DISTRIBUIÇÃO DE MICROSSATÉLITES NO GENOMA DE DUAS ESPÉCIES DE ANDORINHAS (AVES: PASSERIFORMES)

Suziane Alves Barcellos [1]

Rafael Kretschmer [2]

Alice Lemos Costa [3]

Cassiane Furlan Lopes [4]

Michelly dos Santos [5]

Analía Del Valle Garnero [6]

Resumo:

Como observado em muitos grupos de aves, existe uma falta de informação sobre a organização cariotípica, bem como a distribuição de seqüências repetitivas em espécies pertencentes à família Hirundinidae. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a distribuição de sequências microssatélites em espécies de andorinhas - Progne tapera e Progne chalybea. As análises foram realizadas utilizando coloração de Giemsa e Hibridização in situ Fluorescente (onze sequências de microssatélites). Ambas espécies apresentaram 76 cromossomos e o mesmo padrão morfológico. A distribuição das sequências de microssatélites foi semelhante nas duas espécies de Progne. Sequências repetitivas de DNA foram encontradas nas regiões telroméricas, pericentroméricas, teloméricas dos macrocromossomos e um bloco intersticial no cromossomo W. A maioria dos microcromossomos apresentou principalmente sinais teloméricos. O cromossomo Z apresentou apenas um sinal de hibridização em P. tapera e nenhum e P. chalybea. Em contraste, o cromossomo W exibiu a acumulação de distintas sequências de microssatélites em ambas espécies. O cromossomo W das andorinhas é maior quando comparado à maioria dos Passeriformes. Quantidades tão elevadas de sequências repetitivas podem explicar o aumento do tamanho do cromossomo observado. Em suma, esses dados indicam o papel significativo que sequências de microssatélites podem desempenhar na diferenciação de cromossomos sexuais.

Palavras-chave: FISH, Citogenética, Cromossomo W.

Modalidade de Participação: Pós-Graduação

DISTRIBUIÇÃO DE MICROSSATÉLITES NO GENOMA DE DUAS ESPÉCIES DE ANDORINHAS (AVES: PASSERIFORMES)

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

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

[3] Aluna de graduação . alicelemoscosta14bio@gmail.com. Co-autor

[4] Aluna de Pós graduação. cassianefurlanlopes@gmail.com. Co-autor

[5] Aluna de Pós Graduação. michellyufpa@gmail.com. Co-autor

[6] Docente. analiagarnero@yahoo.com.br. Orientador

DISTRIBUIÇÃO DE MICROSSATÉLITES NO GENOMA DE DUAS ESPÉCIES DE ANDORINHAS (AVES: PASSERIFORMES)

1 INTRODUÇÃO

Hirundinidae (Aves: Passeriformes), comumente conhecida como a família das andorinhas, possui um grande número de espécies (DICKINSON, 2003; SHELDON et al., 2005). Dividida em dois clados: Pseudochelidoninae e Hirundininae, compreende 84 espécies, onde 19 delas são encontradas nas Américas Central e do Sul (TURNER; ROSE, 1989; SHELDON et al., 2005).

Apesar dos recentes avanços nos estudos filogenéticos, ainda existem dúvidas sobre as relações taxonômicas entre os membros da família Hirundinidae e pouco se sabe sobre sua organização genômica (SHELDON et al., 2005). Estudos citogenéticos nesta família são muito limitados, apenas 10% das espécies de andorinhas tiveram seu cariótipo e número diplóide descrito (HOOPER; PRICE, 2017).

Em geral, os cariótipos das aves possuem um alto número diplóide (2n), aproximadamente 80 cromossomos, composto por vários pares de microcromossomos e poucos de macrocromossomos (TEGELSTRÖM; RYTTMAN, 1981). No entanto, esses números podem variar de 2n=40 para *Falco columbarius* à 2n=136-142 para *Corythaixoides concolor* (NISHIDA et al., 2008). Deste modo, podemos observar através da citogenética de aves como o material genético pode ser versátil e dinâmico.

As aves possuem um sistema sexual ZZ/ZW, no qual a fêmea é heterogamética. O cromossomo Z é relativamente conservado, possuindo um tamanho maior que o cromossomo W (SCHARTL; SCHMID, 2016), o qual pode apresentar grande variação, é geralmente pequeno e heterocromático, como observado na maioria dos Passeriformes (BARBOSA et al., 2013; DOS SANTOS et al., 2015).

O genoma das aves é pequeno e com pouca quantidade de DNA repetitivo (KASAI; O'BRIEN; FERGUSON-SMITH, 2012; ZHANG et al., 2014). Recentemente, estudos utilizando sondas microssatélites em algumas espécies das famílias Columbidae, Picidae e Psittacidae mostraram a importância desses elementos na organização do genoma, bem como na diferenciação dos cromossomos sexuais (FURO et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2017; KRETSCHMER et al., 2018).

Desta forma devido a escassez de estudos citogenéticos na família Hirundinidae, esta pesquisa objetivou analisar a organização do genoma e a distribuição de 11 sequências de DNA repetitivo em duas espécies de andorinhas: *P. chalybea* e *P. tapera*, buscando auxiliar na compreensão da distribuição de microssatélites em aves, especialmente aquelas com cromossomos sexuais aumentados.

2 METODOLOGIA

Oito indivíduos foram analisados, dois machos e duas fêmeas de *P. tapera* e *P. chalybea*, coletados com redes de neblina no município de São Gabriel - Rio Grande do Sul, Brasil (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 (GARNERO; GUNSKI, 2000) e cultura de fibroblastos (SASAKI; IKEUCHI; MAKINO, 1968). As lâminas foram coradas com Giemsa 5% e as melhores metáfases foram fotografadas e utilizadas para realização da biometria e nomenclatura (GUERRA, 2004).

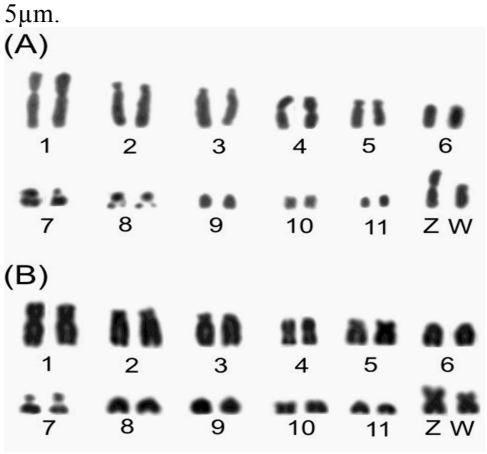
A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada de acordo com Kubat et al. (2008), com modificações. Foram utilizadas 11 sequências de microssatélites : $(CA)_{15}$, $(CAA)_{10}$, $(CAC)_{10}$, $(CAG)_{10}$, $(CAT)_{10}$, $(CGG)_{10}$, $(CG)_{15}$, $(GA)_{15}$, $(GAA)_{10}$, $(GAC)_{10}$ e $(TA)_{15}$, que

foram marcados com Cy3 durante a síntese . Os resultados FISH foram examinados por microscopia epifluorescente.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

As duas espécies de *Progne* apresentaram 2n= 76 cromossomos e o mesmo padrão morfológico. Os pares 1, 4, 10 e o cromossomo sexual Z são metacêntricos, enquanto os pares 2 e 3 são acrocêntricos. A morfologia metacêntrica foi observada no 5° par cromossômico e no cromossomo W. Os pares 6, 7, 8, 9 e 11 são telocêntricos (Figura 1).

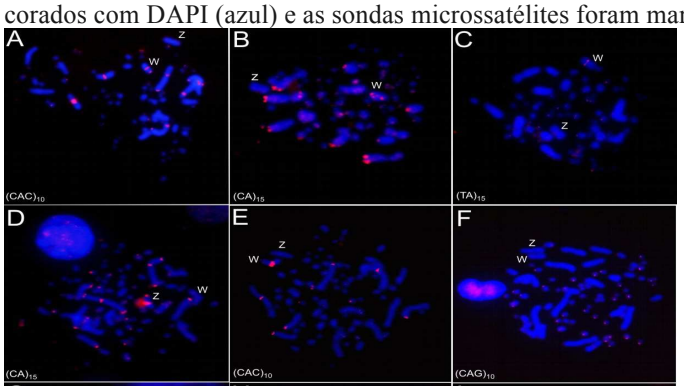
Figura 1- Cariótipo parcial de *P. tapera* (A) e *P. chalybea* (B) em coloração convencional (Giemsa). Barra = 5µm.



Fonte: da Autora, 2018.

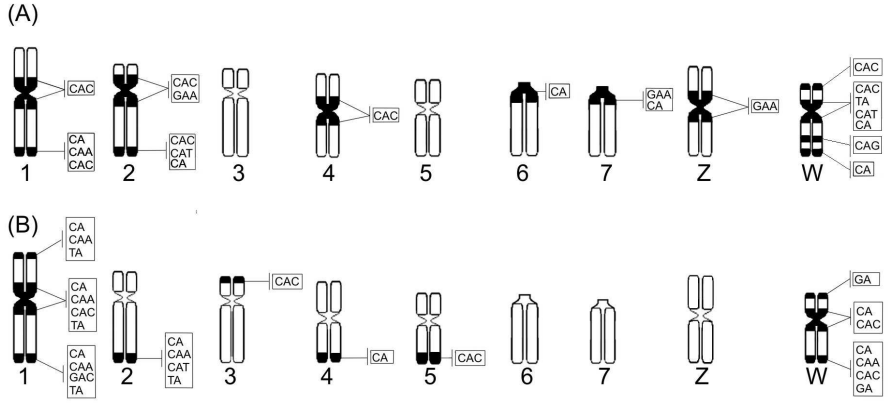
Dos onze microssatélites utilizados, nove apresentaram sinais de hibridização em *P. tapera* e dez em *P. chalybea.* Apenas a sequência de microssatélite $(CG)_{15}$ não demonstrou sinais de hibridização em nenhuma das espécies analisadas. O acúmulo de microssatélites em regiões pericentoméricas e centroméricas podem ser observados nos pares 1, 2, 4, 6, 7 e cromossomo Z em *P. tapera* e no par 1 em *P. chalybea*. A sequência $(GAA)_{10}$ apresentou acúmulo preferencial em regiões heterocromáticas. As sequências de microssatélites apresentaram sinais teloméricos de hibridização na maioria dos microcromossomos (Figura 2A- F). Diferentemente do cromossomo W, que demonstrou ampla gama de sinais de microssatélites, apenas a sequência $(GAA)_{10}$ foi encontrada no cromossomo Z (Figura 3A). O cromossomo W apresentou sinais pericentroméricos, centroméricos e teloméricos nas duas espécies amostradas. Sinais teloméricos estavam presentes nos pares de macrocromossomos 1 e 2 em *P. tapera*, pares 1, 2, 3, 4 e 5 em *P. chalybea* (Figura 3A- B).

Figura 2 - Análises de microssatélites por FISH em *P. tapera* (A-C) e *P. chalybea* (D-F). Os cromossomos foram corados com DAPI (azul) e as sondas microssatélites foram marcadas com Cy3 (vermelho). Barra = 5 µm.



Fonte: da Autora, 2018.

Figura 3 - Distribuição e localização de sequências de microssatélites nos pares de cromossomos 1-7, Z e W. *P. tapera* (A) e *P. chalybea* (B).



Fonte: do Autor, 2018.

Em geral, as características cariotípicas observadas nas andorinhas foram compatíveis com as comumente encontradas em aves (NANDA et al., 2011; KRETSCHMER et al, 2014, 2015). No entanto, o cromossomo W dessas duas espécies de andorinhas diferiram do padrão geralmente observado, pois eles são relativamente grandes quando comparados com a maioria dos Passeriformes (BERLIN; ELLEGREN, 2004; ZHANG et al, 2014).

Embora o número de sequências repetitivas no genoma das aves seja menor do que em outros vertebrados, pesquisas com microssatélites forneceram informações interessantes sobre a evolução cromossômica dos Columbiformes Neotropicais (ZHANG et al., 2014; KRETSCHMER et al., 2018). Apesar da pouca quantidade de DNA repetitivo em aves, dos onze microssatélites utilizados nas andorinhas, apenas a sequência $(CG)_{15}$ não hibridizou em nenhuma delas, demostrando que o acúmulo dessas sequências pode ser revelado através das técnicas de FISH. O DNA repetitivo estava presente em macrocromossomos, incluindo cromossomos sexuais e microcromossomos, demonstrando variação das sequências e posição em cada espécie de andorinha. No entanto, *P. tapera* e *P. chalybea* compartilharam várias sequências de microssatélites, como $(CA)_{15}$, $(CAA)_{10}$ e $(CAC)_{10}$,acumuladas no primeiro par de macrocromossomos. Assim, do ponto de vista filogenético, as sequências $(CA)_{15}$, $(CAA)_{10}$ e $(CAC)_{10}$, podem ser consideradas características sinapomórficas para as duas espécies de *Progne*.

O acúmulo de microssatélites foi observado nos cromossomos W, que demonstraram um tamanho elevado quando comparados com a maioria das espécies de Passeriformes (KRETSCHMER et al., 2014; DOS SANTOS et al., 2017). A amplificação do DNA repetitivo envolvido no aumento dos cromossomos sexuais tem sido observada em muitas espécies de animais (SCHARTL; SCHMID, 2016). O aumento do cromossomo Z em pica-paus e do cromossomo W em Psittaciformes foi demonstrado como resultado da acumulação desses elementos (FURO et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2017). O cromossomo W de *P. tapera* e *P. chalybea* é quase inteiramente heterocromático. Estes resultados corroboram com estudos que demonstram que os DNAs repetitivos tendem a se concentrar em áreas de heterocromatina constitutiva (GUERRA, 2004). Assim, o acúmulo de sequências de microssatélites observadas no cromossomo W pode explicar o grande tamanho desse cromossomo para as espécies de andorinhas. Por outro lado, o cromossomo Z é altamente conservado em linhagens de aves (NANDA; SCHMID, 2002; BERLIN; ELLEGREN, 2004). Dentre as sequências repetitivas usadas neste estudo, apenas uma $(GAA)_{10}$ hibridizou no cromossomo Z em *P. tapera*, da qual o sinal estava associado à região de heterocromatina constitutiva. Semelhantemente este fato foi observado em nove espécies de Columbidae, das

quais não demonstraram nenhum sinal de hibridização no cromossomo Z (KRETSCHMER et al, 2018).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Podemos observar que as espécies de *Progne* possuem alta similaridade do complemento cromossômico e esses dados citogenéticos corroboram com a filogenia atual dessas espécies, que agrupa *P. tapera* e *P. chalybea* no mesmo gênero. O cromossomo W possui acúmulo de sequências microssatélites e heterocromatina, podendo ser resultado de diferentes mecanismos de resposta a pressões evolutivas que levaram este genoma a reagir, acumulando sequências repetitivas como parte da diferenciação dos cromossomos sexuais. Além disso, esse cromossomo diferencia-se da maioria dos cromossomos W encontrados em Passeriformes, devido ao seu tamanho elevado. Assim, pode-se dizer que o acúmulo de microssatélites possivelmente é o um dos responsáveis pelo aumento do tamanho desse cromossomo.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, M. D. O. et al. Nucleolar organizer regions in *Sittasomus griseicapillus* and *Lepidocolaptes angustirostris* (Aves, Dendrocolaptidae): evidence of a chromosome inversion. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, n. 1, p. 070-073, 2013.

DE OLIVEIRA FURO, I. et al. Chromosomal diversity and karyotype evolution in South American macaws (Psittaciformes, Psittacidae). **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0130157, 2015.

DE OLIVEIRA T. 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.

DICKINSON, E. C. **The Howard & Moore complete checklist of the birds of the world**. 3. ed. United Kingdom: Princeton University Press, 2003.

DOS SANTOS M. S. 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.

_____. et al., Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Myiopsitta monachus* and *Amazona aestiva* (Psittaciformes, Psittacidae) with Emphasis on the Sex Chromosomes**.** **Cytogenetic and genome research**, v. 151, v. 3, p. 151-160, 2017.

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.

GUERRA, M. **FISH: Conceitos e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004.

HOOPER, D. M.; PRICE, T. D. Chromosomal inversion differences correlate with range overlap in passerine birds. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, n. 10, p. 1526–1534, 2017.

KASAI, F.; O'BRIEN, P.C.M.; FERGUSON-SMITH, MA. Reassessment of genome size in turtle and crocodile based on chromosome measurement by flow karyotyping: Close similarity to chicken. **Biology Letters**. v. 8, n. 4, p. 631–635, 2012.

KRETSCHMER, R. 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.

_____. 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.

_____et al. Repetitive DNAs and shrink genomes: A chromosomal analysis in nine Columbidae species (Aves, Columbiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 41, n. 1, p.

98-106, 2018
KUBAT, Z. et al. Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. **Genome**, v. 51, n. 5, p. 350-356, 2008.
NANDA I. et al. Extensive gross genomic rearrangements between chicken and Old World vultures (Falconiformes: Accipitridae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 112, n. 3-4, p. 286-295, 2006.
_____. et al. 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.
NISHIDA, C. et al. Characterization of chromosome structures of Falconinae (Falconidae, Falconiformes, Aves) by chromosome painting and delineation of chromosome rearrangements during their differentiation. **Chromosome Research**, v.16, n. 1, p. 171-181, 2008.
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.
SCHARTL, M.; SCHMID, M. I. Dynamics of vertebrate sex chromosome evolution: from equal size to giants and dwarfs. **Chromosoma,** v. 125, n. 3, p. 553-571, 2016.
SHELDON, F. H. et al. Phylogeny of swallows (Aves: Hirundinidae) estimated from nuclear and mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 35, n. 1. p. 254-270, 2005.
TEGELSTRÖM, H.; RYTTMAN, H. Chromosomes in birds (Aves): evolutionary implications of macro and microchromosome numbers and lengths. **Hereditas**, v. 94, n. 2, p. 225-233, 1981.
TURNER, A. T.; ROSE, C. **Swallows & Martins: An Identification Guide and Handbook**. 1. ed. Boston: Houghton Mifflin, 1989.
ZHANG, G. et al. Comparative genomics reveals insights into avian genome evolution and adaptation. **Science**, v. 346, n. 6215, p. 1311-1320, 2014.