive DNA accumulation shaped the atypical karyotypes of two Ramphastidae (Aves: Piciformes) species. **Biological Journal of the Linnean Society**, 2020a, 130(4), 839-849.

KRETSCHMER, R.; GUNSKI, R.J.; GARNERO, A.D.V.; de Freitas T.R.O.; TOMA, G.A.; CIOFFI, M.B. et al. Chromosomal Analysis in *Crotophaga ani* (Aves, Cuculiformes) Reveals Extensive Genomic Reorganization and an Unusual Z-Autosome Robertsonian Translocation. **Cells**, 2020b, 10(1). doi:10.3390/cells10010004

KRETSCHMER, R.; FERGUSON-SMITH, M.A.; DE OLIVEIRA, E. H. C. Karyotype Evolution in Birds: From Conventional Staining to Chromosome Painting. **Genes**, 2018a; 9: 181.

KRETSCHMER, R., DE LIMA, V.L.C., DE SOUZA, M.S., COSTA, A.L., O'BRIEN, P.C., FERGUSON-SMITH, M. A. et al. Multidirectional chromosome painting in *Synallaxis frontalis* (Passeriformes, Furnariidae) reveals high chromosomal reorganization, involving fissions and inversions. **Comparative cytogenetics**, 2018b, 12(1), 97.

KRETSCHMER, R.; DE OLIVEIRA, E.H.C.; DOS SANTOS, M.S.; FURO, I.O.; O'BRIEN, P.C.M.; FERGUSON-SMITH, M.A.; GARNERO, A.D.V.; GUNSKI, R.J. Chromosome mapping of the large elaenia (*Elaenia spectabilis*): evidence for a cytogenetic signature for passeriform birds?. **Biological Journal of the Linnean Society**, 2015, 115(2), 391–398. doi:10.1111/bij.12504

KRETSCHMER R.; SANTOS M.S.; FURO, I.O.; DE OLIVEIRA E.H.C.; CIOFFI M.B.; FISH—in birds. (2022) In: Liehr T, editor. Cytogenetics and Molecular Cytogenetics. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; p. 263–76.

KUBAT, Z.; DEJONG, H.; HOBZA, R.; VYSKOT, B.; KEJNOVSKY, E. Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. **Genome**, 2008, 51(5), 350–356. doi:10.1139/g08-024

KUMAR, S.; M.; SULESKI, J.E.; CRAIG, A.E.; KASPROWICZ, M.; SANDERFORD, M.; LI, G.; STECHER, S.B. Hedges, (2022). TimeTree 5: An Expanded Resource for Species Divergence Times. *Molecular Biology and Evolution*. DOI: 10.1093/molbev/msac174.

LEDESMA, M.A.; MARTÍNEZ, P. A.; CALDERÓN, O. 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, 14(1), 59-62.

LI, Y.; ABRAHAM B.K.; TZION F.; AVIGDOR B.; EVIATAR N. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular ecology**, 2001, 11(12), 2453–2465. doi:10.1046/j.1365-294x.2002.01643.x

LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M.A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. **Repetitive DNA**, 2012, 7, 1-28.

MARTINS, T. B.; JUNIOR, J.C.G.S. Thomas Henry Huxley e o parentesco entre dinossauros e aves. **Intelligere**, 2021 (11), 178-197.

MASABANDA, J.S.; BURT, D.W.; O'BRIEN, P.C.; VIGNAL, A.; FILLON, V.; WALSH, P.S. et al. Molecular cytogenetic definition of the chicken genome: the first complete avian karyotype. **Genetics**, 2004, 166(3), 1367-1373.

MATSUBARA, K.; O'MEALLY, D.; AZAD, B.; GEORGES, A.; SARRE, S.D.; GRAVES, J.A.M. et al. Amplification of microsatellite repeat motifs is associated with the evolutionary

differentiation and heterochromatinization of sex chromosomes in Sauropsida. **Chromosoma**, 2016, 125(1), 111–123. doi:10.1007/s00412-015-0531-z

MAZZOLENI, S.; ROVATSOS, M.; SCHILLACI, O.; DUMAS, F. Evolutionary insight on localization of 18S, 28S rDNA genes on homologous chromosomes in Primates genomes. **Comparative Cytogenetics**, 2018, 12(1), 27.

MCQUEEN, H.A.; SIRIACO, G.; BIRD, A.P. Chicken microchromosomes are hyperacetylated, early replicating, and gene rich. **Genome Research**, 1998, 8(6), 621-630.

MOYLE, R.G.; TERRY, C.; ROBB, T.B.; TELLO, J.G.; MARCHESE, D.J.; CRACRAFT, J. Phylogeny and phylogenetic classification of the antbirds, ovenbirds, woodcreepers, and allies (Aves: Passeriformes: infraorder Furnariides). **Cladistics**, 2009, 25(4), 386–405. doi:10.1111/j.1096-0031.2009.00259.x

NANDA, I.; KARL, E.; GRIFFIN, D.K.; SCHARTL, M.; SCHMID, M. Chromosome repatterning in three representative parrots (Psittaciformes) inferred from comparative chromosome painting. **Cytogenetic and Genome Research**, 2007, 117(1-4), 43–53. doi:10.1159/000103164

NANDA, I.; SCHRAMA, D.; FEICHTINGER, W.; HAAF, T.; SCHARTL, M.; SCHMID, M. Distribution of telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in avian chromosomes. **Chromosoma**, 2002, 111(4), 215–227. doi:10.1007/s00412-002-0206-4

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**, 2008 16(1), 171–181. doi:10.1007/s10577-007-1210-6

NISHIDA, C.; ISHIJIMA, J.; ISHISHITA, S.; YAMADA, K.; GRIFFIN, D.K.; YAMAZAKI, T.; MATSUDA, Y. Karyotype Reorganization with Conserved Genomic Compartmentalization in Dot-Shaped Microchromosomes in the Japanese Mountain Hawk-Eagle (*Nisaetus nipalensis orientalis*, Accipitridae). **Cytogenetic and Genome Research**, 2013, 141(4), 284–294. doi:10.1159/000352067

O'CONNOR, R. E., KIAZIM, L., SKINNER, B., FONSEKA, G., JOSEPH, S., JENNINGS, R. et al. Patterns of microchromosome organization remain highly conserved throughout avian evolution. **Chromosoma**, 2009, 118, 21-29.

POKORNÁ, M., KRATOCHVÍL, I.; KEJNOVSKÝ, E. Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). **BMC genetics**, 2011, 12(1), 90–0. doi:10.1186/1471-2156-12-90

POUGH, F.H.; JANIS, C.M.; HEISER, J.B. (2008). A vida dos vertebrados. 4 ed. São Paulo: Atheneu. Editora São Paulo.

PROKOPOWICH, C.D; GREGORY, T.R; CREASE, T.J. The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. **Genome**, 2003, 46(1), 48–50. doi:10.1139/g02-103

RIBAS, T.F.A.; NAGAMACHI, C.Y.; ALEIXO, A.; PINHEIRO, M.L.S.; O´ BRIEN, P.C.M.; FERGUSON-SMITH, M.A.; PIECZARKA, J.C. et al. Chromosome painting in *Glyphorynchus spirurus* (Vieillot, 1819) detects a new fission in Passeriformes. *PLoS One*, 2018, 13(8), e0202040.

RIBAS, T.F.A.; PIECZARKA, J.C.; GRIFFIN, D.K.; KIAZIM, L.G.; NAGAMACHI, C.Y.; FERGUSON-SMITH, M.A. et al. Analysis of multiple chromosomal rearrangements in the genome of *Willisornis vidua* using BAC-FISH and chromosome painting on a supposed conserved karyotype. *Bmc ecology and evolution*, 2021, 21(1), 1-12.

RICE, R.A.; GREENBERG, R. Cacao cultivation and the conservation of biological diversity. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 2002, 29(3), 167-173.

RODRIGUES, B.S.; KRETSCHMER, R.; GUNSKI, R.J.; GARNERO, A.D.V.; O'BRIEN, P.C.M.; FERGUSON-SMITH, M.; DE OLIVEIRA, E.H.C. Chromosome Painting in Tyrant Flycatchers Confirms a Set of Inversions Shared by Oscines and Suboscines (Aves, Passeriformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 2018, 153(4), 205-212. doi:10.1159/000486975

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

SELVATTI, A.P.; GONZAGA, L.P.; RUSSO, C.A.M. A Paleogene origin for crown passerines and the diversification of the Oscines in the New World. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2015, 88, 1–15. doi:10.1016/j.ympev.2015.03.018

SENF, A.D.; MACFARLAN, T.S. Transposable elements shape the evolution of mammalian development. *Nature Reviews Genetics*, 2021, 22(11), 691-711.

SIBLEY, C.; AHLQUIST, J.E. (1990). Phylogeny and classification of birds. New Haven: Yale University Press.

SKINNER, B.M.; GRIFFIN, D.K. Intrachromosomal rearrangements in avian genome evolution: evidence for regions prone to breakpoints. *Heredity*, 2012, 108(1), 37–41. doi:10.1038/hdy.2011.99

STITOU, S., BURGOS, M., ZURITA, F., JIMÉNEZ, R., SÁNCHEZ, A., DÍAZ DE LA GUARDIA, R. Recent evolution of NOR-bearing and sex chromosomes of the North African rodent *Lemniscomys barbarus*. *Chromosome Research*, 1997, 5, 481-485.

TURA V.; KRETSCHMER, R.; SASSI, F.M.C.; DE MORAES R.L.R.; BARCELLOS S.A.; DE ROSSO, V.O. et al. Chromosomal evolution of Suboscines: Karyotype diversity and evolutionary trends in Ovenbirds (Passeriformes, Furnariidae). *Cytogenetic Genome Research*, 2023, 644-656. doi: 10.1159/000530428.

WALDRIGUES, A. Citogenética de aves. III. Cromossomos sexuais e digametia em aves. *Semina Ci. agr.*, 1982, 111-115.

WARREN, W.C.; HILLIER, L.W.; TOMLINSON, C.; MINX, P.; KREMITZKI, M.; GRAVES, T.; CHENG, H.H. et al. A new chicken genome assembly provides insight into avian genome structure. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2017, 7(1), 109-117.

WINKLER, D.W.; BILLERMAN, .M.; LOVETTE, I.J. (2020). Ovenbirds and Woodcreepers (Furnariidae), version 1.0. In Birds of the World (S. M. Billerman, B. K. Keeney, P. G. Rodewald, and T. S. Schulenberg, Editors). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA. <https://doi.org/10.2173/bow.furnar2.01>

ZHANG, G.; LI, C.; LI, Q.; LI, B.; LARKIN, D. M.; LEE. et al. Comparative genomics reveals insights into avian genome evolution and adaptation. **Science**, 2014, 346(6215),1311–1320. doi:10.1126/science.1251385

## 8. ANEXOS

## ANEXO I:

Artigos acadêmicos que a discente participou e colaborou durante o mestrado



Brief Report

## Direct Chromosome Preparation Method in Avian Embryos for Cytogenetic Studies: Quick, Easy and Cheap

Suziane Alves Barcellos <sup>1</sup>, Marcelo Santos de Souza <sup>1</sup>, Victoria Tura <sup>1</sup>, Larissa Rodrigues Pereira <sup>1</sup>, Rafael Kretschmer <sup>2,\*</sup>, Ricardo José Gunski <sup>1</sup> and Analia Del Valle Gamero <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Diversidade Genética Animal, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel 97307-020, RS, Brazil; suzianebarcellos@gmail.com (S.A.B.); marcoledesouzabio@gmail.com (M.S.d.S.); victoriaturalaluno@unipampa.edu.br (V.T.); larissarp2.aluno@unipampa.edu.br (L.R.P.); ricardogunski@unipampa.edu.br (R.J.G.); analiagamero@unipampa.edu.br (A.D.V.G.)

<sup>2</sup> Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 96010-900, RS, Brazil

\* Correspondence: rafael.kretschmer@ufpel.edu.br; Tel.: +55-51-98494-7824

**Abstract:** Avian cell culture is widely applied for cytogenetic studies, the improvement of which increasingly allows for the production of high-quality chromosomes, essential to perform both classical and molecular cytogenetic studies. Among these approaches, there are two main types: fibroblast and bone marrow culture. Despite its high cost and complexity, fibroblast culture is considered the superior approach due to the quality of the metaphases produced. Short-term bone marrow cultivation provides more condensed chromosomes but nonetheless is quicker and easier. In the search for a quicker, cheaper way to prepare metaphases without losing quality, the present work developed a novel, widely applicable protocol for avian chromosome preparation. Twenty-one bird embryos from distinct families were sampled: Icteridae, Columbidae, Furnariidae, Estrifidae, Thraupidae, Troglodytidae and Ardeidae. The protocol was based on a combination of modified fibroblast culture and bone marrow cultivation, taking the advantages of both. The results show that all species consistently presented good mitotic indexes and high-quality chromosomes. Overall, the application of this protocol for bird cytogenetics can optimize the time, considering that most fibroblast cultures take at least 3 days and often much longer. However, our protocol can be performed in 3 h with a much-reduced cost of reagents and equipment.

**Keywords:** Aves; cell cultivation; chromosomes; metaphases; method



**Citation:** Barcellos, S.A.; de Souza, M.S.; Tura, V.; Pereira, L.R.; Kretschmer, R.; Gunski, R.; Gamero, A.D.V. Direct Chromosome Preparation Method in Avian Embryos for Cytogenetic Studies: Quick, Easy and Cheap. *DNA* **2022**, *2*, 22–29. <https://doi.org/10.3390/dna2010002>

Academic Editor: Shin-ichiro Hiraga

Received: 5 November 2021

Accepted: 17 January 2022

Published: 26 January 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 1. Introduction

Since the early 1900s, bird chromosomes have been investigated using classical and molecular approaches. Despite the fact that avian cytogenetics play an important role in evolutionary studies, less than 10% of all bird species have a karyotype description so far, and nearly all of these are only partial karyotypes [1]. Birds have a bimodal karyotype and a ZZ/ZW sex chromosome system [2]. One of the most remarkable characteristics in their karyotypes is the large number of microchromosomes, which encode a high rate of important genes [3]. Regarding diploid numbers, they display a wide range, from 40 to 142. Despite this variation, more than 50% of birds have between 78 and 82 chromosomes [1].

Working with wild birds is always challenging due to the limitations associated with animal sampling [4]. Even though some samples can be collected from birds in captivity, it is still hard to do this in some species without negatively affecting their health [5].

Avian cytogenetic studies require cell cultures that provide high-quality metaphases for chromosome analysis, as well as the application of classical and molecular techniques, such as karyotyping, chromosome banding and fluorescent in situ hybridization (FISH). In

## Evolutionary History of Procyonids (Carnivora: Procyonidae): Comparative Cytogenetics of *Nasua Nasua* and *Procyon Cancrivorus*

Diego Sebastian Ojeda<sup>1,2</sup>, Miguel Angel Rinas<sup>2</sup>, Mario Angel Ledesma<sup>1</sup>,  
Vitor Oliveira De Rosso<sup>3</sup>, Victoria Tura<sup>1</sup>, Nairo Farias De Farias<sup>1</sup>, Analía  
Del Valle Garneró<sup>2</sup> and Ricardo José Gunski<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Virología Experimental, Fundación Instituto Leloir-CONICET, Buenos Aires, Argentina

<sup>2</sup>El Puma Ecological Park, MEyBRR, Misiones, Argentina

<sup>3</sup>Laboratory of Animal Genetic Diversity, Federal University of Pampa Campus São Gabriel, Brazil

### Research Article

Volume 8 Issue 1

Received Date: December 26, 2022

Published Date: January 13, 2023

DOI: 10.21889/aojvsc-1a000221

\*Corresponding author: Ricardo José Gunski, Federal University of Pampa, Rua Afonso Barros Macedo, São Gabriel, RS, Brazil.  
Email: ricardogunski@unipampa.edu.br

### Abstract

The chromosome number of all species of Procyonidae was very conserved. Most have very strong chromosomal homology among members of the family, as well as with different species of the suborder Feliformia. Many chromosomes have similar and sometimes identical G-band patterns, while others differ due to Robertsonian translocations and inversions. In this work, the karyotype of two species of the family Procyonidae, *Nasua nasua* (2n=38; NF = 74) and *Procyon cancrivorus* (2n=38; NF = 76), the latter described cytogenetically for the first time, is characterized using conventional staining and differential G, C and NOR banding techniques. Pericentric and paracentric inversions were observed in *Procyon cancrivorus* and *Nasua nasua*, respectively. Finally, the G-banded karyotypes of both species were compared with the Ancestral Carnivore Karyotype proposed in the literature, providing a homology and conservation in the karyotype evolution of this order.

**Keywords:** G-banding; NOR-banding; C-banding; ACK

### Introduction

Belonging to the genus *Procyon*, *P. cancrivorus* (Cuvier) is a solitary animal of nocturnal habits, living near bodies of water. It has a short, dense coat of dark brown to gray color, easily identified by a dark face mask. Its distribution includes Central and South America [2]. Exclusive to South America, *Nasua nasua* (Linnaeus) is a social animal of daytime habits, and can live in large groups. Its color varies according to the geographical distribution, between reddish and brown tones,

and has great mobility in its long snout. Both *P. cancrivorus* and *N. nasua* are medium-sized animals with a long ringtail, presenting sexual dimorphism with males larger than females [2].

The procyonids described karyotypically so far are very similar, presenting 2n=38, they are difficult to differentiate only on the basis of chromosome morphology. In addition to the similarities between those belonging to the family, there are great resemblances with the Felids, but there is no



Communication

## Highly Conserved Microchromosomal Organization in Passeriformes Birds Revealed via BAC-FISH Analysis

Marcelo Santos de Souza <sup>1</sup>, Suziane Alves Barcellos <sup>2</sup>, Victoria Tura <sup>1</sup>, Vera Lúcia Bobrowski <sup>2</sup>,  
Analia Del Valle Garneró <sup>1</sup>, Ricardo José Gunski <sup>1</sup>, Darren K. Griffin <sup>3</sup> and Rafael Kretschmer <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB), Universidade Federal do Pampa, São Gabriel 97300-000, RS, Brazil; marcelosouzabio@gmail.com (M.S.d.S.); suzianebarcellos@gmail.com (S.A.B.); victoriatural.aluno@unipampa.edu.br (V.T.); analiagarnero@unipampa.edu.br (A.D.V.G.); ricardogunski@unipampa.edu.br (R.J.G.)

<sup>2</sup> Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 96010-900, RS, Brazil; vera.bobrowski@ufpel.edu.br

<sup>3</sup> School of Biosciences, University of Kent, Canterbury CT2 7NJ, UK; d.k.griffin@kent.ac.uk

\* Correspondence: rafael.kretschmer@ufpel.edu.br

**Simple Summary:** The Passeriformes order (songbirds) is incredibly diverse in terms of number of species and morphological and ecological diversification, comprising around 60% of all bird species. Despite considerable diversity, the genome organizational structure (i.e., the number and pattern of chromosomes) within Passeriformes is highly conserved, with a chromosome number that remains close to 80 in nearly all species studied. These characteristics raise interesting questions and stimulate curiosity about the genome evolution of this group. Therefore, this study aimed to analyze the organization of the smallest chromosomes (microchromosomes) in four Passeriformes species to understand whether they were rearranged during evolution. This has only recently become possible using fluorescent probes called bacterial artificial chromosomes (BACs) and a technique called fluorescence in situ hybridization (FISH). Our results confirm that the songbirds studied did not rearrange their microchromosomes to any great extent, and this may have contributed to their overall evolutionary success.

**Abstract:** Passeriformes birds are widely recognized for their remarkable diversity, with over 5700 species described so far. Like most bird species, they possess a karyotype characteristic of modern birds, which includes a bimodal karyotype consisting of a few pairs of macrochromosomes and many pairs of microchromosomes. Although the karyotype is typically  $2n = 80$ , the diploid number can atypically vary greatly, ranging from 56 to approximately 100 chromosomes. In this study, we aimed to understand the extent of conservation of the karyotype's organizational structure within four species of this group using Bacterial Artificial Chromosomes via Fluorescence In Situ Hybridization (BAC-FISH) with microchromosome probes from Chicken (*Gallus gallus*) or Zebra Finch (*Tamiasppia galpata*) per microchromosomes (CGA10-28, except CGA16). By examining the chromosome complement of four passerine species—the Streaked Flycatcher (*Mylodnestes maculatus*), Shiny Cowbird (*Molothrus bonariensis*), Southern House Wren (*Troglodytes aedon*), and Double-collared Seedeater (*Sporophila caerulescens*)—we discovered a new chromosome number for Southern House Wren. Through FISH experiments, we were able to observe the same pattern of microchromosome organization as in the common ancestor of birds. As a result, we propose a new diploid number for Southern House Wren and confirm the conservation status of microchromosome organization, which may confer evolutionary advantages to this group.

**Keywords:** Aves; diploid number; karyotype organization; molecular cytogenetic



**Citation:** de Souza, M.S.; Barcellos, S.A.; Tura, V.; Bobrowski, V.L.; Garneró, A.D.V.; Gunski, R.J.; Griffin, D.K.; Kretschmer, R. Highly Conserved Microchromosomal Organization in Passeriformes Birds Revealed via BAC-FISH Analysis. *Birds* **2023**, *4*, 236–244. <https://doi.org/10.3390/birds4020020>

Academic Editor: Jukka Jokimäki

Received: 26 March 2023

Revised: 13 June 2023

Accepted: 14 June 2023

Published: 16 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

----- Forwarded message -----

De: Antonio de Pinho Marques Jr <[apbehalfof@manuscriptcentral.com](mailto:apbehalfof@manuscriptcentral.com)>

Date: seg., 16 de out. de 2023 às 09:20

Subject: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia - Decision on Manuscript ID ABMVZ-2023-13078.R1

To: <[ricardogunski@unipampa.edu.br](mailto:ricardogunski@unipampa.edu.br)>

16-Oct-2023

Dear Prof. Gunski:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Comparative cytogenetics in felids (Carnivora: Felidae): Leopardus wiedii, Panthera onca, Puma concolor and Felis catus" in its current form for publication in the Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Dr. Antonio de Pinho Marques Jr

Editor-in-Chief, Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

[ampinho.editor@gmail.com](mailto:ampinho.editor@gmail.com)

Associate Editor

Comments to the Author:

Dear authors,

The Editorial Committee informs you that your article has been accepted for publication in the Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science.

Congratulations on the approval of your paper. The ABMVZ appreciates your choice for submitting it and remains available to receive other articles in the future.

Information regarding publishing procedures, like final proof review, payment of publication fee and eventually other notice will be sent to you timely.

Sincerely,

ABMVZ Team

## gen-2023-0096 - Confirmation of Manuscript Submission

Externa



Caixa de entrada x

**Genome** <onbehalf@manuscriptcentral.com>

qua., 20 de set., 19:05



para suzianebarcellos, rafa.kretschmer, marcelodesouzabio, mim, lcpozzobon48, thales.freitas, D.K.Griffin, ricardogunski, analiagarnero ▾

Dear Suziane Alves Barcellos and co-authors,

This is an automated confirmation that your manuscript submission has been received.

Manuscript ID: gen-2023-0096

Title: Understanding Avian Microchromosomal Organization and Evolution in Four Representative Woodpeckers (Piciformes) through BAC-FISH Analysis

Contributing Authors: Alves Barcellos, Suziane; Kretschmer, Rafael; Santos de Souza, Marcelo; Tura, Victoria; Pozzobon, Luciano; de Freitas, Thales Renato Ochotorena; Griffin, Darren; Gunski, Ricardo José; Del Valle Garnero, Analía

Contact author during peer review: Dr. Suziane Alves Barcellos

If there are any concerns with the submission, the editorial office staff will be in contact with the contact author. Otherwise, the manuscript will be sent to the Editor-in-Chief for consideration.

Statements endorsed on submission are listed below my signature block. Please contact the editorial office at [genome@cdnsiencepub.com](mailto:genome@cdnsiencepub.com) if you believe any of them to be inaccurate or untrue.

We are committed to combatting author misconduct. New manuscript submissions will be processed using Crossref Similarity Check to identify duplication of previously published work. To find out more about Crossref visit <http://www.crossref.org/crosscheck.html>

You may view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc06.manuscriptcentral.com/genome-pubs>.

## ANEXO II

### Protocolo Bandeamento C

De acordo com o Protocolo de Banda C, conforme descrito por LEDESMA et al. (2002) com adaptações, o procedimento foi conduzido da seguinte maneira:

Inicialmente, as melhores metáfases foram capturadas em imagens após coloração com Giemsa 5%. A remoção do óleo de imersão e do Giemsa foi realizada utilizando fixador (3:1). Posteriormente, as lâminas foram submetidas ao processo de bandeamento C, o qual consistiu nos seguintes passos:

1. Incubação da lâmina em estufa à 60 °C por 1 hora;
2. Incubação da lâmina em HCl 0,2 N à 42 °C por 10 minutos;
2. Enxágue em água destilada;
3. Imersão da lâmina em Hidróxido de Bário (50%) a 42 °C por 2 minutos e 45 segundos;
4. Imersão da lâmina em HCl 0,2 N à temperatura ambiente por 30 segundos;
5. Enxágue novamente em água destilada;
6. Incubação em 2 x SSC a 60 °C por 1 hora;
7. Coração da lâmina com Giemsa por 45 minutos.
8. Análise sob um microscópio óptico Olympus BX53.

### ANEXO III

#### Protocolo de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH)

De acordo com o Protocolo de FISH, conforme descrito por KRETSCHMER et al. (2022) com modificações, o procedimento foi conduzido da seguinte maneira:

Primeiramente, pingar uma gota com preparação cromossômica no centro da lâmina (20 $\mu$ L);

1. Incubar as lâminas a 60°C por 1 hora.
2. Adicionar 100  $\mu$ l de Solução de RNase (1,5  $\mu$ l de RNase em 100  $\mu$ l de 2 $\times$ SSC) por lâmina (usando uma lamínula de 24 $\times$ 60 mm). Incubar a 37°C por 1 hora e 30 minutos em uma câmara úmida.

**Obs:** FISH com sondas de rDNA e telomérica:

- 2.1. Adicionar 200  $\mu$ l da solução de RNase A à lâmina e incubar a 37°C por 25 minutos (1  $\mu$ l da solução de RNase 10mg/ml em 500  $\mu$ l de 2 $\times$ SSC).
- 2.2. Seguir com o tratamento com pepsina (protocolo descrito a seguir).
- 2.3. Seguir os passos para FISH descritos a seguir.
3. Remover a lamínula e incubar as lâminas em um frasco contendo 2 $\times$ SSC por 5 minutos à temperatura ambiente em um agitador.
4. Adicionar 3  $\mu$ l de pepsina (solução estoque 1,0g em 50ml de água) em uma solução de Água + HCl previamente aquecida. Misturar e homogeneizar a solução. Adicionar 100 $\mu$ l nas lâminas para tratamento com pepsina por 10 minutos a 37°C em uma câmara úmida.

**Obs:** FISH com sondas de rDNA e telomérica:

- 4.1. Adicionar 100  $\mu$ l de uma solução de pepsina a 0,01% nas lâminas, cobrir com uma lamínula de 22 $\times$ 50 mm e manter a 37°C por 5 minutos.
5. Incubar as lâminas em um frasco contendo 2 $\times$ SSC por 5 minutos à temperatura ambiente em um agitador.
6. Repetir o passo 5 duas vezes.
7. Desidratar as lâminas em uma série de etanol (70%, 85%, 100%) por 2 minutos em cada uma (temperatura ambiente).
8. Deixar as lâminas secarem ao ar.
9. Incubar as lâminas em uma solução de formamida a 70% a 72°C, por 1 minuto e 20 segundos para desnaturação cromossômica do DNA.
10. Repetir o passo 7.

11. Desnaturar a mistura de hibridização (contendo 11  $\mu$ l de tampão de hibridização e 100 ng da sonda marcada) em um termociclador a 80°C por 10 minutos. (Esta etapa pode ser realizada enquanto a série de etanol está em andamento).
12. Adicionar a mistura de hibridização nas lâminas, cobrir com uma lamínula de 22×50 mm, e incubar a 37°C por 16 horas ou durante a noite em uma câmara úmida e escura.
13. Remover a lamínula e lavar as lâminas duas vezes em 2×SSC e uma vez em 1×SSC à temperatura ambiente, por cinco minutos cada vez em um agitador.
14. Lavar as lâminas uma vez em 1×PBS por cinco minutos em um agitador.
15. Repetir o passo 7.
16. Adicionar 20  $\mu$ l de DAPI (1ml de antifade para 1ul de DAPI) em cada lâmina, cobrir com uma lamínula de 22×50 mm e pressionar suavemente. As lâminas estão prontas para serem analisadas em um microscópio de fluorescência. Para armazenamento a longo prazo, as lâminas podem ser mantidas a 4°C para prolongar a intensidade da fluorescência.

## ANEXO IV

### Protocolo de Extração de DNA segundo Sambrook e Russell, 2001:

1. Ligue a UV por 15 minutos no fluxo para a limpeza do fluxo;
2. Separe os materiais que irá utilizar, tesouras, pinças e tubos eppendorf;
3. Monte o mix de digestão, sempre calculando para uma amostra a mais:
  - H<sub>2</sub>O Mili-Q: 430 µl; EDTA 0,5 M: 25 µl; NaCl 5 M: 10 µl; Tris HCl 2 M: 5 µl; Proteinase K: 5 µl; SDS 10%: 25 µl;
4. Retire o tecido do álcool, seque no papel toalha, coloque no tubo de 0,2mL e picote/macere até obter fragmentos do tamanho de grãos de areia;
5. Aplique 500 µl do mix de digestão em cada tubo e coloque no banho maria a 55 °C até dissolver todo o tecido (o tempo pode variar de acordo com o tipo de tecido);
6. Após dissolvido, iniciar uma lavagem com fenol;
7. Adicione 500 µl do Fenol equilibrado pH em cada amostra. Levar os tubos para um agitador por 10 minutos. Após o tempo, centrifugue as amostras por 20 minutos a 13.000 rpm;
8. Com muito cuidado, observe a formação de três camadas e retire apenas o sobrenadante, transferindo-o para um tubo de 1,5 mL;
9. Repetir a lavagem, colocando um volume de Fenol Clorofórmio (1/1). Agitar e centrifugar a 13.000 rpm durante 15 minutos. Retirar o sobrenadante para um novo tubo.
10. Aplique 1/10 do volume de NaCl 5M + 1mL de Etanol Baker 100% gelado. Observe a formação de uma nuvem no tubo. Caso não queira centrifugar, armazenar em freezer -20° C, para finalizar depois. Centrifugue por 15 minutos a 13.000 rpm;
11. Retire o sobrenadante invertendo o tubo. Aplique 50 µl de etanol 70% gelado e centrifugue por 10 minutos a 13.000 rpm;
12. Retire o sobrenadante e seque o pellet, deixando-o na estufa a 60 °C durante 5 minutos ou mais, até secar totalmente;
13. Quando o pellet estiver seco, ressuspenda em 30 a 50 µl de T.E (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM) ou água miliq. Aplique 1,5 µl de RNase e incube a 37° C por 1 hora. Depois, colocar os tubos a 65° C para parar a ação da enzima;
14. Quantifique a amostra e corra um gel de agarose a 1% para verificar a integridade do DNA.

## ANEXO V

### Protocolo de Hibridização Genômica Comparativa

Os primeiros passos para iniciar o experimento é separar e preparar tudo que será usado:

1. Separe as cubetas de álcoois 70%, 85%, 100% e as preencha com os líquidos na temperatura ambiente.
2. Separe uma cubeta de álcool 70% e coloque no freezer até o uso.
3. Separe um suporte grande de eppendorfs e coloque um tubinho de 1,5 com 2xSSC.
4. Coloque as lâminas para envelhecer em uma cubeta de vidro por 1h a 60°C.
5. Separe uma caixinha branca de plástico e coloque papel umedecido dentro.
6. Separe a quantidade de lamínulas referentes às lâminas que serão utilizadas e as limpe bem com álcool 100% e as coloque em um suporte de madeira limpo.

Para iniciar o experimento pegue o tubo de RNase e passe pelo vórtex. Pegue 1,5µl de RNase e misture com 100µl de 2xSSC e aplique por lâmina, cobrindo cada uma com lamínulas 24x60mm. Coloque as lâminas na caixa com papel umedecido em uma estufa a 37°C por 1h30min.

Em paralelo a isso coloque 1ml de H<sub>2</sub>O + 10µl de HCl 0,1M em um eppendorf para aquecer na estufa a 37°C (deixe lá até o uso). Em seguida, ligue o banho maria à 72°C e coloque a cubeta de formamida para aquecer.

Faltando 10min antes de acabar o tempo de RNase tire um tubinho de pepsina do freezer para descongelar e separe novamente lamínulas equivalentes a quantidade de lâminas trabalhadas. Terminado o tempo da RNase coloque as lâminas em um suporte de cubeta e as coloque em uma cubeta com 1xPBS por 5min no shaker.

Nesse tempo adicione 3µl de pepsina na solução de água + HCl e homogeneizar tudo e coloque 100µl dessa solução nas lamínulas e coloque sob elas as lâminas recém-saídas do PBS e deixe em uma caixinha com papel umedecido 10min na estufa à 37°C. Finalizado esse tempo coloque as lâminas em uma cubeta com 1xPBS por 5min no shaker. Depois lave com

água destilada para remover o excesso de PBS e as coloque para desidratar na série alcoólica por 2min em cada álcool e as deixe secar naturalmente.

Quando as lâminas estiverem secas, inicie o processo da formamida. Coloque as lâminas na formamida a 72°C por 3min15s. Finalizado esse tempo coloque as lâminas no álcool 70% gelado por 3min e depois siga a série alcóolica com 2min de cada álcool. Deixe as lâminas secando.

Para finalizar o primeiro dia, retire o mix do termociclador e adicione 20µl do mix em cada uma das suas respectivas lâminas e coloque uma lamínula (24x50) e coloque em uma caixa com papel umedecido a 37°C por um período em torno de 16h.

Para o segundo dia coloque uma cubeta de 2xSSC no banho a 37°C se for apenas microssatélites ou a 65°C se for 5S e 18S por 30min. Quando atingir a temperatura coloque as lâminas no 2xSSC por 5min no shaker.

Ao término do tempo, passe as lâminas para uma cubeta com 4xSSCTween e coloque 5min no shaker. Por fim, faça uma lavagem rápida de 1min no 1xPBS, enxague em água destilada e coloque 2min em cada álcool da série alcóolica. Para finalizar, espere as lâminas secarem, core cada uma com 20µl de DAPI e cubra com uma lamínula. Coloque as lâminas na geladeira em uma caixa de papelão e deixe lá até a análise.

**VICTORIA TURA**

**MAPEAMENTO GENÔMICO DE SEQUÊNCIAS REPETITIVAS EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA  
FURNARIIDAE (AVES): UM ENFOQUE CITOGENÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Dissertação defendida e aprovada em: dia, mês e ano.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Analía del Valle Garnero

Orientador

UNIPAMPA

---

Prof. Dr. Ricardo José Gunski

UNIPAMPA

---

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira

UFPA

---



Assinado eletronicamente por **Edivaldo Herculano Correa de Oliveira, Usuário Externo**, em 27/10/2023, às 16:21, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.

---



Assinado eletronicamente por **RICARDO JOSE GUNSKI, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 27/10/2023, às 16:23, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.

---



Assinado eletronicamente por **ANALIA DEL VALLE GARNERO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 27/10/2023, às 16:24, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1284118** e o código CRC **C8B48A7E**.

---