

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

VITOR OLIVEIRA DE ROSSO

**EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA
THAMNOPHILIDAE**

SÃO GABRIEL

2025

VITOR OLIVEIRA DE ROSSO

**EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA
THAMNOPHILIDAE**

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

2025

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

R838e Rosso, Vitor Oliveira de
Evolução cariotípica em espécies da família
Thamnophilidae / Vitor Oliveira de Rosso.
66 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2025.

"Orientação: Analía del Valle Garnero Garnero".

1. Genética. 2. Citogenética. 3. Aves. 4.
Passeriformes. I. Título.

VITOR OLIVEIRA DE ROSSO

**EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA
THAMNOPHILIDAE**

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: XX de fevereiro de 2025

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 profundamente à minha mãe, Ivete Celeni Oliveira de Rosso, ao meu pai, João Luiz Comin de Rosso, e à minha irmã, Joana Oliveira de Rosso, por seu apoio incondicional, amor e incentivo em todas as etapas desta jornada.

À minha namorada, Maria Vitória Takemura Mariano, minha gratidão pelo carinho, compreensão e por estar ao meu lado, oferecendo força e apoio nos momentos desafiadores.

Expresso minha sincera admiração e gratidão à minha orientadora, professora Analía del Valle Garnero, e ao professor Ricardo José Gunski, que foram como verdadeiros mentores e segundos pais. Agradeço pela orientação atenta, paciência, dedicação e pelo suporte constante, tanto acadêmico quanto pessoal, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao professor Fabiano Pimentel Torres, agradeço pela valiosa colaboração, pelos conselhos e pelo suporte durante todo este processo.

Aos colegas de laboratório, especialmente Victoria Tura e Lilian de Oliveira Machado, minha gratidão pelo companheirismo, pelas trocas de conhecimento e por criarem um ambiente acolhedor, que foi essencial para o sucesso deste trabalho.

Por fim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para esta caminhada, deixo meu mais sincero agradecimento.

RESUMO

As aves representam o grupo mais diverso entre os tetrápodes terrestres, com destaque para a ordem Passeriformes, que corresponde a cerca de 60% da riqueza total da classe. Dentro desse grupo, a subordem Suboscines constitui a linhagem mais antiga dos Passeriformes, destacando-se pela presença de famílias diversificadas, como a Thamnophilidae. Essa família, composta por aves insetívoras restritas às florestas neotropicais, inclui 237 espécies descritas, das quais apenas cinco foram estudadas citogeneticamente. Esse cenário reflete a carência de estudos citogenéticos em aves, que abrangem apenas 10% das espécies descritas mundialmente, devido às peculiaridades de seus cariótipos e às dificuldades associadas à coleta *in situ*. Neste trabalho, aplicaram-se técnicas de citogenética clássica e molecular para investigar a evolução cromossômica em duas espécies representativas da família Thamnophilidae: *Thamnophilus caerulescens* e *Thamnophilus ruficapillus*. Além da coloração convencional, utilizaram-se as técnicas de banda C e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de sequências repetitivas, como 18S rDNA e sequências teloméricas (TTAGGG)₅. Os resultados revelaram cariótipos compostos por 80 cromossomos em *T. caerulescens* e 82 em *T. ruficapillus*, além de diferenças marcantes nos padrões de heterocromatina constitutiva, que sugerem a ocorrência de eventos evolutivos distintos, como inversões pericêntricas e fissões cromossômicas. Ademais, foram identificadas sequências teloméricas intersticiais (ITSs) nos primeiros sete pares cromossômicos de ambas as espécies, nunca antes descritas em Passeriformes. A correspondência entre as ITSs e a heterocromatina constitutiva em *T. ruficapillus* sugere que essas regiões sejam compostas por DNA repetitivo relacionado a sequências teloméricas ou remanescentes de rearranjos cromossômicos. Por outro lado, em *T. caerulescens*, outros mecanismos parecem estar envolvidos na origem dessas regiões. Essas descobertas enriquecem o conhecimento sobre a dinâmica evolutiva dos cromossomos na família Thamnophilidae e reforçam a importância de estudos adicionais com técnicas moleculares avançadas para esclarecer as complexas interações entre sequências repetitivas e a evolução cromossômica nas aves.

ABSTRACT

Birds represent the most diverse group among terrestrial tetrapods, with the Passeriformes order accounting for approximately 60% of the class's total species richness. Within this group, the Suboscines suborder stands out as the most ancient lineage of Passeriformes, encompassing highly diversified families such as Thamnophilidae. This family, comprising insectivorous birds restricted to Neotropical forests, includes 237 described species, of which only five have been cytogenetically analyzed. This scenario highlights the scarcity of cytogenetic studies in birds, representing only about 10% of all globally described species, largely due to the unique characteristics of their karyotypes and the challenges associated with *in situ* collection. In this study, classical and molecular cytogenetic techniques were applied to investigate chromosomal evolution in two representative species of the Thamnophilidae family: *Thamnophilus caerulescens* and *Thamnophilus ruficapillus*. In addition to conventional staining, C-banding and fluorescence in situ hybridization (FISH) were performed using probes for repetitive sequences such as 18S rDNA and telomeric repeats (TTAGGG)₅. The results revealed karyotypes consisting of 80 chromosomes in *T. caerulescens* and 82 in *T. ruficapillus*, with marked differences in constitutive heterochromatin patterns, suggesting distinct evolutionary events such as pericentric inversions and chromosomal fissions. Moreover, interstitial telomeric sequences (ITSs) were identified in the first seven chromosomal pairs of both species, a novel finding in Passeriformes. The correspondence between ITSs and constitutive heterochromatin in *T. ruficapillus* suggests that these regions consist of repetitive DNA related to telomeric sequences or remnants of chromosomal rearrangements. Conversely, in *T. caerulescens*, other mechanisms appear to be involved in the origin of these regions. Thus, these findings contribute to our understanding of chromosomal evolutionary dynamics in the Thamnophilidae family and underscore the importance of additional studies using advanced molecular techniques to elucidate the complex interactions between repetitive sequences and chromosomal evolution in birds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécies da família Thamnophilidae com ocorrência no Rio Grande do Sul, a: *Thamnophilus caerulescens*, b: *Thamnophilus ruficapillus* e c: *Mackenziaena leachii*.....17

Figura 2. Classificação da morfologia cromossômica.....18

Figuras do artigo

Figure 1. Karyotypes of females specimens of *Thamnophilus caerulescens* (2n=80) (a) and *Thamnophilus ruficapillus* (2n=82) (b). Scale bar = 10 μ m.....33

Figure 2. Distribution of constitutive heterochromatin, telomeric (TTAGGG)₅ and 18S rDNA sequences in *Thamnophilus caerulescens* (a-c) and *Thamnophilus ruficapillus* (d-f) metaphases, sexual chromosomes (a, d) and chromosomes bearing the 18S rDNA sequence (e, f) are indicated. Scale bar = 10 μ m.....34

Figure 3. Partial karyotypes of *Thamnophilus caerulescens* (a) and *Thamnophilus ruficapillus* (b), highlighting distinct patterns of constitutive heterochromatin and interstitial telomeric sequences (ITS). Scale bar = 10 μ m.....35

LISTA DE TABELAS

Tabela do artigo

Table 1. Species of birds with interstitial telomeric sequences (ITSs) detected by fluorescence <i>in situ</i> hybridization (FISH).....	39
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2n: Número diploide

A: Adenina

BACs: Cromossomos Artificiais de Bactéria

Ba(OH)₂: Hidróxido de bário

BOE: *Burhinus oedícnemus*

C: Citosina

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

°C: Grau Celsius

dNTP: Desoxinucleotídeo trifosfato

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EVEs: Vírus endógenos

FISH: Hibridização *in situ* fluorescente

Fig.: Figura

G: Guanina

Gbp: Gigabase pares

GGA: *Gallus gallus*

Het-ITSs: Sequências teloméricas intersticiais heterocromáticas

HCl: Ácido clorídrico

ITSs: Sequências teloméricas intersticiais

LINE-CR1: Elementos longos intercalados; repetição de galinha I

mM: Milimolar

MgCl₂: Cloreto de magnésio

NAHR: Recombinação homóloga não alélica

N: Normalidade

NORs: Regiões organizadoras de nucléolo

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH: Potencial hidrogeniônico

rDNA: Ácido desoxirribonucleico ribossômico

rRNA: Ácido ribonucleico ribossômico

s-ITSs: Sequências teloméricas intersticiais curtas

SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SSC: Solução salina citrato

T: Timina

TEs: Elementos transponíveis

TRFs: Fatores de ligação de repetição de telômero

U: Unidade de atividade enzimática

μL : Microlitro

μM : Micromolar

$\mu\text{g/mL}$: Micrograma por mililitro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1.	Classe Aves.....	15
2.2.	Características da família Thamnophilidae	16
2.3.	Citogenética de Aves.....	17
2.4.	Sequências repetitivas em Aves	20
3.	OBJETIVOS	25
3.1.	Objetivo geral.....	25
3.2.	Objetivos específicos	25
4.	ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA CYTOGENETIC AND GENOME RESEARCH	26
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
6.	REFERÊNCIAS	53
7.	APÊNDICES	62

1. INTRODUÇÃO

As aves são uma importante classe de vertebrados, representando o grupo mais diversificado dos tetrápodes terrestres, cuja evolução está associada à capacidade do voo, o que lhes garantiu uma ampla distribuição ao longo do tempo (Pough et al. 2008; Barrowclough et al. 2016; Billerman et al. 2022). O Brasil destaca-se como um dos países com a maior diversidade de aves do mundo, onde das 11.000 espécies há registro de 1.971 no país (Pacheco et al. 2021). A ordem Passeriformes representa aproximadamente 60% da riqueza total de aves, subdividindo-se em Oscines e Suboscines, onde a primeira compreende cerca de 80% das espécies da ordem, destacando-se pelos seus cantos mais complexos, enquanto os Suboscines constituem a linhagem mais antiga dos Passeriformes (Selvatti et al. 2015; Favretto 2023).

A família Thamnophilidae é caracterizada por uma rica diversidade de espécies de aves passeriformes insetívoras, pertencentes a radiação dos furnarídeos, e ao clado de suboscines do Novo Mundo, sendo restrita às florestas neotropicais (Irestedt et al. 2002; 2004). A constituição cromossômica desta família é pouco conhecida, com apenas cinco espécies estudadas até o momento (De Lucca 1974; De Lucca and Chamma 1977; Ledesma et al. 2002; Ribas et al. 2021).

O genoma das aves se destaca por suas características singulares, sendo o menor entre os amniotas, caracterizado por uma baixa proporção de DNA repetitivo, genes mais curtos e regiões não codificantes, além de uma perda extensiva de membros de famílias de genes. O baixo conteúdo repetitivo nos genomas das aves pode limitar as oportunidades de mudanças genômicas, contribuindo para a manutenção de cromossomos independentes após a quebra, possivelmente explicando os numerosos microcromossomos e justificando o alto número diploide nos cariótipos das aves (Scanes 2014; Zhang et al. 2014).

A citogenética clássica fundamenta-se principalmente na utilização da coloração convencional e técnicas de bandas cromossômicas, possibilitando a identificação dos cromossomos e caracteres úteis para comparações entre cariótipos (Guerra 1988; De Oliveira et al. 2006). Essa ciência aplicada na

Classe Aves carece de mais estudos, onde apenas 10% das espécies foram descritas cariotipicamente. As peculiaridades inerentes a citogenética do grupo bem como às dificuldades de coleta *in situ* são fatores contribuintes para essa baixa porcentagem (Degrandi et al. 2020). Nas aves, destaca-se um elevado número diploide (76 a 82 cromossomos na maioria das espécies), juntamente com a configuração bimodal do cariótipo (macrochromossomos e microchromossomos). Possuindo de 8 a 10 pares de macrochromossomos, e a grande maioria, de 30 a 32 pares composta por microchromossomos (De Oliveira et al. 2006).

O sistema sexual das aves é caracterizado pelos cromossomos sexuais ZZ e ZW, nos quais as fêmeas representam o sexo heterogamético e os machos o sexo homogamético ZZ. Uma distinção significativa é observada entre os grupos de aves conhecidos como paleognatas e neognatas, com as primeiras apresentando os cromossomos sexuais morfologicamente e geneticamente iguais, enquanto as neognatas exibem notáveis diferenças no tamanho e morfologia desses cromossomos (Belterman and De Boer 1984; Gunski et al. 2000; Stiglec et al. 2007; Correia et al. 2009; Wang et al. 2021) .

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) tem sido amplamente empregada na investigação da presença ou ausência de sequências de microssatélites, bem como na identificação dos pares cromossômicos que as contêm. Porém, o número de estudos utilizando esta metodologia, revela-se ínfimo diante da diversidade da Classe Aves. Destacando a importância de explorar profundamente as implicações dessas sequências repetitivas, as quais, embora constituam uma fração diminuta nos genomas das aves, oferecem informações cruciais sobre a evolução dos cromossomos sexuais e o processo de diferenciação cromossômica. Esse enfoque torna-se particularmente relevante em espécies com cromossomos sexuais atípicos, onde a presença dos microssatélites pode explicar o notável tamanho dessas estruturas cromossômicas (de Oliveira et al. 2017, de Oliveira Furo et al. 2017; Kretschmer et al. 2018; 2020 a,b; 2021; Barcellos et al. 2019; Gunski et al. 2019; de Souza et al. 2020; Tura et al. 2022).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Classe Aves

As aves são uma importante classe de vertebrados, representando o grupo mais diversificado dos tetrápodes terrestres, com mais de onze mil espécies (Billerman et al. 2022). Trata-se de um grupo cuja evolução está associada à capacidade de voo, embora muitos grupos tenham abdicado dessa capacidade secundariamente, o que lhes garantiu uma ampla distribuição e diversificação ao longo do tempo (Pough et al. 2008; Barrowclough et al. 2016).

O Brasil destaca-se como um dos países com a maior diversidade de aves do mundo, abrigando mais da metade das espécies encontradas no continente sul-americano (Pacheco et al. 2021). Além disso, ocupa a terceira posição entre os países com maior número de espécies endêmicas, ficando atrás apenas da Indonésia e Austrália, com 258 espécies registradas (“BirdLife International” 2024). Atualmente, há registro da ocorrência de 1.971 espécies, divididas em 33 ordens, e 105 famílias. Destas, 88,4% das espécies são residentes ou migrantes reprodutivas, 6,4% são visitantes sazonais não reprodutivas e 5,2% são vagantes (Pacheco et al. 2021).

Conforme a última lista de aves do Rio Grande do Sul, o estado apresenta uma riqueza de 704 espécies. Apesar da avifauna regional ser relativamente bem conhecida, o número de novas espécies segue crescendo a cada atualização da lista, como apontado nestes estudos (Pillar et al. 2009; Franz et al. 2018). Segundo o Decreto nº 51.797, de 8 de setembro de 2014, um número expressivo de aves ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul, chegando a 100 espécies, além de 36 quase ameaçadas e 18 com dados insuficientes para avaliação do seu risco de extinção. No bioma Pampa, 50 espécies são consideradas ameaçadas de extinção, levando em consideração as listas locais, nacionais e globais.

De acordo com Pillar (2009), 21% das aves continentais presentes no Rio Grande do Sul habitam áreas campestres ou savânicas, enquanto a maioria ocupa outros tipos de habitats, como ambientes aquáticos e florestais, especialmente as matas ciliares. Estes ambientes estão representados no Sul do Brasil pelo bioma Pampa, que abrange mais da metade do estado do Rio

Grande do Sul. O bioma não se limita apenas a áreas abertas, mas também inclui ambientes florestais, nos quais são encontradas espécies associadas a ambientes de mata.

As aves desempenham papéis cruciais na natureza, contribuindo para a manutenção do equilíbrio ecológico. Elas oferecem valiosas contribuições, como a dispersão de sementes, a polinização de flores e o controle de pragas em plantações (Perfecto et al. 1996; Rice and Greenberg 2000), desempenhando assim um papel fundamental na promoção da biodiversidade e na sustentabilidade dos ecossistemas.

A ordem Passeriformes destaca-se como a maior entre as aves, abrigando atualmente 6.533 espécies, o que representa cerca de 60% da riqueza total de aves no mundo. As aves pertencentes a essa ordem, em geral, exibem dimensões menores em comparação com outras espécies, apresentando uma notável uniformidade em sua morfologia, frequentemente evocando a imagem clássica dos "passarinhos". Essa ordem se subdivide em duas subordens, Oscines e Suboscines. A primeira destaca-se por suas vocalizações mais complexas, aprimorando o repertório de cantos por meio da imitação de outros indivíduos, graças ao maior número de músculos presentes na seringe. Os Oscines também representam a grande maioria dos Passeriformes, compreendendo cerca de 80% das espécies e abrangendo 776 gêneros. Em contraste, os Suboscines, com 284 gêneros, constituem a linhagem mais antiga dentro da ordem (Selvatti et al. 2015; Favretto 2023).

2.2. Características da família Thamnophilidae

A família Thamnophilidae, conhecida como "typical antbirds", constitui um grupo monofilético, caracterizado por uma rica diversidade de espécies de aves passeriformes insetívoras (Fig. 2) (Irestedt et al. 2004). Esta família faz parte da radiação dos furnarídeos, pertencentes ao clado de suboscines do Novo Mundo (Irestedt et al. 2002), sendo restrita às florestas neotropicais e abrangendo 63 gêneros com 237 espécies (Winkler et al. 2020). Os "typical antbirds" apresentam uma grande variação no tamanho, padrões e cores da plumagem, com dimorfismo sexual em muitas espécies. O nome vernacular da

família se originou devido ao hábito de seguir exércitos de formigas (“army ants”), que representa a especialização de algumas espécies e é a característica mais distintiva reconhecida na família (Irestedt et al. 2004).

Dentro da ordem Passeriformes, foram realizadas descrições cariotípicas para três famílias da Pavordem Furnariida (Conopophagidae, Furnariidae e Thamnophilidae), com o número diplóide variando de 76 a 82 cromossomos (Degrandi et al. 2020). A citogenética da família Thamnophilidae ainda é pouco conhecida, com apenas cinco espécies estudadas até o momento: *Dysithamnus mentalis* (2n=76), *Myrmotherula bauxwelli* (2n=80), *Pyriglena leucoptera* (2n=82), *Thamnophilus doliatus* (2n=82) e *Willisornis vidua* (2n=80) (De Lucca 1974; De Lucca and Chamma 1977; Ledesma et al. 2002; Ribas et al. 2021). A maioria desses estudos são antigos e baseiam-se principalmente na coloração convencional, sendo que apenas em *Willisornis vidua* envolve uma abordagem de citogenética molecular, utilizando “Bacterial Artificial Chromosomes” (BACs) e pintura cromossômica com sondas de *Gallus gallus* (GGA) e *Burhinus oediconemus* (BOE).

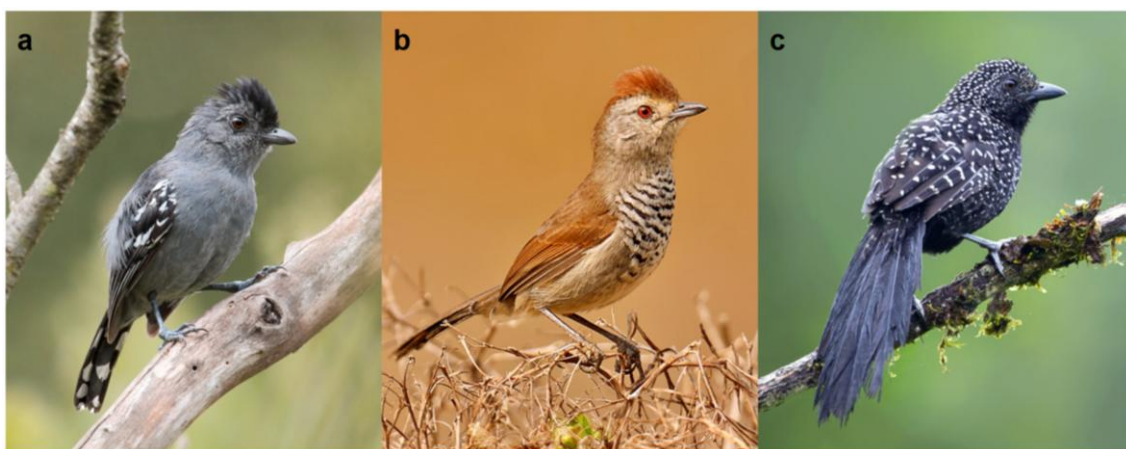


Fig. 1. Espécies da família Thamnophilidae com ocorrência no Rio Grande do Sul, a: *Thamnophilus caerulescens*, b: *Thamnophilus ruficapillus* e c: *Mackenziaena leachii*. Fonte: Wikiaves.

2.3. Citogenética de Aves

A citogenética abrange todo estudo relacionado aos cromossomos, seja de forma isolada ou em conjunto, condensados ou distendidos, explorando sua morfologia, organização, função, replicação, variação e evolução (Guerra 1988). A abordagem clássica da citogenética fundamenta-se na utilização da

coloração convencional (Giemsa) e na aplicação de técnicas de bandeamento cromossômico. Destacam-se a detecção de regiões ricas em heterocromatina constitutiva (Banda C), a localização das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) e a identificação de regiões ricas em Adenina e Timina (AT), e Guanina e Citosina (GC) (Banda G). Essas técnicas possibilitam uma caracterização detalhada do cariótipo, permitindo a identificação individual dos pares cromossômicos e de caracteres úteis para comparações intra e interespecies dentro do mesmo grupo, ou até mesmo entre grupos filogeneticamente distantes (De Oliveira et al. 2006).

Ao aplicar a citogenética na Classe Aves, apenas 10% das espécies foram descritas cariotipicamente. Esse número reduzido pode ser atribuído a algumas peculiaridades citogenéticas inerentes ao grupo, bem como às dificuldades associadas à coleta *in situ* de espécimes. Nas aves, destaca-se um elevado número diploide, sendo que a maioria das espécies apresenta entre 76 e 82 cromossomos (~60%) (Degrandi et al. 2020). Adicionalmente, caracterizam-se por uma configuração bimodal, composta por macrocromossomos e microcromossomos. Estes últimos, devido ao seu pequeno tamanho, apresentam desafios na identificação, impossibilitando a classificação morfológica (metacêntrico, submetacêntrico, acrocêntrico e telocêntrico) observada nos macrocromossomos (Fig. 1) (De Oliveira et al. 2006).

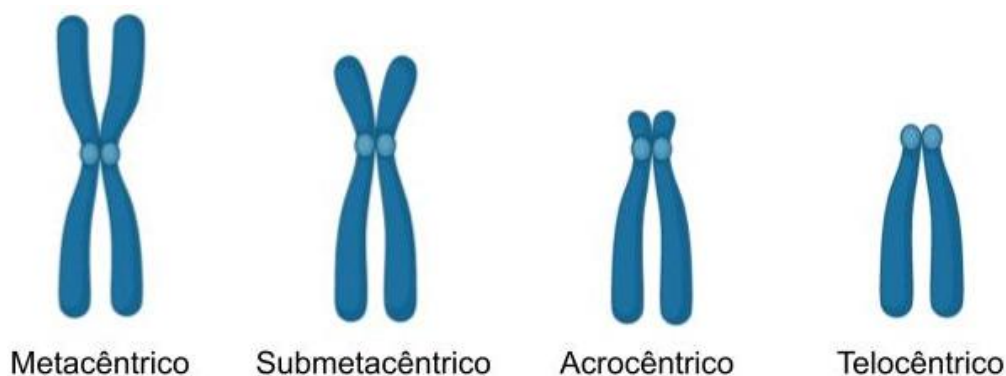


Fig. 1. Classificação da morfologia cromossômica. Fonte: Biorender.

Dentro do padrão cariotípico característico desta classe, onde a maioria das espécies possui 80 cromossomos, observa-se que de oito a dez pares são macrocromossomos, enquanto a grande maioria, composta por 30 a 32 pares,

é constituída por microcromossomos. Apesar de sua abundância, os microcromossomos representam apenas 23% do tamanho médio do genoma das aves, contudo, são de grande relevância, dado seu enriquecimento em GC e a densidade de genes que compreende aproximadamente 50% (McQueen et al. 1998; Burt 2002; Ferguson-Smith et al. 2005; Warren et al. 2017). Os genomas das aves exibem uma notável conservação, tanto em relação ao número cromossômico e à ordem dos genes, quanto à estabilidade dos macrocromossomos e microcromossomos, características raramente encontradas em outras classes (Zhang et al. 2014; O'Connor et al. 2019).

Apesar de grande parte das aves possuírem $2n=80$, observa-se uma grande variação, com o menor número diploide encontrado na ordem Falconiformes (*Falco columbarius*, $2n = 40$) e o maior em Musophagiformes (*Corythaixoides concolor*, $2n = 142$). Estes números atípicos também são encontrados em outras ordens, como Charadriiformes (*Burhinus oedicephalus*, $2n = 42$), Coraciformes (*Bycanistes bucinator*, $2n = 40$; *Alcedo atthis*, $2n = 132$), Bucerotiformes (*Upupa epops*, $2n = 126$), Piciformes (*Pteroglossus inscriptus*, $2n = 112$), e Psittaciformes (*Trichoglossus flavoviridis*, $2n = 46$) (Degrandi et al. 2020).

O sistema de determinação sexual em aves é caracterizado pela presença dos cromossomos sexuais ZZ e ZW, nos quais as fêmeas representam o sexo heterogamético ZW, enquanto os machos representam o sexo homogamético ZZ. Uma distinção significativa é observada entre os grupos de aves conhecidos como paleognatas e neognatas. As paleognatas, incluindo Struthioniformes, Rheiformes, Casuariiformes e Apterygiformes são consideradas aves ancestrais, apresentando cromossomos sexuais morfologicamente e geneticamente idênticos, exceto por uma pequena região no braço curto e centromérica do cromossomo W. Por outro lado, as neognatas, que abrangem as demais ordens existentes, geralmente exibem notáveis diferenças morfológicas e de tamanho entre os cromossomos sexuais (Belterman and De Boer 1984; Gunski et al. 2000; Stiglec et al. 2007; Correia et al. 2009; Wang et al. 2021). Embora exista uma tendência geral de o cromossomo W ser menor do que o cromossomo Z, pobre em genes e em grande parte heterocromático, há exceções em que o cromossomo W

apresenta tamanho semelhante ou até maior do que o cromossomo Z (Shetty et al. 1999).

Algumas peculiaridades relacionadas aos cromossomos sexuais podem ser identificadas em diferentes espécies. Nos casos de *Nyctibius griseus*, *Trogon surrucura*, *Pygochelidon cyanoleuca* e *Porphyriops melanops*, nota-se uma variação no tamanho do cromossomo W. Nas três primeiras espécies, o cromossomo W apresenta dimensões semelhantes ao Z, enquanto em *Porphyriops melanops*, o cromossomo W é significativamente maior que o Z (Degrandi et al. 2017; Barcellos et al. 2019; Gunski et al. 2019; de Souza et al. 2020). Embora o cromossomo sexual Z seja geralmente conservado na Classe Aves, ocupando tipicamente a posição de quarto ou quinto maior em termos de tamanho, variações também são evidentes. Em *Colaptes campestris*, *Colaptes melanochloros*, *Melanerpes candidus* e *Chloroceryle americana*, por exemplo, observa-se que o cromossomo Z é o maior componente do complemento cromossômico (de Oliveira et al. 2017; Degrandi et al. 2018). Essas variações proporcionam uma visão abrangente do sistema de determinação sexual nas aves, revelando tanto características conservadas quanto particularidades distintas entre diferentes grupos taxonômicos.

2.4. Sequências repetitivas em Aves

O genoma das aves se destaca por suas características singulares, sendo o menor entre os amniotas, com uma média de 1,35 bilhão de pares de bases (Gbp). A variação nesse tamanho vai de 0,9 Gbp em *Archilochus alexandri* (Gregory et al. 2009) a 2,1 Gbp em *Struthio camelus* (Scanes 2014). Este genoma é caracterizado por uma baixa proporção de DNA repetitivo, genes mais curtos e regiões não codificantes, além de uma perda extensiva de membros de famílias de genes. A presença de DNA repetitivo no genoma das aves é notavelmente menor, representando apenas de 4 a 10%, em comparação com mamíferos, onde essa proporção varia de 35 a 52%. Uma exceção é a espécie *Picooides pubescens*, cujo genoma é composto por 22% de elementos transponíveis (TEs), resultado de uma expansão específica da

espécie ou linhagem de transposons LINE-CR1 (elementos longos intercalados; repetição de galinha I) (Zhang et al. 2014).

As sequências repetitivas de DNA desempenham um papel crucial na evolução do genoma em eucariotos, frequentemente atuando como modelos para recombinação homóloga não alélica (NAHR). Assim, o baixo conteúdo repetitivo nos genomas das aves pode limitar as oportunidades de mudanças genômicas, contribuindo para a manutenção de cromossomos independentes após a quebra, possivelmente explicando os numerosos microcromossomos e justificando o alto número diploide nos cariótipos das aves (Burt 2002; Gregory 2005; Wessler 2006; Lynch and Walsh 2007; Ellegren 2010; Braun et al. 2019). A elevada incidência de fusões cromossômicas está estreitamente vinculada ao aumento do conteúdo de sequências repetitivas em grupos como mamíferos e anfíbios (Voss et al. 2011; Uno et al. 2012). Em contraste, nas aves, essa tendência não se manifesta de maneira evidente, mesmo em espécies com cariótipos altamente rearranjados, a exemplo do *Falco peregrinus* (Damas et al. 2017), psitacíformes (Nanda et al. 2007) e *Harpia harpyja* (de Oliveira et al. 2005). A falta de correlação entre o número de rearranjos cromossômicos e o conteúdo de sequências repetitivas pode, no entanto, ser atribuída à escassez de estudos abordando a Classe Aves (Braun et al. 2019).

O DNA repetitivo pode ser categorizado em dois grupos principais: repetições dispersas (“Interspersed Repeats”) e repetições em tandem (“Tandem Repeats”). As repetições dispersas são elementos repetitivos que ocorrem em várias localizações não adjacentes e possuem meios diretos ou indiretos de se dispersar por todo o genoma, compreendendo principalmente os TEs e os vírus endógenos (EVEs) (Kazazian 2004; Katzourakis and Gifford 2010). Por outro lado, as repetições em tandem são elementos repetitivos adjacentes entre si, formando conjuntos de repetições. Esses podem surgir e proliferar por meio de uma variedade de mecanismos (escorregamento da replicação, conversão gênica, recombinação ectópica, replicação em círculo e troca desigual) e são classificados em microssatélites, minissatélites, satélites, famílias de genes e variações no número de cópias (Braun et al. 2019).

Os microssatélites são constituídos por sequências de DNA altamente variáveis e repetitivas, compostas por pequenos segmentos de um a seis pares de bases que se repetem em tandem. Essas sequências não ultrapassam algumas centenas de pares de bases, e estão distribuídas em diversos locais ao longo dos cromossomos (Ellegren 2004). Em sua maioria, são consideradas não funcionais e, conseqüentemente, sujeitas a uma pressão seletiva limitada, embora existam exceções, como a regulação da organização da cromatina e expressão gênica (Li et al. 2002). As taxas de mutação nessas sequências são significativamente altas, variando de 10 a 100.000 vezes mais do que em outras regiões do genoma, devido a erros no processo de replicação do DNA. Em virtude dessa característica, os microssatélites desempenham um papel crucial como marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em populações, tanto naturais quanto em cativeiro (Gemayel et al. 2010; Braun et al. 2019).

Composta por extensas sequências repetitivas de cópias de genes de RNA ribossômico (rRNA), a região organizadora do nucléolo (NOR), desempenha um papel crucial na função celular. Localizada em cromossomos específicos, a NOR é responsável pela formação do nucléolo, uma estrutura nuclear essencial para a síntese de ribossomos (Graw 2015). No genoma eucariótico, diversas cópias desses clusters são organizadas em tandem no DNA, formando os sítios 5S e 45S rDNA (Daniels and Delany 2003; Dyomin et al. 2016). Devido à natureza altamente repetitiva e complexa dessas regiões, os esforços de sequenciamento enfrentaram desafios significativos, com sucesso limitado até o momento (Warren et al. 2017; Braun et al. 2019).

Por meio da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), utilizando sondas dos genes presentes nos clusters de rDNA, torna-se possível identificar de maneira precisa os cromossomos portadores, mesmo quando inativos (O'Connor 2008). Esta abordagem se destaca em relação à impregnação de nitrato de prata, que apenas identifica os cromossomos com locais 45S rDNA em atividade transitória, manifestando variação entre células e indivíduos (Zurita et al. 1997).

O sítio de 45S rDNA encontra-se predominantemente localizado em um único par de microcromossomos nas aves, representando seu estado ancestral. Contudo, há variações desse padrão, como a presença dessa sequência em mais de um par de microcromossomos, exemplificado em *Falco peregrinus*, que possui seis pares de microcromossomos portadores da NOR (Nishida et al. 2008). Além disso, há casos em que essa sequência se localiza em macrocromossomos, como observado em *Dendrocolaptes platyrostris* (Degrandi et al., 2020), ou até mesmo em ambos, microcromossomos e macrocromossomos, como evidenciado em *Harpia harpyja* (Tagliarini et al. 2009).

Caracterizados pela sequência repetitiva "TTAGGG", os telômeros representam um microssatélite composto por seis nucleotídeos, organizado em repetições em tandem com diferentes comprimentos e associado a proteínas específicas (TRFs, fatores de ligação de repetição de telômero) (Bilaud et al. 1997). Exibem uma estrutura altamente conservada nos eucariotos, com a finalidade de proteger as extremidades cromossômicas contra alterações deletérias por enzimas ou impedir a quebra e fusão com outros cromossomos durante a replicação na mitose e meiose (Blackburn et al. 2006).

Em aves, a presença abundante da sequência não se restringe às extremidades cromossômicas, estendendo-se também a porções intersticiais, como evidenciado no cromossomo 3 de *Falco columbarius*. Nesse contexto, a localização da sequência "TTAGGG" na porção intersticial indica um remanescente de fusão cromossômica ancestral (Nishida et al. 2008). Além disso, alguns microcromossomos apresentam conjuntos de telômeros de dimensões superiores em comparação com outros cromossomos, evidenciados por sinais mais intensos de fluorescência (Nanda et al. 2002).

A investigação da presença/ausência e dos pares cromossômicos no genoma das aves que possuem sequências de microssatélites tem sido conduzida por meio da técnica de FISH. Utilizando sondas específicas para microssatélites, como CA, CAA, CAC, CAG, CAT, CG, CGG, GA, GAA, GAC, GAG, GC, TA, TAAGGG, 18S rDNA e 5SrDNA, tal abordagem busca caracterizar detalhadamente essas regiões genômicas. A lacuna na pesquisa

destaca a necessidade premente de explorar mais profundamente as implicações dessas sequências repetitivas, as quais, embora constituam uma fração diminuta dos genomas das aves, oferecem informações cruciais sobre a evolução dos cromossomos sexuais e o processo de diferenciação cromossômica. Esse enfoque torna-se particularmente relevante em espécies com cromossomos sexuais atípicos, onde a presença dos microssatélites pode explicar o notável tamanho dessas estruturas cromossômicas (de Oliveira et al. 2017, de Oliveira Furo et al. 2017; Kretschmer et al. 2018; 2020 a,b; 2021; Barcellos et al. 2019; Gunski et al. 2019; de Souza et al. 2020; Tura et al. 2022).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Analisar comparativamente a distribuição de sequências repetitivas no cariótipo de duas espécies da família *Thamnophilidae* (Aves, Passeriformes).

3.2. Objetivos específicos

Determinar a distribuição de blocos de heterocromatina constitutiva em duas espécies de *Thamnophilidae*;

Determinar a distribuição de clusters de 18S rDNA em duas espécies de *Thamnophilidae*;

Determinar a distribuição de sequências teloméricas em duas espécies de *Thamnophilidae*;

Inferir sobre os mecanismos responsáveis pela diversificação da distribuição de sequências repetitivas.

4. ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA CYTOGENETIC AND GENOME RESEARCH

Research Article

***Atypical Presence of Interstitial Telomeric Sequences in
Thamnophilus Species (Passeriformes: Thamnophilidae)***

Vitor Oliveira de Rosso^{ab}, Hybraim Severo Salau^{ab}, Lilian de Oliveira Machado^a,
Victoria Tura^c, Fabiano Pimentel Torres^a, Ricardo José Gunski^{ab}, Analía del Valle
Garnero^{ab}

^a Laboratório de Diversidade Genética Animal, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, 97300-162, RS, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, RS, Brazil

^c Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Coordenação de Biodiversidade, Manaus, 69067-375, AM, Brazil

Short Title: Interstitial Telomeric Sequences in *Thamnophilus* Species

Corresponding Author:

Vitor de Rosso, Analía Garnero

E-mail address:

derossovo@outlook.com, analiagarnero@unipampa.edu.br

Keywords: Bird, Chromosome, Comparative cytogenetics, rDNA, Constitutive Heterochromatin.

Abstract

Introduction: *Thamnophilidae* (typical antbirds) are a diverse family of insectivorous passerine birds restricted to neotropical forests, encompassing 237 species, of which only five have been studied cytogenetically. Methods: To investigate the chromosomal evolution of this group, we applied classical and molecular cytogenetic techniques, including conventional staining, C-banding, and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with probes for repetitive telomeric sequences (TTAGGG)₅ and 18S rDNA, in two representative species: *Thamnophilus caerulescens* and *Thamnophilus ruficapillus*. Results: The karyotypes of *T. caerulescens* and *T. ruficapillus* comprise 80 and 82 chromosomes, respectively. In addition to a possible fission in *T. ruficapillus*, morphological differences suggest the occurrence of pericentric inversions in the chromosomes of this species. The patterns of constitutive heterochromatin differed between the species: both showed centromeric markings and heterochromatin on the W chromosome, but *T. ruficapillus* also exhibited interstitial markings on seven chromosomal pairs. Both species presented interstitial telomeric sequences (ITSs) in the first seven pairs, which corresponded to constitutive heterochromatin in *T. ruficapillus*. The 18S rDNA probe hybridized to a single pair of microchromosomes in *T. caerulescens* and two pairs in *T. ruficapillus*. Conclusion: This study revealed novel patterns of constitutive heterochromatin in *T. ruficapillus* and ITSs in both species, which have not been previously observed in Passeriformes. The correspondence between constitutive heterochromatin and ITSs in *T. ruficapillus* suggests that these sequences are composed of repetitive DNA highly similar to telomeric sequences and/or are remnants of pericentric inversions, whereas in *T. caerulescens*, other mechanisms seem to be involved. The differences in observed patterns highlight distinct chromosomal evolution between these species, emphasizing the diversity within the family *Thamnophilidae* and the genus *Thamnophilus*, in contrast to the conserved patterns typically observed in the class Aves.

Introduction

The Thamnophilidae family, also known as typical antbirds, forms an species-rich monophyletic group of insectivorous passeriformes birds [1]. It is believed that this family radiates from the Furnariidae family, which belongs to the neotropical restricted clade New World Suboscines [2]. The group currently comprises 63 genera with around 237 species [3]. The typical antbirds exhibit a wide diversity in terms of size, plumage pattern and feather colors, with a lot of species displaying sexual dimorphism. The family's vernacular name originates from the ant-following behavior, which represents the foraging strategy of some species and is a notable characteristic that distinguishes the family [1].

Within the Passeriformes order, karyotypic descriptions were carried out for three families from the Furnariida Pavordem (Conopophagidae, Furnariidae e Thamnophilidae), with the diploid number ranging from 76 to 82 chromosomes [4]. The karyotypic descriptions for the Thamnophilidae family are scarce, with only five species studied till the present moment: *Dysithamnus mentalis* ($2n=76$), *Isleria hauxwelli* ($2n=80$), *Pyriglena leucoptera* ($2n=82$), *Thamnophilus doliatus* ($2n=82$) and *Willisornis vidua* ($2n=80$) [5–8]. Most of those studies date from as early 1974, and utilizes exclusively conventional Giemsa staining. Only in *W. vidua* a molecular cytogenetic approach was used, which includes Bacterial Artificial Chromosomes (BAC) and *Gallus gallus* and *Burhinus oediconemus* whole-chromosome hybridization [8].

The genome of birds is characterized by its unique properties. It is the smallest among vertebrates and is one third the size of the mammalian genome. It comprises an average of 1.33 billion base pairs (Gb), ranging from 0.89 Gb in *Archilochus alexandri* [9] to 2.11 Gb in *Struthio camelus* [10]. On the other hand, phylogenetic related groups such as Crocodylia and Testudines have bigger genomes, with average genome sizes of 2.96 Gb (2.44-3.86 Gb) and 2.80 Gb (1.75 -5.32 Gb), respectively. The compact genome of birds is also reflected in the proportion of repetitive DNA, which is the lowest among amniotes (4.1-9.8%), with the family Picidae, whose proportion of transposable elements (TEs) reaches about 22%, being an exception [11].

Repetitive DNA has a crucial role in the eukaryotic genome evolution, frequently acting as models for non-allelic homologous recombination. Thus, the low repetitive content in bird genomes may limit opportunities for genomic changes, contributing to the maintenance of independent chromosomes after breakage, possibly explaining the numerous microchromosomes and justifying the high diploid number in bird karyotypes [12–17]. The high incidence of chromosome fusions is strictly linked to increased repetitive content in groups like mammals and amphibians [18,19]. In contrast, in birds, this tendency is not evident, even in species with highly rearranged karyotypes, e.g. *Harpia harpyja* [20] psittaciformes [21] and *Falco peregrinus* [22]. The lack of correlation between the number of chromosome rearrangements and the repetitive sequences content, however, can be attributed to the scarcity of studies in the Aves class [17].

Additionally, the nucleolus organizer regions (NOR), located in specific chromosomes, are composed of extensive repetitive sequences of ribosomal RNA genes and play a crucial role in cellular function. NOR is responsible for forming the nucleolus, an essential structure for ribosome synthesis [23]. Nevertheless, in the eukaryotic genome, several copies of these clusters are arranged in tandem through the DNA, forming the 5S e 45S rDNA sites [24,25]. Due to the highly repetitive and complex nature of those regions, the efforts for sequencing it, had significant challenges, with fairly limited success to this day [17,26].

Through the fluorescent *in situ* hybridization (FISH) technique, the precise identification of the chromosomes that carry those sequences is made possible by the use of specific probes for the sequences of the rDNA gene clusters, even when they are inactive [27]. This approach stands out when compared to the silver nitrate, considering that the last can only identify the chromosomes that have the 45S rDNA sites in transitory activity, an event that may vary between different cells and individuals [28].

The 45S rDNA site is predominantly located in a single pair of chromosomes in birds, representing the ancestral state. Yet, there are variations in this pattern, like the presence of this sequence in more than one pair of microchromosomes, as in *Falco peregrinus*, which has six pairs of

microchromosomes as carries for the NOR [29]. Besides that, there are cases where this sequence is located in macrochromosomes, as observed in *Dendrocolaptes platyrostris* [30], or even in both macro and microchromosomes, as observed in *Harpia harpyja* [31].

Characterized by the repetitive sequence “TTAGGG”, the telomeres represent a microsatellite composed of six nucleotides, arranged in tandem repetitions with different lengths and associated with specific proteins (TRFs) [32]. Exhibit a structure highly conserved in eukaryotes, with the main purpose of protecting chromosome ends against deleterious alterations by enzymes or preventing the breakage and fusion with other chromosomes during replication [33].

Telomeric repetitions, commonly localized at the chromosome ends, can also occur at non-terminal regions, denominated interstitial telomeric sequences (ITSs). There are two main groups of ITSs: the short ITSs (s-ITSs) and the heterochromatic ITSs (Het-ITSs). s-ITS, common in vertebrate genomes, show a low number of repetitions, which makes it hard to identify by FISH. In contrast, Het-ITSs consist of large blocks of telomeric repeats and, although less frequent, are easily detected by FISH, typically being located in heterochromatic regions, such as centromeric and pericentromeric regions [34].

In birds, the abundant presence of the telomeric sequence is not restricted to chromosomal ends but also extends to interstitial regions, which may or may not correspond to fusion points or constitutive heterochromatin. Furthermore, some microchromosomes exhibit larger telomeric arrays compared to other chromosomes, as evidenced by more intense fluorescence signals [21,29,35–38].

In order to expand the comprehension of the chromosome evolution within the *Thamnophilidae* family, we analyzed the karyotype of *Thamnophilus caerulescens* and *Thamnophilus ruficapilus* using a combination of classical and molecular cytogenetics techniques. C-banding experiments were carried out as a way to investigate the distribution of constitutive heterochromatin, and the FISH technique was used to detect and locate the repetitive sequences TTAGGG (telomeric sequence) as well as the 18S rDNA sequence. This

approach aims to provide insights about the chromosomal organization, and the dynamics of repetitive DNA, as well as the possible mechanisms that promoted the chromosomal evolution of these species, contributing to the limited cytogenetic data that is available in the antbirds literature.

Methods

Samples and chromosomal preparations

Three individuals of the species *T. caerulescens* (02 ♀, 01 ♂) and three of *T. ruficapillus* (02 ♀, 01 ♂) were collected in the municipalities of São Gabriel and Caçapava do Sul, located in the Pampa biome of Rio Grande do Sul state, Brazil. The specimens were captured using mist nets and handled in compliance with protocols approved by the Animal Ethics Committee (CEUA 019/2020, 024/2023) and the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO 61047-3, 33860-2, and 81564-1). Metaphase chromosomes were obtained through direct bone marrow cell culture [39].

Karyotyping and C-banding

To determine the diploid number, 50 metaphases per species were analyzed using conventional staining (5% Giemsa in phosphate buffer, pH 6.8). Constitutive heterochromatin-rich regions were identified following Sumner [40], with modifications. Slides were incubated at 60°C for 1 hour, treated with 0.2 N HCl at 42°C for 10 minutes, followed by treatment with 5% Ba(OH)₂ at 42°C for 3 minutes. Subsequently, the slides were treated with 2× SSC at 60°C for 1 hour and 30 minutes. Chromosomes were counterstained with 0.7 µL of propidium iodide (50 µg/mL) and mounted in 20 µL of Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) [41].

Repetitive DNA mapping by FISH

Telomeric probes (TTAGGG)₅ and 18S rDNA probes were used, amplified by polymerase chain reaction (PCR). The telomeric probes were amplified using the primers (TTAGGG)₅ and (CCCTAA)₅, without a DNA template, following the PCR conditions described by Kretschmer et al. [42]. For the 18S rDNA probe, specific primers were designed for conserved *loci* in the class Aves to detect the 45S rDNA site (in press). The PCR reaction was prepared with 1X PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 µM of

each primer (forward and reverse), 2.5 U of Taq DNA polymerase, and 25 ng of template DNA (nuclear DNA from *Gallus gallus* - Aves, Galliformes, Phasianidae). The PCR conditions included an initial denaturation at 95°C for 2 minutes, followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 57°C for 1 minute, and extension at 72°C for 1 minute and 30 seconds, with a final extension step at 72°C for 5 minutes. The probes were labeled with Aminoallyl-dUTP ATTO-550 (red) via Nick Translation (Jena Bioscience, Jena, Germany), and the FISH protocol was performed according to Kretschmer et al. [42]. To identify the hybridization patterns of each probe, 20 metaphases were analyzed, and all FISH experiments were repeated at least three times to confirm the results.

Image processing

The images were captured using an Olympus BX53 microscope (Olympus Corporation, Ishikawa, Japan) equipped with a CoolSNAP camera and processed using the CellSens Standard software. The GIMP software was used for karyotype assembly. Karyotype characterization was performed through biometric measurements in the ImageJ software, following the nomenclature proposed by Guerra [43]: metacentric, submetacentric, acrocentric, and telocentric.

Results

Karyotype Description

The karyotypes of *T. caeruleus* and *T. ruficapillus* consist of a total of 80 and 82 chromosomes, respectively (shown in Fig. 1). The chromosomal complement of *T. caeruleus* can be divided into 11 pairs of macrochromosomes, including the sex chromosome pair, and 29 pairs of microchromosomes (shown in Fig. 1a). Among these, the first seven pairs and the Z chromosome exhibit acrocentric morphology, while the W chromosome is metacentric, and the remaining chromosomes are telocentric. The karyotype of *T. ruficapillus* can be divided into 11 pairs of macrochromosomes, including the sex chromosome pair, and 30 pairs of microchromosomes (shown in Fig. 1b). Notably, all chromosomes are telocentric, except for chromosome 2, which has an acrocentric morphology.

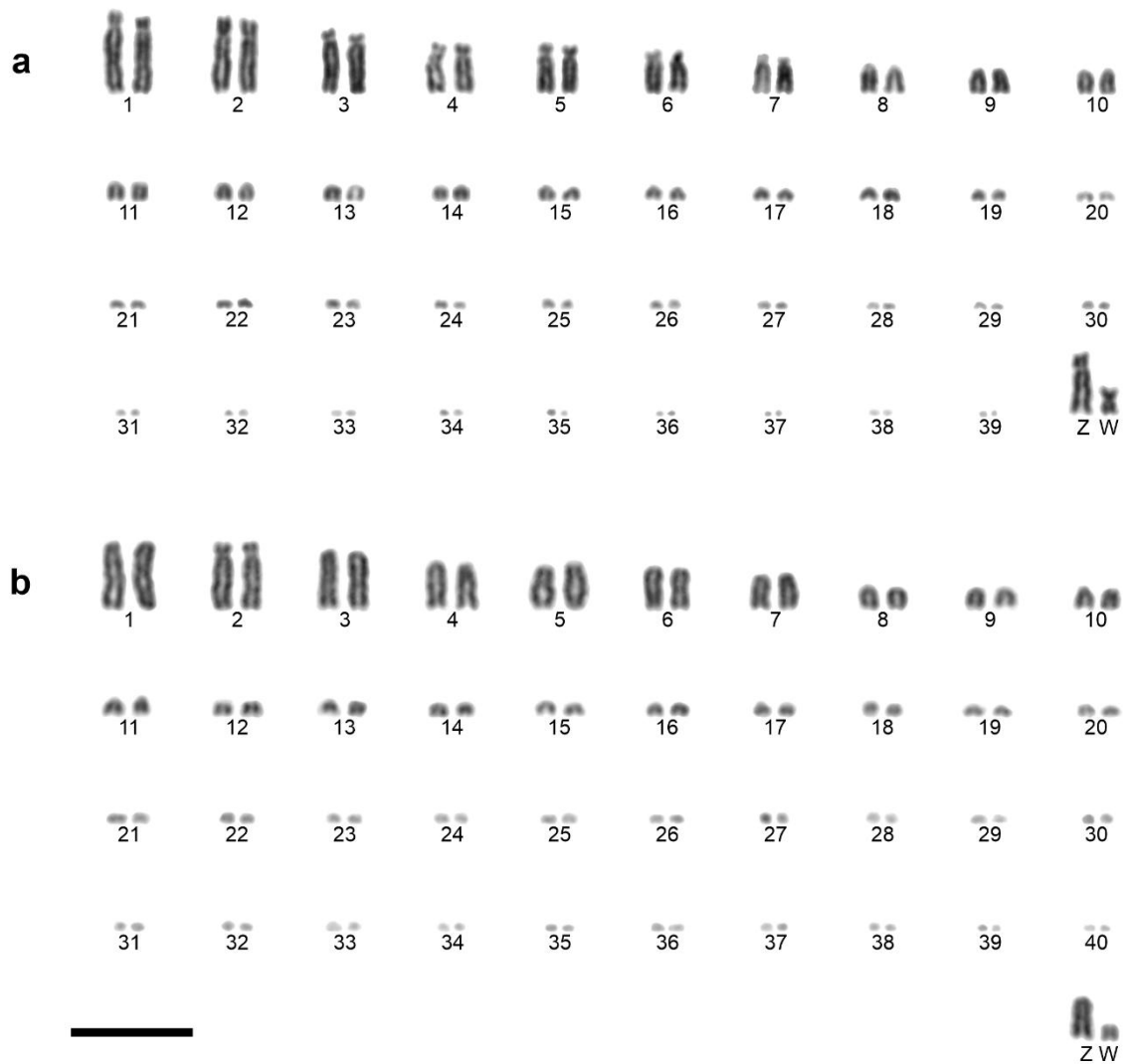


Fig. 1. Karyotypes of females specimens of *Thamnophilus caeruleus* ($2n=80$) (a) and *Thamnophilus ruficapillus* ($2n=82$) (b). Scale bar = 10 μ m.

Chromosomal Distribution of Constitutive heterochromatin, 18S rDNA and Telomeric sequence

In *T. caeruleus*, constitutive heterochromatin was identified in the centromeric regions of the chromosomes, with intense staining observed in the centromere of the W chromosome (shown in Fig. 2a, 3a). In *T. ruficapillus*, constitutive heterochromatin was detected in the centromeric regions of the chromosomes, with seven pairs displaying interstitial markings (shown in Fig. 3b). The W chromosome, in particular, showed more intense staining compared to the others (shown in Fig. 2d). The telomeric sequences (TTAGGG)₅ and 18S rDNA exhibited distinct patterns between the species. In *T. caeruleus*,

telomeric sequences are present both in the telomeres and in interstitial regions of the first seven pairs (shown in Fig. 2b, 3a), while the 18S rDNA is located in one pair of microchromosomes (shown in Fig. 2c). In *T. ruficapillus*, the telomeric sequences (TTAGGG)₅ are also present in interstitial regions of seven pairs, differing in their distribution (shown in Fig. 2e, 3b), while the 18S rDNA was identified in two pairs of microchromosomes (shown in Fig. 2f).

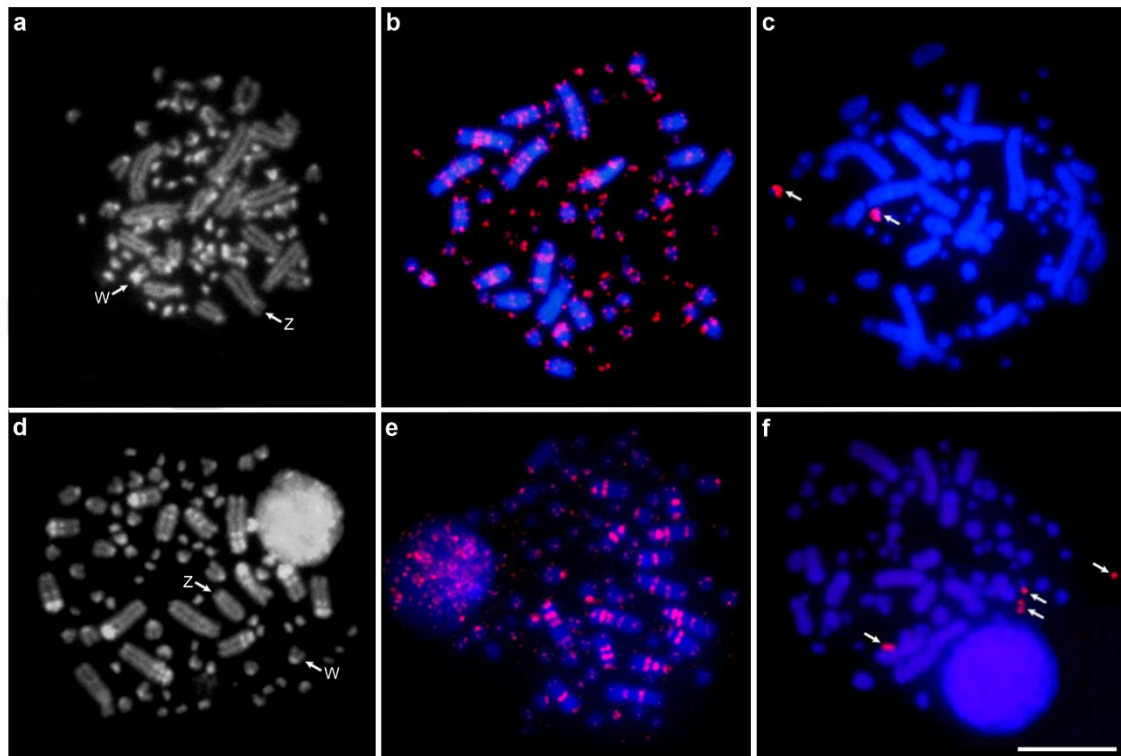


Fig. 2. Distribution of constitutive heterochromatin, telomeric (TTAGGG)₅ and 18S rDNA sequences in *Thamnophilus caerulescens* (a-c) and *Thamnophilus ruficapillus* (d-f) metaphases, sexual chromosomes (a, d) and chromosomes bearing the 18S rDNA sequence (e, f) are indicated. Scale bar = 10 μ m.

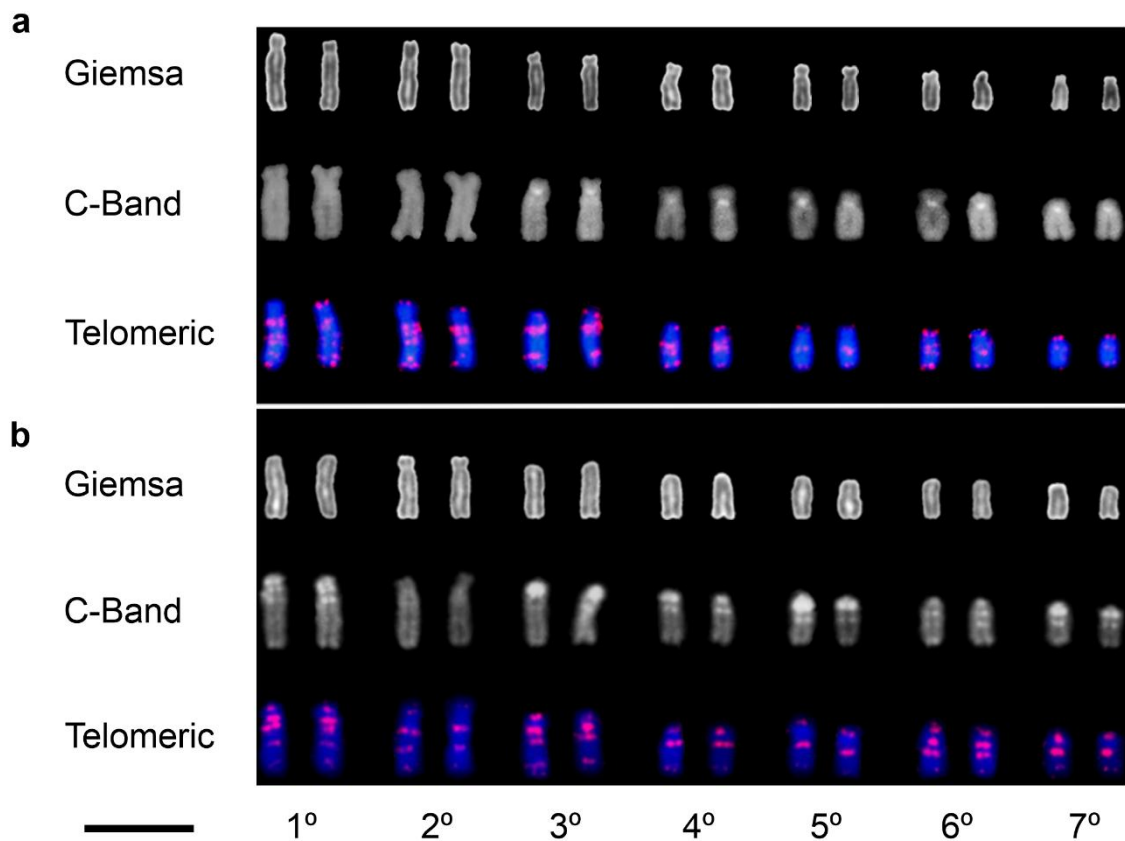


Fig. 3. Partial karyotypes of *Thamnophilus caerulescens* (a) and *Thamnophilus ruficapillus* (b), highlighting distinct patterns of constitutive heterochromatin and interstitial telomeric sequences (ITS). Scale bar = 10 μ m.

Discussion

The data obtained in this study on *T. caerulescens* and *T. ruficapillus* contribute to the advancement of avian cytogenetics and our understanding of the family Thamnophilidae, a group that is underrepresented in this area. To date, only five species from this family have been analyzed, and of these, only one has been studied in the last 20 years with modern molecular cytogenetic techniques [5–8]. In this context, the localization of repetitive telomeric sequences (TTAGGG)₅ and 18S rDNA identified through FISH represents the first detailed description for Thamnophilidae.

Cytogenetic analysis of *T. caerulescens* (2n=80) and *T. ruficapillus* (2n=82) reveals significant differences in diploid number and chromosomal morphology. The diploid number of 2n=80, observed in *T. caerulescens*, *I. hauxwelli*, and *W. vidua*, is indicative of a conserved ancestral pattern in various bird species, as exemplified by the putative ancestral karyotype of

Passeriformes. This suggests that there is strong evolutionary conservation of this chromosomal complement [5,8,44]. On the other hand, the diploid number of 82 chromosomes in *T. ruficapillus*, *T. doliatus*, and *P. leucoptera*, and 76 chromosomes in *D. mentalis*, can be attributed to chromosomal rearrangements, such as fissions and fusions, that occurred throughout the evolutionary history of these species, leading to the observed variation in diploid number [6,7].

Morphological differences in the macrochromosomes are striking among the analyzed species. In *T. caerulescens*, acrocentric macrochromosomes predominate in the first seven pairs, whereas *T. ruficapillus* predominantly exhibits telocentric chromosomes, except for pair 2, which is acrocentric. These variations suggest that pericentric inversion events may have contributed to chromosomal evolution within the family. As for the sex chromosomes, *T. caerulescens* presents a metacentric W chromosome and an acrocentric Z chromosome, whereas *T. ruficapillus* displays both the W and Z chromosomes with telocentric morphology.

The study by Ledesma et al. [7] employed the nomenclature proposed by Levan et al. [45], which classifies chromosomes as metacentric, submetacentric, acrocentric, subtelocentric, and telocentric. To ensure consistency with other studies, the revised classification by Guerra [43], which excludes the subtelocentric category, was adopted. The morphology of chromosomes in Thamnophilidae species analyzed in other studies reveals considerable structural variation. In *W. vidua* ($2n=80$), acrocentric macrochromosomes predominate in pairs 1–6, 8, and 10, whereas pairs 7 and 9 exhibit metacentric morphology. The Z chromosome is submetacentric [8]. In *D. mentalis* ($2n=76$), the first five pairs and the Z chromosome are acrocentric, while pairs 6 to 11 are telocentric. In *P. leucoptera* ($2n=82$), pairs 1, 3, 5, 7, and the sex chromosome pair are acrocentric, while the remaining pairs are telocentric [7]. In *T. doliatus* ($2n=82$), all macrochromosomes are telocentric, with no morphological variations [6]. These comparisons indicate that, in addition to differences in diploid numbers, chromosomal morphology varies widely within the family, suggesting diverse chromosomal evolution potentially driven by multiple rearrangement mechanisms. Another relevant aspect is the

absence of complete descriptions of the W chromosome in several *Thamnophilidae* species, such as *D. mentalis*, *T. doliatus*, and *W. vidua* [6–8]. This lack of information highlights the need for further studies, particularly on female individuals, to characterize the W chromosome and provide a better understanding of sex chromosome evolution within the family.

C-banding analysis revealed notable differences between *T. caerulescens* and *T. ruficapillus*, revealing distinct heterochromatin patterns that reflect significant variability within the genus. In *T. caerulescens*, constitutive heterochromatin is predominantly accumulated in the W chromosome, microchromosomes, and centromeric regions of some macrochromosomes. In contrast, *T. ruficapillus* exhibits not only these same patterns but also constitutive heterochromatin in interstitial regions of the first seven pairs, which sets it apart from other species in the genus.

The pattern observed in *T. caerulescens* is commonly observed in Aves and among Passeriformes, in both suboscines and oscines. However, the W chromosome of both *Thamnophilus* species contains a relatively reduced amount of constitutive heterochromatin, confined to a region slightly larger than the centromere. This differs from observations in other Passeriform families, including Furnariidae, Tyrannidae, Hirundinidae, Mimidae, and Thraupidae, as well as in orders like Cuculiformes, Caprimulgiformes, Gruiformes, Charadriiformes, Procellariiformes, Trogoniformes, and Coraciiformes, where the W chromosome is almost entirely heterochromatic [44,46–57].

In *T. ruficapillus*, we observed a unique pattern of interstitial markings among Passeriformes, a phenomenon rarely described within the class Aves. In the study by Nanda et al. [35], C-banding was performed on several species from different orders, yet only a few displayed interstitial markings, which were limited to a small number of chromosome pairs. An exception was observed in the species *Struthio camelus*, belonging to the order Struthioniformes, which displayed interstitial markings on seven chromosome pairs, a pattern similar to that of *T. ruficapillus*, highlighting a rare convergence in heterochromatin patterns between distantly related groups [35].

The predominant accumulation of heterochromatin in the sex chromosomes, microchromosomes, and centromeric regions of macrochromosomes appears to be a regular feature in the karyotypic evolution of birds, indicating a conserved trend in avian genomes. However, the results obtained suggest that the accumulation of constitutive heterochromatin plays an active role in karyotype evolution within the genus *Thamnophilus*.

18S rDNA sequences were identified on different numbers of chromosome pairs among the species. In *T. caerulescens*, these sequences are located on a single pair of microchromosomes, an ancestral state shared by most birds. In contrast, *T. ruficapillus* exhibits 18S rDNA sequences on two pairs of microchromosomes, likely reflects chromosomal rearrangements, such as duplication followed by translocation or fission, as this species has an additional chromosome pair ($2n=82$). The phylogenetically closest family to Thamnophilidae with data on the location of 18S rDNA sequences is Furnariidae, where the analyzed species display this sequence on a single pair of microchromosomes [56], except for those in the subfamily Dendrocolaptinae, where the sequences are located on the first chromosome pair [58–60]. However, variations are observed both in Passeriformes (Oscines and Suboscines) and in other orders, with locations ranging from 1 to 7 pairs, spanning both macro and microchromosomes [30].

The distinct distribution of 18S rDNA sequences in *T. caerulescens* and *T. ruficapillus* may be associated with the fragility of rDNA sites, which function as hotspots for chromosomal breaks [61]. The repetitive nature and high expression levels of these genes render these regions prone to rearrangements, such as duplications and translocations [62,63]. These rearrangements could explain the presence of the sequences on two pairs of microchromosomes in *T. ruficapillus*, in contrast to their localization on a single pair in *T. caerulescens*.

Telomeric sequence localization revealed unique patterns in the studied species, never before observed in Passeriformes. In both species, interstitial telomeric sequences (ITSs) were identified on the first seven chromosome pairs, in different regions. Besides the Thamnophilidae species, two other Passeriform families also exhibited ITSs, but in a smaller number of pairs: 1 and

2 in Turdidae and 5 in Fringillidae [35,36]. Other orders with the distribution of these sequences across multiple pairs include Struthioniformes (4–7 pairs) and Strigiformes (2–8 pairs) [35]. Conversely, some orders displayed ITSs in a smaller number of chromosome pairs, such as Galliformes (1–3 pairs), Psittaciformes (1–4 pairs), Anseriformes (1 pair), Columbiformes (3 pairs), Piciformes (3 pairs), and Falconiformes, with only one analyzed species showing ITS on 1 pair [21,29,35–38] (shown in Table 1).

In *T. ruficapillus*, there was a correspondence between ITSs and regions rich in constitutive heterochromatin, whereas in *T. caerulescens*, this correspondence was not observed. Among the species with ITSs, 10 showed markings in regions rich in constitutive heterochromatin, while 4 did not exhibit this correspondence [21,35,37,38] (shown in Table 1).

As demonstrated in the species analyzed in this study, different marking patterns can still be found, particularly in Neognathae, considering the group's great diversity and the limited studies that have identified telomeric sequences. To date, ITSs have been identified by FISH in just 23 bird species, across 9 orders (shown in Table 1). These results contrast with the hypothesis proposed by Nanda et al. [35], which suggests that telomeric sequences originating in Paleognathae due to chromosomal fusions in a common ancestor would have been gradually degenerated in Neognathae following the divergence of these groups.

Table 1. Species of birds with interstitial telomeric sequences (ITSs) detected by fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

Order	Specie	Corresponding C-Band	Nº of pairs with interstitial signals	References
Struthioniformes	<i>Dromaius novaehollandiae</i>	No	5 pairs (1, 2, and other 3 pairs)	Nanda 2002 [35]
	<i>Struthio camelus</i>	Yes	7 pairs (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8)	
Anseriformes	<i>Rhea americana</i>	No	4 pairs (1, 2, 3, 4)	
	<i>Anser anser</i>	-	1 pair (1)	
	<i>Cairina moschata</i>	-	1 pair (1)	
Galliformes	<i>Gallus gallus</i>	No	3 pairs (1, 2, 3)	
	<i>Coturnix coturnix</i>	Yes	2 pairs (3, 4)	
	<i>Phasianus colchicus</i>	-	1 pair (1)	
Columbiformes	<i>Streptopelia roseogrisea</i>	Yes	3 pairs (1, 2, W)	
	<i>Columba livia</i>	-	3 pair (3, and other 2 pairs)	
Strigiformes	<i>Strix nebulosa</i>	-	8 pairs (2, 3, 5, 6, 7)	Nanda 2002

			,8, 9, 10, 11)	[35]
	<i>Bubo bubo</i>	Yes	2 pairs (1, 4)	
	<i>Colaptes melanochloros</i>	Yes	3 pairs (1, 2, 3)	
Piciformes	<i>Colaptes campestris</i>	Yes	3 pairs (1, 2, 3)	de Oliveira 2017 [38]
	<i>Melanerpes candidus</i>	Yes	3 pairs (1, 2, 5)	
Falconiformes	<i>Falco columbarius</i>	-	1 pair (3)	Nishida 2008 [29]
	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Yes	4 pairs (not specified)	Nanda 2007 [21]
Psittaciformes	<i>Psittacus erithacus</i>	Yes	1 pair (2)	Seibold-Torres 2016 [37]
	<i>Turdus merula</i>	-	1 pair (5)	Nanda 2002 [35]
	<i>Turdus iliacus</i>	-	2 pairs (2, 4)	
Passeriformes	<i>Fringilla coelebs</i>	-	5 pairs (1, 2, 3, 5, 6)	Derjusheva 2004 [36]
	<i>Thamnophilus caerulescens</i>	No	7 pairs (1-7)	
	<i>Thamnophilus ruficapillus</i>	Yes	7 pairs (1-7)	Present study

-: not mentioned in the cited article

Both species studied in the present paper appear to have different evolutionary histories, since ITSs in *T. ruficapillus* correspond to constitutive heterochromatin rich regions but *T. caerulescens* doesn't. Given the diploid number found ($2n \geq 80$), the origin of ITSs by ancestral chromosomal fusion is unlikely, so some hypotheses can be put forward. In *T. ruficapillus*, ITSs are likely to be repetitive DNA sequences very similar to telomeric ones, since all markers corresponded to the pattern of constitutive heterochromatin and were classified as Het-ITSs. At the same time, it was observed that pericentric inversions occurred in chromosomes 1, 3-7, resulting in a telocentric morphology, so the Het-ITS could be remnants of telomeric sequences present in bibrachial chromosomes of a common ancestor [34,64]. On the other hand, the ITSs in *T. caerulescens* do not correspond in their entirety to regions rich in constitutive heterochromatin, which, in addition to the W chromosome and microchromosomes, are only found in the centromere of some macrochromosomes, indicating a distinct and complex evolutionary trajectory for this species.

The lack of correspondence between ITSs and constitutive heterochromatin-rich regions in *T. caerulescens* suggests that these sequences

might have originated through other mechanisms, possibly involving transposable elements (TEs). TEs play a fundamental role in genomic remodeling, acting as a substrate for the emergence of new repetitive sequences such as microsatellites, minisatellites and satellite DNA. Thus, due to their ability to move and insert into different regions of the genome, TEs could carry sequences similar to telomeric ones, potentially explaining the location of the ITSs observed in this species [64,65].

CR1 and AviRTE retrotransposons have been mapped in several avian species, influencing genome organization and evolution. The CR1 element has been mapped in Piciformes species and in *Gallus gallus* [66], while the AviRTE element has been mapped in *Trogon surrucura* [67]. The distribution of these retrotransposons, in addition to sex chromosomes, has been observed in both macrochromosomes and microchromosomes, in pericentromeric, interstitial and terminal regions, and is not restricted to regions of constitutive heterochromatin. Thus, the distribution of TEs in avian chromosomes, with no direct correlation to regions of constitutive heterochromatin, supports the hypothesis raised. However, although plausible, further studies are needed to confirm the relationship between TEs and ITSs, including a detailed analysis of the presence and type of TEs in the marked chromosomal regions to clarify whether other mechanisms may also be involved.

This study expands our knowledge of chromosome diversity and organization in *Thamnophilidae*, highlighting remarkable features in *T. caerulescens* and *T. ruficapillus*. Key findings include variations in the distribution of repetitive sequences such as ITSs, the presence of 18S rDNA sequences in different pairs of microchromosomes, and variability in constitutive heterochromatin patterns. The data obtained reveal a dynamic chromosomal evolution in the genus *Thamnophilus*, driven by events such as fissions and inversions that altered the diploid number and morphology of chromosomes. The differences observed between species suggest unique patterns of genomic reorganization in the family, in contrast to the predominant chromosomal conservation in other birds. These results highlight the importance of further research using advanced molecular techniques to gain a deeper understanding

of the interactions between repetitive sequences and the mechanisms that drive chromosomal evolution in birds.

Statements

Statement of Ethics

This study protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee on the use of animals, approval number (CEUA 019/2020, 024/2023) and Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO 61047-3, 33860-2 e 81564-1).

Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding Sources

This research was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Finance Code 001 (V.O.R. and V.T.); the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Grant Number 407285/2021-0 (A.D.V.G.); and the Programa de Apoio à Fixação de Jovens Doutores no Brasil – EDITAL FAPERGS/CNPq 07/2022 (A.D.V.G.).

Author Contributions

V.O.R., R.J.G. and A.V.G. contributed to the study conception and design. Methodology was performed by V.O.R. and L.O.M. Formal analysis, data curation and investigation were performed by V.O.R. Visualization was performed by V.O.R. The original draft was written by V.O.R. Writing-review and editing was performed by V.O.R., V.T., H.S.S., L.O.M., F.P.T., R.J.G. and A.V.G. Funding was obtained by R.J.G and A.V.G.

Data Availability Statement

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

References [Numerical]

- 1 Irestedt M, Fjeldså J, Nylander JA, Ericson PG. Phylogenetic relationships of typical antbirds (Thamnophilidae) and test of incongruence based on Bayes factors. *BMC Evol Biol.* 2004;4(1):23.
- 2 Irestedt M, Fjeldså J, Johansson US, Ericson PGP. Systematic relationships and biogeography of the tracheophone suboscines (Aves: Passeriformes). *Mol Phylogenet Evol.* 2002 Jun;23(3):499–512.
- 3 Winkler DW, Billerman SM, Lovette IJ. Typical Antbirds (Thamnophilidae). In: Billerman SM, Keeney BK, Rodewald PG, Schulenberg TS, editors. *Birds of the World*. Cornell Lab of Ornithology; 2020. DOI: 10.2173/bow.thamno3.01
- 4 Degrandi TM, Barcellos SA, Costa AL, Garnero ADV, Hass I, Gunski RJ. Introducing the Bird Chromosome Database: An Overview of Cytogenetic Studies in Birds. *Cytogenet Genome Res.* 2020;160(4):199–205.
- 5 De Lucca EJ. Karyotypes of fourteen species of birds of the orders: Cuculiformes, Galliformes, Passeriformes and Tinamiformes. *Brazilian journal of medical and biological research.* 1974;7:253–63.
- 6 De Lucca EJ, Chamma L. Estudo do complemento cromossômico de 11 espécies de aves das ordens Columbiformes, Passeriformes e Tinamiformes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 1977;10(2):97–105.
- 7 Ledesma MA, Garnero A V., Gunski RJ. Análise do cariótipo de duas espécies da família Formicariidae (Aves, Passeriformes). *Ararajuba.* 2002;10:15–9.
- 8 Ribas TFA, Pieczarka JC, Griffin DK, Kiazim LG, Nagamachi CY, O’Brien PCM, 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 Ecol Evol.* 2021 Mar;21(1):34.
- 9 Gregory TR, Andrews CB, McGuire JA, Witt CC. The smallest avian genomes are found in hummingbirds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.* 2009 Nov;276(1674):3753–7.
- 10 Scanes CG. *Sturkie’s avian physiology*. Amsterdam: Elsevier Science; 2014.
- 11 Kapusta A, Suh A. Evolution of bird genomes—a transposon’s-eye view. *Ann N Y Acad Sci.* 2017 Feb;1389(1):164–85.
- 12 Burt DW. Origin and evolution of avian microchromosomes. *Cytogenet Genome Res.* 2002;96(1–4):97–112.
- 13 Gregory TR. *The evolution of the genome*. San Diego CA USA: Elsevier Academic Press; 2005.

- 14 Wessler SR. Transposable elements and the evolution of eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(47):17600–1.
- 15 Lynch M, Walsh B. *The origins of genome architecture*. Sunderland, MA: Sinauer associates; 2007.
- 16 Ellegren H. Evolutionary stasis: the stable chromosomes of birds. *Trends Ecol Evol*. 2010 May;25(5):283–91.
- 17 Braun EL, Cracraft J, Houde P. *Avian Genomics in Ecology and Evolution*. Cham: Springer International Publishing; 2019. DOI: 10.1007/978-3-030-16477-5
- 18 Voss SR, Kump DK, Putta S, Pauly N, Reynolds A, Henry RJ, et al. Origin of amphibian and avian chromosomes by fission, fusion, and retention of ancestral chromosomes. *Genome Res*. 2011 Aug;21(8):1306–12.
- 19 Uno Y, Nishida C, Tarui H, Ishishita S, Takagi C, Nishimura O, et al. Inference of the Protokaryotypes of Amniotes and Tetrapods and the Evolutionary Processes of Microchromosomes from Comparative Gene Mapping. *PLoS One*. 2012 Dec;7(12):e53027.
- 20 de Oliveira EHC, Habermann FA, Lacerda O, Sbalqueiro IJ, Wienberg J, Müller S. Chromosome reshuffling in birds of prey: the karyotype of the world's largest eagle (Harpy eagle, *Harpia harpyja*) compared to that of the chicken (*Gallus gallus*). *Chromosoma*. 2005 Nov;114(5):338–43.
- 21 Nanda I, Karl E, Griffin DK, Scharl M, Schmid M. Chromosome repatterning in three representative parrots (Psittaciformes) inferred from comparative chromosome painting. *Cytogenet Genome Res*. 2007;117(1–4):43–53.
- 22 Damas J, O'Connor R, Farré M, Lenis VPE, Martell HJ, Mandawala A, et al. Upgrading short-read animal genome assemblies to chromosome level using comparative genomics and a universal probe set. *Genome Res*. 2017 May;27(5):875–84.
- 23 Graw J. *Epigenetik*. Genetik; 2015.
- 24 Daniels LM, Delany ME. Molecular and cytogenetic organization of the 5S ribosomal DNA array in chicken (*Gallus gallus*). *Chromosome Research*. 2003;11(4):305–17.
- 25 Dyomin AG, Koshel EI, Kiselev AM, Saifitdinova AF, Galkina SA, Fukagawa T, et al. Chicken rRNA Gene Cluster Structure. *PLoS One*. 2016 Jun;11(6):e0157464.

- 26 Warren WC, Hillier LW, Tomlinson C, Minx P, Kremitzki M, Graves T, et al. A New Chicken Genome Assembly Provides Insight into Avian Genome Structure. *G3 Genes|Genomes|Genetics*. 2017 Jan;7(1):109–17.
- 27 O'Connor C. Fluorescence in situ hybridization (FISH). 1st ed. Nature Education; 2008.
- 28 Zurita F, Sánchez A, Burgos M, Jiménez R, de la Guardia RD. Interchromosomal, intercellular and interindividual variability of NORs studied with silver staining and in situ hybridization. *Heredity (Edinb)*. 1997 Mar;78(3):229–34.
- 29 Nishida C, Ishijima J, Kosaka A, Tanabe H, Habermann FA, Griffin DK, et al. Characterization of chromosome structures of Falconinae (Falconidae, Falconiformes, Aves) by chromosome painting and delineation of chromosome rearrangements during their differentiation. *Chromosome Research*. 2008 Mar;16(1):171–81.
- 30 Degrandi TM, Gunski RJ, Garner A del V, Oliveira EHC de, Kretschmer R, Souza MS de, et al. The distribution of 45S rDNA sites in bird chromosomes suggests multiple evolutionary histories. *Genet Mol Biol*. 2020;43(2). DOI: 10.1590/1678-4685-gmb-2018-0331
- 31 Tagliarini MM, Pieczarka JC, Nagamachi CY, Rissino J, de Oliveira EHC. Chromosomal analysis in Cathartidae: distribution of heterochromatic blocks and rDNA, and phylogenetic considerations. *Genetica*. 2009 Apr;135(3):299–304.
- 32 Billaud T, Brun C, Ancelin K, Koering CE, Laroche T, Gilson E. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet*. 1997 Oct;17(2):236–9.
- 33 Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med*. 2006 Oct;12(10):1133–8.
- 34 Ruiz-Herrera A, Nergadze SG, Santagostino M, Giulotto E. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenet Genome Res*. 2008;122(3–4):219–28.
- 35 Nanda I, Schrama D, Feichtinger W, Haaf T, Scharl M, Schmid M. Distribution of telomeric (TTAGGG)_n sequences in avian chromosomes. *Chromosoma*. 2002 Nov;111(4):215–27.
- 36 Derjusheva S, Kurganova A, Habermann F, Gaginskaya E. High chromosome conservation detected by comparative chromosome painting in chicken, pigeon and passerine birds. *Chromosome Research*. 2004;12(7):715–23.

- 37 Seibold-Torres C, Owens E, Chowdhary R, Ferguson-Smith MA, Tizard I, Raudsepp T. Comparative Cytogenetics of the Congo African Grey Parrot (*Psittacus erithacus*). *Cytogenet Genome Res.* 2015;147(2–3):144–53.
- 38 de Oliveira TD, Kretschmer R, Bertocchi NA, Degrandi TM, de Oliveira EHC, Cioffi M de B, et al. Genomic Organization of Repetitive DNA in Woodpeckers (Aves, Piciformes): Implications for Karyotype and ZW Sex Chromosome Differentiation. *PLoS One.* 2017 Jan;12(1):e0169987.
- 39 Garnero AD V., Gunski RJ. Comparative analysis of the karyotypes of *Nothura maculosa* and *Rynchotus rufescens* (Aves: Tinamidae). A case of chromosomal polymorphism. *Nucleus-Calcutta-International Journal of Cytology.* 2000;43(3):64–70.
- 40 Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res.* 1972 Nov;75(1):304–6.
- 41 Lui R, Blanco D, Moreira-Filho O, Margarido V. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry.* 2012 Oct;87(7):433–8.
- 42 Kretschmer R, dos Santos M da S, de Oliveira Furo I, de Oliveira EHC, de Bello Cioffi M. FISH—in Birds. *Cytogenetics and Molecular Cytogenetics.* Boca Raton: CRC Press; 2022; pp 263–79.
- 43 Marcelo Dos Santos Guerra. REVIEWING THE CHROMOSOME NOMENCLATURE OF LEVAN et al. *Brazilian Journal of genetics.* 1986;9:741–3.
- 44 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.* 2018;153(4):205–12.
- 45 LEVAN A, FREDGA K, SANDBERG AA. NOMENCLATURE FOR CENTROMERIC POSITION ON CHROMOSOMES. *Hereditas.* 1964;52:201–20.
- 46 ANALÍA DEL V. GARNERO, MARCELA BOCCELLI, JEAN C.P. OLIVEIRA, MARIO A. LEDESMA, DIEGO MONTALTI, NÉSTOR CORIA, et al. CHROMOSOMAL CHARACTERIZATION OF FOUR ANTARCTIC PROCELLARIIFORMES. *Mar Ornithol.* 2013 Mar;41:63–8.
- 47 Kretschmer R, Lima VL, Degrandi TM, Vinadé L, Schünemann AL, Garnero ADV, et al. NOR-bearing as a plesiomorphic characteristic in *Mimus saturninus* (Passeriformes Mimidae). *Journal of Biotechnology and Biodiversity.* 2014 Apr;5(2):140–7.

- 48 Degrandi TM, del Valle Garnero A, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA, Kretschmer R, de Oliveira EHC, et al. Chromosome Painting in Trogon s. *surrucura* (Aves, Trogoniformes) Reveals a Karyotype Derived by Chromosomal Fissions, Fusions, and Inversions. *Cytogenet Genome Res.* 2017;151(4):208–15.
- 49 Degrandi TM, de Oliveira JCP, de Araújo Soares A, Ledesma MA, Hass I, Garnero A del V, et al. Karyotype description and comparative analysis in Ringed Kingfisher and Green Kingfisher (Coraciiformes, Alcedinidae). *Comp Cytogenet.* 2018 May;12(2):163–70.
- 50 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.
- 51 Souza MS de, Barcellos SA, Costa AL, Kretschmer R, Garnero 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 Mar;42(1):62–7.
- 52 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.
- 53 Kretschmer R, Gunski RJ, Garnero A del V, de Freitas TRO, Toma GA, Cioffi M de B, et al. Chromosomal Analysis in *Crotophaga ani* (Aves, Cuculiformes) Reveals Extensive Genomic Reorganization and an Unusual Z-Autosome Robertsonian Translocation. *Cells.* 2020 Dec;10(1):4.
- 54 de Souza MS, Kretschmer R, Barcellos SA, Costa AL, Cioffi M de B, de Oliveira EHC, et al. Repeat Sequence Mapping Shows Different W Chromosome Evolutionary Pathways in Two Caprimulgiformes Families. *Birds.* 2020 Dec;1(1):19–34.
- 55 Kretschmer R, Rodrigues BS, Barcellos SA, Costa AL, Cioffi M de B, Garnero A del V, et al. Karyotype Evolution and Genomic Organization of Repetitive DNAs in the Saffron Finch, *Sicalis flaveola* (Passeriformes, Aves). *Animals.* 2021 May;11(5):1456.
- 56 Tura V, Kretschmer R, Sassi F de MC, de Moraes RLR, Barcellos SA, de Rosso VO, et al. Chromosomal Evolution of Suboscines: Karyotype Diversity and Evolutionary Trends in Ovenbirds (Passeriformes, Furnariidae). *Cytogenet Genome Res.* 2022;162(11–12):644–56.

- 57 Saraiva DM, de Souza MS, Tura V, de Rosso VO, Zefa E, Garnero A del V, et al. Comparative Cytogenetics in Tyrannidae (Aves, Passeriformes): High Genetic Diversity despite Conserved Karyotype Organization. *Cytogenet Genome Res.* 2024;164(1):43–51.
- 58 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 Research.* 2007 Oct;15(6):721–34.
- 59 Barbosa M de O, Silva RR da, Correia VC de S, Santos LP dos, Garnero A del V, Gunski RJ. Nucleolar organizer regions in *Sittasomus griseicapillus* and *Lepidocolaptes angustirostris* (Aves, Dendrocolaptidae): evidence of a chromosome inversion. *Genet Mol Biol.* 2013;36(1):070–3.
- 60 Ribas TFA, Nagamachi CY, Aleixo A, Pinheiro MLS, O’Brien PCM, Ferguson-Smith MA, et al. Chromosome painting in *Glyphorhynchus spirurus* (Vieillot, 1819) detects a new fission in Passeriformes. *PLoS One.* 2018 Aug;13(8):e0202040.
- 61 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 Dec;11(1):124.
- 62 Datson PM, Murray BG. Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? *Chromosome Research.* 2006 Dec;14(8):845–57.
- 63 Huang J, Ma L, Yang F, Fei S, 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 May;3(5):e2167.
- 64 Vicari MR, Bruschi DP, Cabral-de-Mello DC, Nogaroto V. Telomere organization and the interstitial telomeric sites involvement in insects and vertebrates chromosome evolution. *Genet Mol Biol.* 2022;45(3 suppl 1). DOI: 10.1590/1678-4685-gmb-2022-0071
- 65 Zattera ML, Bruschi DP. Transposable Elements as a Source of Novel Repetitive DNA in the Eukaryote Genome. *Cells.* 2022 Oct;11(21):3373.
- 66 Bertocchi NA, de Oliveira TD, del Valle Garnero A, Coan RLB, Gunski RJ, Martins C, et al. Distribution of CR1-like transposable element in woodpeckers (Aves Piciformes): Z sex chromosomes can act as a refuge for transposable elements. *Chromosome Research.* 2018 Dec;26(4):333–43.
- 67 Farias de Farias N, Gunski RJ, Del Valle Garnero A, Cañedo AD, Herculano Correa de Oliveira E, Oliveira Silva FA, et al. Chromosome mapping of

retrotransposon AviRTE in a neotropical bird species: *Trogon surrucura* (Trogoniformes; Trogonidae). Genome. 2024 Sep;67(9):307–15.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos neste estudo sobre *T. caerulescens* e *T. ruficapillus* contribuem para o avanço da citogenética de aves e da família *Thamnophilidae*, um grupo com pouca representação. Até o momento, apenas cinco espécies dessa família haviam sido analisadas e, dessas, apenas uma foi estudada nos últimos 20 anos com técnicas modernas de citogenética molecular.

Nesse contexto, a localização das sequências repetitivas de 18S rDNA e teloméricas (TTAGGG)₅, identificadas por FISH, representa a primeira descrição detalhada para *Thamnophilidae*. Esses resultados não apenas ampliam o conhecimento sobre a organização do genoma em *Passeriformes*, mas também sugerem variações no padrão de distribuição dessas sequências dentro da família.

A partir da análise dos cariótipos de *T. caerulescens* ($2n = 80$) e *T. ruficapillus* ($2n = 82$), observamos diferenças no número diploide e na morfologia dos cromossomos, além da variabilidade nos padrões de heterocromatina constitutiva. *T. ruficapillus* apresentou padrões inéditos para a ordem *Passeriformes*, com blocos de heterocromatina constitutiva em regiões intersticiais dos seus sete primeiros pares cromossômicos. Esses padrões sugerem uma evolução cromossômica impulsionada por eventos como fissões e inversões, que alteraram tanto o número diploide quanto a morfologia dos cromossomos.

Por meio do FISH, identificamos variações na distribuição das sequências repetitivas, como a presença de sequências de 18S rDNA em diferentes pares de microcromossomos. *T. caerulescens* apresentou essa sequência em um par de microcromossomos, representando um padrão conservado, enquanto *T. ruficapillus* apresentou essa sequência em dois pares de microcromossomos, o que pode indicar a ocorrência de rearranjos cromossômicos, como duplicação seguida de translocação ou fissão, uma vez que essa espécie possui um par cromossômico adicional ($2n = 82$).

Em relação à distribuição das sequências teloméricas, ambas as espécies apresentaram padrões inéditos para a ordem *Passeriformes*. Além dos

telômeros, essas sequências foram identificadas em regiões intersticiais dos sete primeiros pares cromossômicos, porém em regiões distintas entre as espécies. Isso sugere o envolvimento de diferentes mecanismos na origem dessas marcações. Em *T. ruficapillus*, os padrões de heterocromatina constitutiva e de sequências teloméricas correspondem entre si, diferentemente de *T. caerulescens*, que apresenta padrões distintos para essas marcações.

Esses resultados evidenciam padrões únicos de reorganização genômica, indicando uma evolução cromossômica dinâmica na família *Thamnophilidae*, em contraste com o padrão mais conservado observado em outras aves.

Por fim, os dados reforçam a importância de pesquisas adicionais utilizando técnicas moleculares avançadas para uma compreensão mais aprofundada das interações entre sequências repetitivas e os mecanismos que impulsionam a evolução cromossômica em aves.

6. REFERÊNCIAS

Barcellos SA, Kretschmer R, de Souza MS, Costa AL, Degrandi TM, dos Santos MS, de Oliveira EHC, Cioffi MB, Gunski RJ, Garnero ADV. 2019. Karyotype Evolution and Distinct Evolutionary History of the W Chromosomes in Swallows (Aves, Passeriformes). *Cytogenet Genome Res.* 158(2):98–105. doi:10.1159/000500621.

Barrowclough GF, Cracraft J, Klicka J, Zink RM. 2016. How Many Kinds of Birds Are There and Why Does It Matter? *PLoS One.* 11(11):e0166307. doi:10.1371/journal.pone.0166307.

Belterman RHR, De Boer LEM. 1984. A karyological study of 55 species of birds, including karyotypes of 39 species new to cytology. *Genetica.* 65(1):39–82. doi:10.1007/BF00056765.

Bilaud T, Brun C, Ancelin K, Koering CE, Laroche T, Gilson E. 1997. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet.* 17(2):236–239. doi:10.1038/ng1097-236.

Billerman SM, Keeney BK, Rodewald PG, Schulenberg T. S. 2022. *Birds of the World.* Ithaca, NY, USA: Cornell Laboratory of Ornithology.

BirdLife International . 2024 Jan 31. Country profile: Brazil.

Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. 2006. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med.* 12(10):1133–1138. doi:10.1038/nm1006-1133.

Braun EL, Cracraft J, Houde P. 2019. *Avian Genomics in Ecology and Evolution.* Kraus RHS, editor. Cham: Springer International Publishing.

Burt DW. 2002. Origin and evolution of avian microchromosomes. *Cytogenet Genome Res.* 96(1–4):97–112. doi:10.1159/000063018.

Correia VCS, Garnero A V., Santos LP, Silva RR, Barbosa M, Bonifacio HL, Gunski RJ. 2009. Alta similaridade cariotípica na família Emberezidae (Aves: Passeriformes). *Bioscience Journal.* 25:99–111.

Damas J, O'Connor R, Farré M, Lenis VPE, Martell HJ, Mandawala A, Fowler K, Joseph S, Swain MT, Griffin DK, et al. 2017. Upgrading short-read

animal genome assemblies to chromosome level using comparative genomics and a universal probe set. *Genome Res.* 27(5):875–884. doi:10.1101/gr.213660.116.

Daniels LM, Delany ME. 2003. Molecular and cytogenetic organization of the 5S ribosomal DNA array in chicken (*Gallus gallus*). *Chromosome Research.* 11(4):305–317. doi:10.1023/A:1024008522122.

Degrandi Tiago M., Barcellos SA, Costa AL, Garnero ADV, Hass I, Gunski RJ. 2020. Introducing the Bird Chromosome Database: An Overview of Cytogenetic Studies in Birds. *Cytogenet Genome Res.* 160(4):199–205. doi:10.1159/000507768.

Degrandi Tiago Marafiga, Gunski RJ, Garnero A del V, Oliveira EHC de, Kretschmer R, Souza MS de, Barcellos SA, Hass I. 2020. The distribution of 45S rDNA sites in bird chromosomes suggests multiple evolutionary histories. *Genet Mol Biol.* 43(2). doi:10.1590/1678-4685-gmb-2018-0331.

Degrandi TM, de Oliveira JCP, de Araújo Soares A, Ledesma MA, Hass I, Garnero A del V, Gunski RJ. 2018. Karyotype description and comparative analysis in Ringed Kingfisher and Green Kingfisher (Coraciiformes, Alcedinidae). *Comp Cytogenet.* 12(2):163–170. doi:10.3897/compcytogen.v12i2.23883.

Degrandi TM, del Valle Garnero A, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA, Kretschmer R, de Oliveira EHC, Gunski RJ. 2017. Chromosome Painting in *Trogon s. surrucura* (Aves, Trogoniformes) Reveals a Karyotype Derived by Chromosomal Fissions, Fusions, and Inversions. *Cytogenet Genome Res.* 151(4):208–215. doi:10.1159/000471782.

Dyomin AG, Koshel EI, Kiselev AM, Saifitdinova AF, Galkina SA, Fukagawa T, Kostareva AA, Gaginskaya ER. 2016. Chicken rRNA Gene Cluster Structure. *PLoS One.* 11(6):e0157464. doi:10.1371/journal.pone.0157464.

Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet.* 5(6):435–445. doi:10.1038/nrg1348.

Ellegren H. 2010. Evolutionary stasis: the stable chromosomes of birds. *Trends Ecol Evol.* 25(5):283–291. doi:10.1016/j.tree.2009.12.004.

Favretto MA. 2023. Aves do Brasil, vol. II: Passeriformes. 1st ed. Florianópolis: Clube de Autores.

Ferguson-Smith MA, Yang F, Rens W, O'Brien PCM. 2005. The impact of chromosome sorting and painting on the comparative analysis of primate genomes. *Cytogenet Genome Res.* 108(1–3):112–121. doi:10.1159/000080809.

Franz I, Agne CE, Bencke GA, Bugoni L, Dias RA. 2018. Four decades after Belton: a review of records and evidences on the avifauna of Rio Grande do Sul, Brazil. *Iheringia Ser Zool.* 108(0). doi:10.1590/1678-4766e2018005.

Gemayel R, Vincens MD, Legendre M, Verstrepen KJ. 2010. Variable Tandem Repeats Accelerate Evolution of Coding and Regulatory Sequences. *Annu Rev Genet.* 44(1):445–477. doi:10.1146/annurev-genet-072610-155046.

Graw J. 2015. Epigenetik. *Genetik.*

Gregory TR. 2005. The evolution of the genome. San Diego CA USA: Elsevier Academic Press.

Gregory TR, Andrews CB, McGuire JA, Witt CC. 2009. The smallest avian genomes are found in hummingbirds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.* 276(1674):3753–3757. doi:10.1098/rspb.2009.1004.

Guerra M. S. 1988. Introdução à citogenética geral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Gunski RJ, Cabanne GS, Ledesma MA, Garnero A V. 2000. Análisis cariotípico de siete especies de Tiránidos (Tyrannidae). *Hornero.* 15:103–109.

Gunski RJ, Kretschmer R, Santos de Souza M, de Oliveira Furo I, Barcellos SA, Costa AL, Cioffi MB, de Oliveira EHC, del Valle Garnero A. 2019. Evolution of Bird Sex Chromosomes Narrated by Repetitive Sequences: Unusual W Chromosome Enlargement in *Gallinula melanops* (Aves: Gruiformes: Rallidae). *Cytogenet Genome Res.* 158(3):152–159. doi:10.1159/000501381.

Irestedt M, Fjeldså J, Johansson US, Ericson PGP. 2002. Systematic relationships and biogeography of the tracheophone suboscines (Aves: Passeriformes). *Mol Phylogenet Evol.* 23(3):499–512. doi:10.1016/S1055-7903(02)00034-9.

Irestedt M, Fjeldså J, Nylander JA, Ericson PG. 2004. Phylogenetic relationships of typical antbirds (Thamnophilidae) and test of incongruence based on Bayes factors. *BMC Evol Biol.* 4(1):23. doi:10.1186/1471-2148-4-23.

Katzourakis A, Gifford RJ. 2010. Endogenous Viral Elements in Animal Genomes. *PLoS Genet.* 6(11):e1001191. doi:10.1371/journal.pgen.1001191.

Kazazian HH. 2004. Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution. *Science (1979).* 303(5664):1626–1632. doi:10.1126/science.1089670.

Kretschmer R, Furo IDO, Cioffi MDB, Gunski RJ, Garnero ADV, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA, de Freitas TRO, de Oliveira EHC. 2020. Extensive chromosomal fissions and repetitive DNA accumulation shaped the atypical karyotypes of two Ramphastidae (Aves: Piciformes) species. *Biological Journal of the Linnean Society.* 130(4):839–849. doi:10.1093/biolinnean/blaa086.

Kretschmer R, Gunski RJ, Garnero A del V, de Freitas TRO, Toma GA, Cioffi M de B, Oliveira EHC de, O'Connor RE, Griffin DK. 2020. Chromosomal Analysis in *Crotophaga ani* (Aves, Cuculiformes) Reveals Extensive Genomic Reorganization and an Unusual Z-Autosome Robertsonian Translocation. *Cells.* 10(1):4. doi:10.3390/cells10010004.

Kretschmer R, de Oliveira TD, de Oliveira Furo I, Oliveira Silva FA, Gunski RJ, del Valle Garnero A, de Bello Cioffi M, de Oliveira EHC, de Freitas TRO. 2018. Repetitive DNAs and shrink genomes: A chromosomal analysis in nine Columbidae species (Aves, Columbiformes). *Genet Mol Biol.* 41(1):98–106. doi:10.1590/1678-4685-gmb-2017-0048.

Kretschmer R, Rodrigues BS, Barcellos SA, Costa AL, Cioffi M de B, Garnero A del V, Gunski RJ, de Oliveira EHC, Griffin DK. 2021. Karyotype Evolution and Genomic Organization of Repetitive DNAs in the Saffron Finch, *Sicalis flaveola* (Passeriformes, Aves). *Animals.* 11(5):1456. doi:10.3390/ani11051456.

Ledesma MA, Garnero A V., Gunski RJ. 2002. Análise do cariótipo de duas espécies da família Formicariidae (Aves, Passeriformes). *Ararajuba.* 10:15–19.

Li Y, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol.* 11(12):2453–2465. doi:10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x.

De Lucca EJ. 1974. Karyotypes of fourteen species of birds of the orders: Cuculiformes, Galliformes, Passeriformes and Tinamiformes. *Brazilian journal of medical and biological research.* 7:253–263.

De Lucca EJ, Chamma L. 1977. Estudo do complemento cromossômico de 11 espécies de aves das ordens Columbiformes, Passeriformes e Tinamiformes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 10(2):97–105.

Lynch M, Walsh B. 2007. *The origins of genome architecture.* Sunderland, MA: Sinauer associates.

McQueen HA, Siriaco G, Bird AP. 1998. Chicken Microchromosomes Are Hyperacetylated, Early Replicating, and Gene Rich. *Genome Res.* 8(6):621–630. doi:10.1101/gr.8.6.621.

Nanda I, Karl E, Griffin DK, Scharl M, Schmid M. 2007. Chromosome repatterning in three representative parrots (Psittaciformes) inferred from comparative chromosome painting. *Cytogenet Genome Res.* 117(1–4):43–53. doi:10.1159/000103164.

Nanda I, Schrama D, Feichtinger W, Haaf T, Scharl M, Schmid M. 2002. Distribution of telomeric (TTAGGG)_n sequences in avian chromosomes. *Chromosoma.* 111(4):215–227. doi:10.1007/s00412-002-0206-4.

Nishida C, Ishijima J, Kosaka A, Tanabe H, Habermann FA, Griffin DK, Matsuda Y. 2008. Characterization of chromosome structures of Falconinae (Falconidae, Falconiformes, Aves) by chromosome painting and delineation of chromosome rearrangements during their differentiation. *Chromosome Research.* 16(1):171–181. doi:10.1007/s10577-007-1210-6.

O'Connor C. 2008. *Fluorescence in situ hybridization (FISH).* 1st ed. Nature Education.

O'Connor RE, Kiazim L, Skinner B, Fonseka G, Joseph S, Jennings R, Larkin DM, Griffin DK. 2019. Patterns of microchromosome organization remain highly conserved throughout avian evolution. *Chromosoma*. 128(1):21–29. doi:10.1007/s00412-018-0685-6.

de Oliveira EHC, Habermann FA, Lacerda O, Sbalqueiro IJ, Wienberg J, Müller S. 2005. Chromosome reshuffling in birds of prey: the karyotype of the world's largest eagle (Harpy eagle, *Harpia harpyja*) compared to that of the chicken (*Gallus gallus*). *Chromosoma*. 114(5):338–343. doi:10.1007/s00412-005-0009-5.

De Oliveira EHC, Tagliarini MM, Nagamachi CY, Pieczarka JC. 2006. Genomic comparison in birds using chromosome-specific probes. *Revista Brasileira de Ornitologia*. 14(1):47–52.

de Oliveira Furo I, Kretschmer R, dos Santos MS, de Lima Carvalho CA, Gunski RJ, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA, Cioffi MB, de Oliveira EHC. 2017. Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Myiopsitta monachus* and *Amazona aestiva* (Psittaciformes, Psittacidae) with Emphasis on the Sex Chromosomes. *Cytogenet Genome Res*. 151(3):151–160. doi:10.1159/000464458.

de Oliveira TD, Kretschmer R, Bertocchi NA, Degrandi TM, de Oliveira EHC, Cioffi M de B, Garnero A del V, Gunski RJ. 2017. Genomic Organization of Repetitive DNA in Woodpeckers (Aves, Piciformes): Implications for Karyotype and ZW Sex Chromosome Differentiation. *PLoS One*. 12(1):e0169987. doi:10.1371/journal.pone.0169987.

Pacheco JF, Silveira LF, Aleixo A, Agne CE, Bencke GA, Bravo GA, Brito GRR, Cohn-Haft M, Maurício GN, Naka LN, et al. 2021. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee—second edition. *Ornithology Research*. 29(2):94–105. doi:10.1007/s43388-021-00058-x.

Perfecto I, Rice RA, Greenberg R, van der Voort ME. 1996. Shade Coffee: A Disappearing Refuge for Biodiversity. *Bioscience*. 46(8):598–608. doi:10.2307/1312989.

Pillar VDP, Müller SC, Castilhos ZMDS, Jacques AVA. 2009. Campos Sulinos-conservação e uso sustentável da biodiversidade. 1st ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente.

Pough FH, Janis CM, Heiser JB. 2008. A vida dos vertebrados. 4a edição. São Paulo: Editora Atheneu.

Ribas TFA, Pieczarka JC, Griffin DK, Kiazim LG, Nagamachi CY, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA, Yang F, Aleixo A, O'Connor RE. 2021. Analysis of multiple chromosomal rearrangements in the genome of *Willisornis vidua* using BAC-FISH and chromosome painting on a supposed conserved karyotype. *BMC Ecol Evol.* 21(1):34. doi:10.1186/s12862-021-01768-y.

Rice RA, Greenberg R. 2000. Cacao Cultivation and the Conservation of Biological Diversity. *AMBIO: A Journal of the Human Environment.* 29(3):167–173. doi:10.1579/0044-7447-29.3.167.

Scanes CG. 2014. *Sturkie's avian physiology.* Amsterdam: Elsevier Science.

Selvatti AP, Gonzaga LP, Russo CA de M. 2015. A Paleogene origin for crown passerines and the diversification of the Oscines in the New World. *Mol Phylogenet Evol.* 88:1–15. doi:10.1016/j.ympev.2015.03.018.

Shetty S, Griffin DK, Graves JAM. 1999. Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. *Chromosome Research.* 7(4):289–295. doi:10.1023/A:1009278914829.

de Souza MS, Kretschmer R, Barcellos SA, Costa AL, Cioffi M de B, de Oliveira EHC, Garnero ADV, Gunski RJ. 2020. Repeat Sequence Mapping Shows Different W Chromosome Evolutionary Pathways in Two Caprimulgiformes Families. *Birds.* 1(1):19–34. doi:10.3390/birds1010004.

Stiglec R, Ezaz T, Graves JAM. 2007. A new look at the evolution of avian sex chromosomes. *Cytogenet Genome Res.* 117(1–4):103–109. doi:10.1159/000103170.

Tagliarini MM, Pieczarka JC, Nagamachi CY, Rissino J, de Oliveira EHC. 2009. Chromosomal analysis in Cathartidae: distribution of heterochromatic

blocks and rDNA, and phylogenetic considerations. *Genetica*. 135(3):299–304. doi:10.1007/s10709-008-9278-2.

Tura V, Kretschmer R, Sassi F de MC, de Moraes RLR, Barcellos SA, de Rosso VO, de Souza MS, Cioffi M de B, Gunski RJ, Garnerio A del V. 2022. Chromosomal Evolution of Suboscines: Karyotype Diversity and Evolutionary Trends in Ovenbirds (Passeriformes, Furnariidae). *Cytogenet Genome Res*. 162(11–12):644–656. doi:10.1159/000530428.

Uno Y, Nishida C, Tarui H, Ishishita S, Takagi C, Nishimura O, Ishijima J, Ota H, Kosaka A, Matsubara K, et al. 2012. Inference of the Protokaryotypes of Amniotes and Tetrapods and the Evolutionary Processes of Microchromosomes from Comparative Gene Mapping. *PLoS One*. 7(12):e53027. doi:10.1371/journal.pone.0053027.

Voss SR, Kump DK, Putta S, Pauly N, Reynolds A, Henry RJ, Basa S, Walker JA, Smith JJ. 2011. Origin of amphibian and avian chromosomes by fission, fusion, and retention of ancestral chromosomes. *Genome Res*. 21(8):1306–1312. doi:10.1101/gr.116491.110.

Wang Z-J, Chen G-J, Zhang G-J, Zhou Q. 2021. Dynamic evolution of transposable elements, demographic history, and gene content of paleognathous birds. *Zool Res*. 42(1):51–61. doi:10.24272/j.issn.2095-8137.2020.175.

Warren WC, Hillier LW, Tomlinson C, Minx P, Kremitzki M, Graves T, Markovic C, Bouk N, Pruitt KD, Thibaud-Nissen F, et al. 2017. A New Chicken Genome Assembly Provides Insight into Avian Genome Structure. *G3 Genes|Genomes|Genetics*. 7(1):109–117. doi:10.1534/g3.116.035923.

Wessler SR. 2006. Transposable elements and the evolution of eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(47):17600–17601.

Winkler DW, Billerman SM, Lovette IJ. 2020. Typical Antbirds (Thamnophilidae). In: Billerman SM, Keeney BK, Rodewald PG, Schulenberg TS, editors. *Birds of the World*. Cornell Lab of Ornithology.

Zhang G, Li C, Li Q, Li B, Larkin DM, Lee C, Storz JF, Antunes A, Greenwold MJ, Meredith RW, et al. 2014. Comparative genomics reveals insights into avian genome evolution and adaptation. *Science* (1979). 346(6215):1311–1320. doi:10.1126/science.1251385.

Zurita F, Sánchez A, Burgos M, Jiménez R, de la Guardia RD. 1997. Interchromosomal, intercellular and interindividual variability of NORs studied with silver staining and in situ hybridization. *Heredity* (Edinb). 78(3):229–234. doi:10.1038/hdy.1997.36.

7. APÊNDICES

A seguir, são apresentadas outras publicações científicas realizadas em colaboração com o autor desta dissertação ao longo do período do mestrado.



MEDWIN PUBLISHERS
Committed to Create Value for Researchers

Open Access Journal of Veterinary Science & Research
ISSN: 2474-9222

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

**Diego Sebastian Ojeda^{1,2}, Miguel Angel Rinas², Mario Angel Ledesma²,
Vitor Oliveira De Rosso³, Victoria Tura³, Nairo Farias De Farias³, Analía
Del Valle Garneró³ and Ricardo José Gunski^{3*}**

¹Laboratorio de Virologia Experimental, Fundación Instituto Leloir-CONICET, Buenos Aires, Argentina

²El Puma Ecological Park, MEyRNR, Misiones, Argentina

³Laboratory of Animal Genetic Diversity, Federal University of Pampa Campus São Gabriel, Brazil

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

Research Article

Volume 8 Issue 1

Received Date: December 26, 2022

Published Date: January 13, 2023

DOI: 10.23880/oajvsr-16000231

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-band karyotypes of both species were compared with the Ancestral Carnivore Karyotype proposed in the literature, providing a homology and conservation on 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

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

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

^aLaboratório de Diversidade Genética Animal, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, Brazil;

^bDepartamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil; ^cDepartamento 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 *Craniolaeca 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,


Assessing the disparity: comparative toxicity of Copper in zebrafish larvae exposes alarming consequences of permissible concentrations in Brazil

Maria Vitória Takemura Mariano, Luana Paganotto Leandro, Karen Kich Gomes, Ana Beatriz dos Santos, Vitor Oliveira de Rosso, Alcir Luiz Dafre, Marcelo Farina, Thaís Posser & Jeferson Luis Franco

To cite this article: Maria Vitória Takemura Mariano, Luana Paganotto Leandro, Karen Kich Gomes, Ana Beatriz dos Santos, Vitor Oliveira de Rosso, Alcir Luiz Dafre, Marcelo Farina, Thaís Posser & Jeferson Luis Franco (11 Dec 2023): Assessing the disparity: comparative toxicity of Copper in zebrafish larvae exposes alarming consequences of permissible concentrations in Brazil, Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, DOI: [10.1080/15287394.2023.2290630](https://doi.org/10.1080/15287394.2023.2290630)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15287394.2023.2290630>

 View supplementary material [↗](#)

 Published online: 11 Dec 2023.

 Submit your article to this journal [↗](#)

 View related articles [↗](#)

 View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=uteh20>

Comparative cytogenetics in felids (Carnivora: Felidae): *Leopardus wiedii*, *Panthera onca*, *Puma concolor* and *Felis catus*

[Citogenética comparativa em felídeos (Carnivora: Felidae): *Leopardus wiedii*, *Panthera onca*, *Puma concolor* e *Felis catus*]

R.J. Gunki¹, D.S. Ojeda^{2,3}, M.A. Ledesma², V.O. Rosso¹, V. Tura¹, N.F. Farias¹,
F.P. Torres¹, A.D.V. Garnero¹

¹Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, São Gabriel, RS, Brasil

²Laboratory of Experimental Virology, Foundation Institute Leloir-CONICET, Buenos Aires, Argentina

³El Puma Ecological Park, MEyRNR, Misiones, Argentina

ABSTRACT

This study aims to conduct a cytogenetic analysis on four South American feline species: the jaguar (*Panthera onca*), the puma (*Puma concolor*), the ocelot (*Leopardus wiedii*), and the domestic cat (*Felis catus*). We discovered that the jaguar and the puma mainly differ in their fundamental number of chromosomes. Furthermore, we observed a morphological difference in a pair of chromosomes between the jaguar and the domestic cat. This suggests that, over the course of evolution, there was a pericentric inversion in a pair of B4 group chromosomes, leading them to become part of the A group in the jaguar. When analyzing the puma, we noticed the presence of a fourth pair of chromosomes in the E group, along with a deletion in the F group. Additionally, we observed the presence of an additional pair of chromosomes in the C group in the ocelot. Another interesting aspect of the study was the location of nucleolar organizer regions (NORs) on the chromosomes. To elucidate the origin of other chromosome pairs, we employed chromosomal banding techniques, allowing us to better understand the evolution of the C3 pair in the *Leopardus* genus and the E4 pair in the *Puma* genus.

Keywords: felidae, NOR banding, chromosome marker

RESUMO

Este estudo tem como objetivo realizar uma análise citogenética em quatro espécies de felinos sul-americanos: a onça-pintada (*Panthera onca*), a suçuarana (*Puma concolor*), o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus wiedii*) e o gato doméstico (*Felis catus*). Descobriu-se que a onça-pintada e a suçuarana diferem principalmente em seu número fundamental de cromossomos. Além disso, notou-se uma diferença morfológica em um par de cromossomos entre a onça-pintada e o gato doméstico. Isso nos sugere que, ao longo da evolução, houve uma inversão pericêntrica em um par de cromossomos do grupo B4, que passou a fazer parte do grupo A na onça-pintada. Quando se analisou a suçuarana, observou-se a presença de um quarto par de cromossomos no grupo E, juntamente com uma deleção no grupo F. Isso sugere que, ao longo de sua evolução, a suçuarana também passou por uma inversão pericêntrica. A principal diferença entre o gato-do-mato-pequeno e o gato doméstico reside na ausência de cromossomos no grupo F devido à fusão de dois pares de cromossomos telocêntricos. Além disso, notou-se a presença de um par adicional de cromossomos no grupo C no gato-do-mato-pequeno. Outro aspecto interessante do estudo foi a localização das regiões organizadoras nucleolares (NOR) nos cromossomos. Descobriu-se que, tanto na onça-pintada quanto na suçuarana, as NORs estão localizadas no braço curto do par de cromossomos E1. Para elucidar a origem de outros pares de cromossomos, foram empregadas técnicas de bandamento cromossômico, o que permitiu entender melhor a evolução do par C3 no gênero *Leopardus* e do par E4 no gênero *Puma*.

Palavras-chave: felidae, banda NOR, marcador cromossômico

Corresponding author: ricardogunki@unipampa.edu.br

Submitted: July 10, 2023. Accepted: October 16, 2023.

Comparative Cytogenetics in Tyrannidae (Aves, Passeriformes): High Genetic Diversity despite Conserved Karyotype Organization

Diego Madruga Saraiva^a Marcelo Santos de Souza^a Victoria Tura^a
Vitor Oliveira de Rosso^a Edison Zefa^b Analía del Valle Garnero^a
Ricardo José Gunski^a Francisco de Menezes Cavalcante Sassi^c
Marcelo de Bello Cioffi^c Rafael Kretschmer^b

^aLaboratório de Diversidade Genética Animal, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, Brazil;

^bDepartamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil; ^cDepartamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brazil

Keywords

Avian genome · Avian cytogenetics · Comparative cytogenetics · rDNA · Microsatellite sequences

Abstract

Introduction: Passeriformes has the greatest species diversity among Neaves, and the Tyrannidae is the richest in this order with about 600 valid species. The diploid number of this family remains constant, ranging from $2n = 76$ to 84, but the chromosomal morphology varies, indicating the occurrence of different chromosomal rearrangements. Cytogenetic studies of the Tyrannidae remain limited, with approximately 20 species having been karyotyped thus far. This study aimed to describe the karyotypes of two species from this family, *Myiopagis viridicata* and *Sirystes sibilator*. **Methods:** Skin biopsies were taken from each individual to establish fibroblast cell cultures and to obtain chromosomal preparations using the standard methodology. The chromosomal distribution of constitutive heterochromatin was investigated by C-banding, while the location of simple repetitive sequences (SSRs), 18S rDNA, and telomeric sequences was found through fluorescence in situ hybrid-

ization. **Results:** The karyotypes of both species are composed of $2n = 80$. The 18S rDNA probes hybridized into two pairs of microchromosomes in *M. viridicata*, but only a single pair in *S. sibilator*. Only the telomeric portions of each chromosome in both species were hybridized by the telomere sequence probes. Most of the SSRs were found accumulated in the centromeric and telomeric regions of several macro- and microchromosomes in both species, which likely correspond to the heterochromatin-rich regions. **Conclusion:** Although both species analyzed showed a conserved karyotype organization ($2n = 80$), our study revealed significant differences in their chromosomal architecture, rDNA distribution, and SSR accumulation. These findings were discussed in the context of the evolution of Tyrannidae karyotypes.

© 2024 S. Karger AG, Basel

Introduction

While bird species exhibit an extensive range of variation in behavior, morphology, and ecology [1], their chromosomal history shows an intriguing degree of evolutionary stability. About 40.6% of the species that