PINTURA CROMOSSÔMICA EM PYGOCHELIDON CYANOLEUCA (AVES: PASSERIFORMES) UTILIZANDO SONDAS DE GALLUS GALLUS E ZENAIDA AURICULATA

Cassiane Furlan Lopes [1]

Suziane Alves Barcellos [2]

Alice Lemos Costa [3]

Rafael Kretschmer [4]

Edivaldo Herculano Correa de Oliveira [5]

Ricardo Jose Gunski [6]

Resumo:

Apesar da família Hirudinidae ser muito diversa em espécies, pouco se sabe sobre a organização genômica de seus membros, as andorinhas. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar o complemento cromossômico de Pygochelidon cyanoleuca quanto à morfologia cromossômica e aos eventos de fissão e fusão no seu cariótipo, com relação às espécies Gallus gallus e Zenaida auriculata. Para tanto, as análises foram realizadas através de coloração convencional com Giemsa e de Hibridização in situ florescente (FISH) utilizando dois tipos de sondas de cromossomos inteiros (Gallus gallus e Zenaida auriculata). A espécie P. cyanoleuca apresentou 76 cromossomos com morfologia diferenciada no 5º, 6º e 7º pares de cromossomos. Em relação ao resultados encontrados na pintura cromossômica, embora a espécie P. cyanoleuca tenha demonstrado uma fissão no primeiro par do ancestral (GGA1), a mesma também apresenta uma fusão de um microcromossomo no sétimo par, evidenciando um rearranjo cromossômico extra para esta espécie.

Palavras-chave: Citogenética, Aves, Pintura cromossômica

Modalidade de Participação: Pós-Graduação

PINTURA CROMOSSÔMICA EM PYGOCHELIDON CYANOLEUCA (AVES: PASSERIFORMES) UTILIZANDO SONDAS DE GALLUS GALLUS E ZENAIDA AURICULATA

[1] Aluno de pós-graduação. cassianefurlanlopes@gmail.com. Autor principal

[2] Aluno de Pós-Graduação. suzianebarcellos@gmail.com. Co-autor

[3] Aluno de Graduação. alicelemoscosta14bio@gmail.com. Co-autor

[4] Aluno de Pós-Graduação. rafa.kretschmer@gmail.com. Co-autor

[5] Docente da UFPA. ehco@ufpa.br. Co-autor

[6] Docente. ricardogunski@unipampa.edu.br. Orientador

PINTURA CROMOSSÔMICA EM *Pygochelidon cyanoleuca* (AVES: PASSERIFORMES) UTILIZANDO SONDAS DE *Gallus gallus* E *Zenaida auriculata*

1 INTRODUÇÃO

As aves são os representantes da classe Tetrapoda com o maior número de espécies descritas, aproximadamente 10.600 (GILL; DONSKER, 2016). As andorinhas (Hirundinidae) são bem conhecidas mundialmente, devido aos seus hábitos cosmopolitas, comportamento e ecologia (SHELDON et al., 2005). Devido à escassez de recursos alimentares no inverno, essas aves tendem a voar longas distâncias para encontrar comida e local seguro para ficar durante essa estação (SIGRIST, 2013).

Nas últimas décadas a pintura cromossômica comparativa vem sendo aplicada para identificar homologias cromossômicas entre distintas espécies (KRETSCHMER et al, 2018a). Esta técnica demonstrou-se muito eficiente para estudos de biologia evolutiva, e de evolução cariotípica (FERGUSON-SMITH et al., 2005; ELLEGREN, 2010). As sondas de *Gallus gallus* (GGA) e *Leucopternis albicollis* (LAL) são comumente utilizadas em análises no genoma das aves (GRIFFIN et al., 2007; DE OLIVEIRA et al., 2010). A utilização destas sondas em Passeriformes revelaram uma fissão e numerosas inversões no primeiro par de macrocromossomos autossômicos do ancestral sintênico (GGA1). Esta característica é convergente com outros resultados já encontrados em outras espécies quando analisadas por hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (KRETSCHMER et al., 2014, 2015; DOS SANTOS et al., 2015, 2017; KRETSCHMER et al 2018a).

Recentemente um novo conjunto de sondas de macrocromossomos inteiros foi desenvolvida, utilizando-se *Zenaida auriculata* como espécie modelo (ZAU). Esta sonda possui um alto grau sintênico com os macrocromossomos do ancestral hipotético das aves e de *G. gallus* (KRETSCHMER et al., 2018b). Apesar dos avanços nos estudos filogenéticos, ainda existem algumas dúvidas sobre as relações taxonômicas entre os membros da família Hirundinidae (SHELDON et al., 2005). Além disso, pouco se sabe sobre a organização genômica dessas aves. Análises citogenéticas principalmente na área de genômica têm fornecido novas evidências quanto às características dos cromossomos autossômicos, bem como dos sexuais. Sabe-se que apesar de relativamente conservados, os cromossomos das aves evoluem através de rearranjos cromossômicos (ELLEGRENI, 2010).

Devido à escassez de estudos citogenéticos e a fim de compreender mais sobre a evolução cariotípica da espécie *Pygochelidon cyanoleuca*, o principal objetivo desta pesquisa foi apresentar pela primeira vez a pintura cromossômica com sondas de *Gallus gallus* (GGA) e *Zenaida auriculata* (ZAU) em *P. cyanoleuca*.

2 METODOLOGIA

Cinco espécimes de *Pygochelidon cyanoleuca*, três fêmeas e dois machos foram coletados através de redes de neblina no município de São Gabriel - Rio Grande do Sul, Brasil (Número de Permissão do SISBIO: 33860-4). Os protocolos utilizados neste experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA - Universidade Federal do Pampa, 026/2012).

As preparações cromossômicas foram feitas a partir de cultura direta de medula óssea de curta duração, de acordo com Garnero e Gunski (2000) e cultura de fibroblastos, segundo Sasaki, Ikeuchi e Makino (1968). Para a coloração convencional, as lâminas foram coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato por 5 minutos, lavadas com água destilada, secas ao ar e observadas ao microscópio, onde o número diplóide foi contado e cerca de 30 metáfases de cada exemplar foram desenhadas, e as melhores foram fotografadas e utilizadas para realizar a biometria cromossômica no *software* Micromeasure e a montagem do cariótipo.

A pintura cromossômica foi realizada através da utilização de dois conjuntos de sondas: *Zenaida auriculata* (ZAU1-8 e Z) e *Gallus gallus* (GGA9-10). Para o procedimento de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH), os protocolos para hibridização foram realizados conforme descrito em De Oliveira et al. (2010) e os resultados foram examinados por microscopia epifluorescente.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

O número diplóide encontrado foi de 76 cromossomos para a espécie *P. cyanoleuca*. A morfologia e biometria dos cromossomos está descrita na tabela 1, enquanto que o cariótipo parcial da espécie está representado na figura 1.

Tabela 1- Morfologia cromossômica de *P. cyanoleuca*

Cromo	Braço curto	Braço longo	CI	Morfologia
1	22	32	40,70	M
2	11	33,5	24,72	A
3	11	33	25,00	A
4	17	17	50,00	M
5	8	24	25,00	A
6	12	27	30,77	SM
7	11	16	40,74	M
8	0	18,5	0,00	T
9	0	15	0,00	T
10	7	7	50,00	M
11	0	11	0,00	T
Z	18	20	47,37	M
W	14	22	38,89	SM

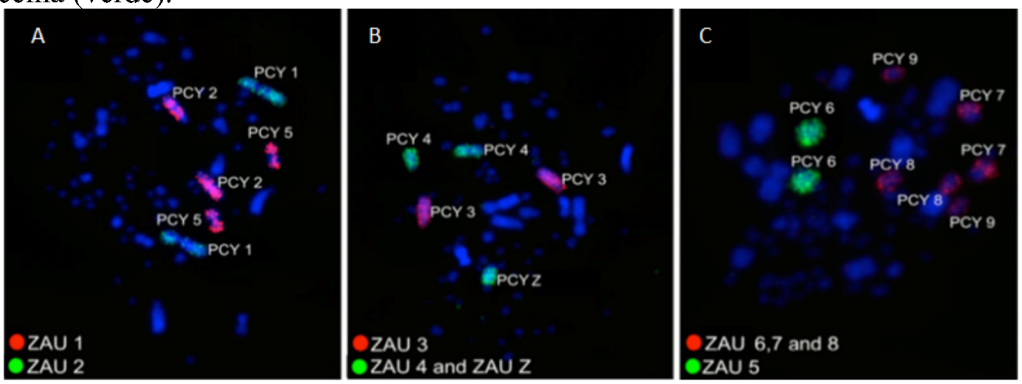
Cromo= Cromossomos, CI = Índice centromérico , M = metacêntrico, SM = submetacêntrico, A = acrocêntrico, T = telocêntrico. Fonte: do autor, 2018.

Figura 1- Cariótipo parcial de uma fêmea em coloração convencional (Giemsa) de *P. cyanoleuca*. Barra = 5µm.



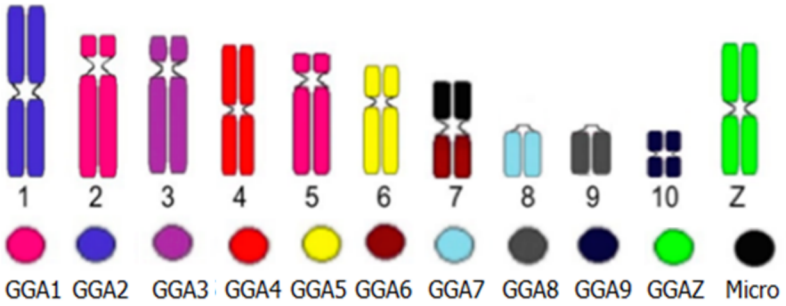
Fonte: do autor, 2018.

Figura 2 - Experimentos de FISH utilizando sondas de *Z. auriculata* (ZAU) hibridizadas em metáfases de *P. cyanoleuca* - PCY (A, B e C). As sondas são indicadas no canto inferior esquerdo de cada imagem, as sondas foram marcadas com biotina / Cy3 (vermelho) ou fluoresceína (verde).



Fonte: do autor, 2018.

Figura 3 - Mapa de homologias utilizando as sondas GGA e ZAU detectadas por FISH em *P. cyanoleuca*.



Fonte: do autor, 2018.

Experimentos utilizando sondas GGA e ZAU evidenciaram a conservação de alguns grupos sintênicos em *P. cyanoleuca*. ZAU1 hibridizou no segundo e quinto pares de cromossomos, enquanto ZAU2 demonstrou sinais de hibridização apenas no primeiro par cromossômico (Figuras 2C). O mapa de homologia com *G. gallus* demonstrou que GGA1 (cromossomo ancestral 1) corresponde a dois pares distintos de cromossomos e GGA2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 correspondem a um par cromossômico em *P. cyanoleuca* (Figuras 3). Também foi observada uma fusão com um microcromossomo no sétimo par de cromossomos (Figuras 2A e 3).

Em geral, as características cariotípicas observadas nas andorinhas foram compatíveis com as frequentemente encontradas em aves (NANDA et al., 2011; KRETSCHMER et al, 2014, 2015). No entanto, os cromossomos W dessa espécie diferiu do padrão geral observado, considerando que *P. cyanoleuca* apresentou um cromossomo W relativamente grande quando comparado com a maioria dos Passeriformes (BERLIN; ELLEGREN, 2004; CHEN et al, 2012; ZHANG et al, 2014).

Este estudo também utilizou sondas de *Z. auriculata* (ZAU), que apresentam alta homologia com o cariótipo de *G. gallus*. Além disso, mostraram sinais de hibridização mais claros em espécies de ordens distintas, Columbiformes e também em Passeriformes como observado em nosso estudo, provavelmente devido à sua proximidade filogenética (KRETSCHMER et al., 2018b).

As principais diferenças encontradas quando comparadas ao suposto cariótipo ancestral das aves (GRIFFIN et al., 2007) é a fissão no primeiro par de cromossomos em dois

pares distintos de macrocromossomos e a fusão de um microcromossomo no sétimo par. Esta fusão possivelmente ocorreu devido às distintas pressões evolutivas que ocorreram em *P. cyanoleuca* que representa a espécie mais derivada entre as andorinhas (SHELDON et al., 2005; ELLEGREN, 2010). A fissão do cromossomo GGA1 foi observada em todos os Passeriformes estudados por FISH até o momento (GUTTENBACH et al., 2003; DERJUSHEVA et al., 2004; DOS SANTOS et al., 2015; KRETSCHMER et al., 2014, 2015, KRETSCHMER et al, 2018a).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, através das análises de pintura cromossômica foi possível identificar homologias entre *G. gallus, Z. auriculata e P. cyanoleuca*, fornecendo dados sobre os mecanismos envolvidos na evolução cariotípica da espécie pertencente à família Hirundinidae, tal como a fusão encontrada no sétimo par cromossômico.

REFERÊNCIAS

BERLIN, S.; ELLEGREN, H. Chicken W: a genetically uniform chromosome in a highly variable genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 45, p. 15967-15969, 2004.

CHEN, N.; BELLOTT, D.W.; PAGE, D.C.; CLARK, A.G. Identification of avian W-linked contigs by short-read sequencing. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 183, 2012.

DE OLIVEIRA E.H.C.; TAGLIARINI, M.M.; RISSONO, J.D.; PIECKZARKA, J.C.; NAGAMACHI, C. et al. Reciprocal chromosome painting between white hawk (Leucopternis albicollis) and chicken reveals extensive fusions and fissions during karyotype evolution of Accipitridae (Aves, Falconiformes). **Chromosome Research**, v. 18, p. 349–355, 2010.

DE OLIVEIRA, T. D.; KRETSCHMER, R.; BERTOCCHI, N.A.; DEGRANDI, T.M; DE OLIVEIRA, E.H.C. et al. Genomic Organization of Repetitive DNA in Woodpeckers (Aves, Piciformes): Implications for Karyotype and ZW Sex Chromosome Differentiation. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0169987, 2017.

DERJUSHEVA S.; KURGANOVA, A.; HABERMANN, F.; GAGINSKAYA, E. High chromosome conservation detected by comparative chromosome painting in chicken, pigeon and passerine birds. **Chromosome Research**, v. 12, n. 7, p. 715–723, 2004.

DOS SANTOS, M.S.; KRETSCHMER, R.; SILVA, F.A.; LEDESMA, M.A.; O'BRIEN, P.C. et al. Intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus Saltator (Thraupidae, Passeriformes) and the occurrence of heteromorphic Z chromosomes. **Genetica**, v. 143, n. 5, p. 535–43, 2015.

DOS SANTOS, M.S.; KRETSCHMER, R.; FRANKL-VILCHES, C.; BAKKER, A.; GAHR, M. et al. Comparative Cytogenetics between Two Important Songbird, Models: The Zebra Finch and the Canary. **PloS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0170997, 2017.

ELLEGREN, H. Evolutionary stasis: the stable chromosomes of birds. Trends in Ecology & Evolution, v. 25, n. 5, p. 283-291, 2010.

FERGUSON-SMITH, M. A.; YANG, F.; RENS, W.; O'BRIEN, P.C. The impact of chromosome sorting and painting on the comparative analysis of primate genomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 108, n. 1-3, p. 112-121, 2005.

GARNERO, A. D. V.; GUNSKI, R. J. Comparative analysis of the karyotypes of Nothura maculosa and Rynchotus rufescens (Aves, Tinamidae). A case of chromosomal polymorphism. **The Nucleus**, v. 43, p. 64–70, 2000.

GILL, F.; DONSKER, D.; IOC World Bird List. In: DONSKER, 2016. Disponível em: <http://www.worldbirdnames.org/>. Acesso em: 23 ago. 2018.

GRIFFIN, D.K.; ROBERTSON, L.B.W.; TEMPEST, H.G.; SKINNER, B.M. The evolution of the avian genome as revealed by comparative molecular cytogenetic. **Cytogenetic and**

Genome Research, v. 117, p. 64–77, 2007.
GUTTENBACH, M.; NANDA, I.; FEICHTINGER, W.; MASABANDA, J.S.; GRIFFIN, D.K. et al. Comparative chromosome painting of chicken autosomal paints 1–9 in nine different bird species. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 103, n. 1-2, p. 173-84, 2003.
KRETSCHMER, R.; DE LIMA, V.L.C.; DA PONTE, L.N.; DEGRANDI, T.M.; VINADÉ, L.C. et al. NOR-bearing as a plesiomorphic characteristic in Mimus saturninus (Passeriformes Mimidae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 5, n. 2, p. 140-147, 2014.
KRETSCHMER, R.; DE OLIVEIRA, E.H.C.; DOS SANTOS, M.S.; FURO, I.O.; O'BRIEN, P.C.M. et al. Chromosome mapping of the large elaenia (Elaenia spectabilis): evidence for a cytogenetic signature for passeriform birds? **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 115, n. 2, p. 391-398, 2015.
KRETSCHMER, R.; FERGUSON-SMITH, M.A.; DE OLIVEIRA, E.H.C. Karyotype Evolution in Birds: From Conventional Staining to Chromosome Painting. **Genes**, v. 9, n. 4, p. 181, 2018a.
KRETSCHMER, R.; DE OLIVEIRA FURO, I.; GUNSKI, R.J.; DEL VALLE GARNERO, A.; PEREIRA, J.C. et al. Comparative chromosome painting in Columbidae (Columbiformes) reinforces divergence in Passerea and Columbea. **Chromosome Research**, v. 26, n. 188, p 1-13, 2018b.
NANDA, I.; BENISH, P.; FETTING, D.; HAAF, T.; SCHIMID, M. Synteny conservation of chicken macrochromosomes 1–10 in different avian lineages revealed by cross-species chromosome painting. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 132, n. 3, p. 165-181, 2011.
SASAKI, M.; IKEUCHI, T.; MAKINO, S. A feather pulp culture technique for avian chromosomes, with notes on the chromosomes of the peafowl and the ostrich. **Experientia**, v. 24, n. 12, p. 1292–1293, 1968.
SHELDON, F. H.; WHITTINGHAM, L.A.; MOYLE, R.G.; SLIKAS, B.; WINKLER, D.W. Phylogeny of swallows (Aves: Hirundinidae) estimated from nuclear and mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 35, n. 1. p. 254-270, 2005.
SIGRIST, T. **Guia de campo avis brasilis: Avifauna brasileira**. 3. ed. São Paulo: Avis brasilis editora, 2013.
ZHANG, G.; LI, C.; LI, Q.; LI, B.; LARKIN, B.M. et al. Comparative genomics reveals insights into avian genome evolution and adaptation. **Science**, v. 346, n. 6215, p. 1311-1320, 2014.