

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**SUZIANE ALVES BARCELLOS**

**EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA HIRUNDINIDAE  
(AVES: PASSERIFORMES)**

**SÃO GABRIEL  
2018**

**SUZIANE ALVES BARCELLOS**

**EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA HIRUNDINIDAE  
(AVES: PASSERIFORMES)**

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

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

**São Gabriel  
2018**

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) .

B242e Barcellos, Suziane Alves  
Evolução cariotípica em espécies da família Hirundinidae  
(Aves: Passeriformes) / Suziane Alves Barcellos.  
42 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,  
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2018.

"Orientação: Analía del Valle Garnero".

1. Aves. 2. FISH. 3. Citogenética. 4. Microssatélites . 5.  
Cromossomo W. I. Título.

**SUZIANE ALVES BARCELLOS**

**EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA HIRUNDINIDAE  
(AVES: PASSERIFORMES)**

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

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em: 1 de novembro de 2018.

Banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Analía del Valle Garnero  
Orientadora  
(UNIPAMPA)

---

Dr. Rafael Kretschmer  
(UFRGS)

---

Prof. Dr. Ricardo José Gunski  
(UNIPAMPA)

Dedico esta dissertação aos meus pais,  
Sônia e Amilton, gratidão eterna.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais por me motivarem desde criança, pelo apoio diário, amor incondicional e por sonharem junto comigo. Saibam que todas as minhas conquistas só se concretizaram devido ao apoio e amor de vocês.

Ao meu namorado pelo amor, apoio e compreensão em todo período da Pós-Graduação.

Agradeço à professora Analía pela orientação, amizade, carinho, confiança e pelos ensinamentos.

Ao professor Ricardo, agradeço seus valiosos conselhos, ensinamentos, apoio e toda contribuição neste trabalho.

Aos professores Edivaldo de Oliveira e Marcelo Cioffi pela disponibilidade das sondas de microssatélites e pelas sugestões.

Ao Professor Fabiano pelos conselhos e incentivo.

Ao Rafael pela disponibilidade das sondas de ZAU, pela ajuda nos experimentos de FISH, pelos ensinamentos e sugestões para o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Agradeço também pelo apoio dos meus colegas e amigos do Laboratório de Diversidade Genética Animal. À Jéssica, Vanusa e Nairo pelas rodas de chimarrão, por compartilharmos juntos as angústias diárias e as divertidas conversas. À Cassiane pela amizade e apoio. Ao Tiago por compartilhar seu conhecimento comigo, pela compreensão, ajuda e amizade. Ao Marcelo, por me apresentar a citogenética e pelas inscansáveis vezes que trabalhamos juntos, pelos ensinamentos e pela amizade. Em especial a minha amiga irmã Alice, pela amizade, companheirismo, por sempre segurar minha mão nos momentos difíceis e vibrar junto comigo nos momentos de alegria.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”

Charles Chaplin

## RESUMO

Passeriformes é a maior ordem da classe Aves, possuindo uma enorme diversidade com mais de 5000 espécies. Dentro desta ordem está presente a família Hirundinidae, da qual as andorinhas pertencem, aves cosmopolitas que possuem características morfológicas substancialmente homogêneas. Apesar da riqueza de espécies da família Hirundinidae, pouco se sabe sobre a organização genômica de seus membros. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar o complemento cromossômico das espécies - *Progne tapera*, *Progne chalybea* e *Pygochelidon cyanoleuca*. As análises foram realizadas através de coloração com Giemsa, bandeamento C, Ag-NOR, Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com onze sequências de microssatélites e dois conjuntos de sondas de cromossomos inteiros (*Gallus gallus* e *Zenaida auriculata*). As três espécies analisadas apresentaram 76 cromossomos com morfologias muito semelhantes, apresentando diferenças apenas entre 5º, 6º e 7º pares de cromossomos da espécie *P. cyanoleuca*. Foram identificados dois pares cromossômicos portadores de regiões organizadoras de nucléolo (NORs), o que caracteriza uma condição apomórfica para essas espécies. O padrão de bandeamento C foi o mesmo encontrado na maioria das aves, áreas de heterocromatina distribuídas principalmente nas regiões centroméricas e no cromossomo W. A organização dos microssatélites foi semelhante nas duas espécies de *Progne*, no entanto *P. cyanoleuca* apresentou um padrão distinto. Com exceção de (CG)<sub>15</sub>, todos os outros 10 microssatélites produziram sinais de hibridização. As sequências de DNA repetitivo foram encontradas nas regiões centroméricas, pericentroméricas e teloméricas dos macrocromossomos, contendo e dois blocos intersticiais no cromossomo W. A maioria dos microcromossomos apresentaram sinais teloméricos. O cromossomo Z apresentou um sinal de hibridização em *P. tapera* e nenhum nas demais espécies. Em contraste, o cromossomo W exibiu acumulações de distintas sequências de microssatélites. O cromossomo W das andorinhas possui um tamanho elevado quando comparado à maioria dos Passeriformes. Quantidades tão significativas de sequências repetitivas podem explicar o aumento do tamanho dos cromossomos observados. Em suma, esses dados indicam o importante papel que sequências de microssatélites podem desempenhar na diferenciação de cromossomos sexuais. Em relação à pintura cromossômica comparativa, observou-se um mesmo padrão de hibridização para as

duas espécies de *Progne*, das quais demonstraram-se muito semelhantes ao cariótipo de *G. gallus*, exceto pela fissão cêntrica no primeiro par, como observada em outros Passeriformes. Embora *P. cyanoleuca* tenha demonstrado a mesma 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. A partir das análises sobre a organização cromossômica de *P. tapera*, *P. chalybea* e *P. cyanoleuca* foi possível observar algumas das mudanças cromossômicas que ocorreram durante a evolução cariotípica dessas espécies, das quais evidenciaram a proximidade entre as espécies *P. tapera* e *P. chalybea*.

Palavras-Chave: Aves, FISH, Citogenética, Microsatélites, Cromossomo W.

## ABSTRACT

Passeriformes is the largest order among the class Aves, comprising a huge diversity with more than 5000 species. Within this order is present the Hirundinidae family, of which the swallows belong, cosmopolitan birds that have substantially homogenous morphological characteristics. Despite the richness of species of Hirundinidae family, little is known about the genome organization of their members. Hence, the aim of this study was to analyze the chromosomal complement of species - *Progne tapera*, *Progne chalybea* and *Pygochelidon cyanoleuca*. The analyses were performed using Giemsa staining, C-banding, Ag-NOR, Fluorescent in situ hybridization (FISH) of eleven microsatellite sequences and two sets of probes (*Gallus gallus* e *Zenaida auriculata*). The three species analyzed showed 76 chromosomes with very similar morphologies, presenting differences only in the 5th, 6th and 7th chromosome pairs of *P. cyanoleuca*. Two chromosomal pairs bearing nucleolar organizer regions (NORs) were identified, showing an apomorphic condition for these species. The pattern of C-banding was the same found in most birds, areas of heterochromatin distributed mainly in the centromeric regions and W chromosome. Microsatellite sequences organization was similar in both species of *Progne*, while *P. cyanoleuca* presented a distinct pattern. Except for (CG) 15, all other 10 sequences produced hybridization signals. Repetitive DNA sequences were found in centromeric, pericentromeric, telomeric regions of the macrochromosomes and two interstitial blocks on the W chromosome. Most of the microchromosomes presented telomeric signals. The Z chromosome presented one hybridization signal in *P. tapera* and none in the other species. In contrast, W chromosome displayed the accumulation of distinct microsatellite sequences. The swallow W chromosome is larger when compared to most Passeriformes. Such high amounts of repetitive sequences may explain the observed chromosome size enlargement. In sum, these data indicate the significant role that microsatellite sequences may play in sex chromosome differentiation. Concerning comparative chromosome painting, it was observed the same hybridization pattern for the two *Progne* species, which was very similar to the *G. gallus* karyotype, except for the centric fission in the first pair, as found in other Passeriformes. Although *P. cyanoleuca* had demonstrated the same fission in the first pair of the ancestral syntenic (GGA1), it also contains a fusion with a microchromosome in the seventh pair, evidencing an extra chromosomal

rearrangement for this species. From the analysis on the chromosomal organization of *P. tapera*, *P. chalybea* and *P. cyanoleuca*, it was possible to observe some of the chromosomal changes that occurred during the karyotype evolution of these species, which showed the proximity between the species *P. tapera* and *P. chalybea*.

Keywords: Aves, FISH, Citogenetics, Microsatellites, W chromosome.

## LISTA DE FIGURAS

### MATERIAL E MÉTODOS

Figura 1 – Representação das espécies de andorinhas utilizadas neste estudo. *Progne chalybea* (A), *Progne tapera* (B) e *Pygochelidon cyanoleuca* (C).  
.....21

### RESULTADOS

Figura 2 – Cariótipos parciais de três fêmeas em coloração convencional (Giemsa). *P. tapera* (A), *P. chalybea* (B) e *P. cyanoleuca* (C).  
.....26

Figura 3 – Bandas C em metáfases mitóticas de três fêmeas. *P. tapera* (A), *P. chalybea* (B) e *P. cyanoleuca* (C). .....27

Figura 4 – Distribuição das regiões organizadoras de nucléolo (NOR) em metáfases de *P. tapera* (A), *P. chalybea* (B) e *P. cyanoleuca* (C). .....28

Figura 5 – Distribuição e localização das sequências de microssatélites nos pares de cromossomos 1-7, Z e W. *P. tapera* (A), *P. chalybea* (B) e *P. cyanoleuca* (C). ....29

Figura 6 – FISH de microssatélites em *P. tapera* (A-C), *P. chalybea* (D-F) e *P. cyanoleuca* (G-I). Os cromossomos foram corados com DAPI (azul) e as sondas de microssatélites foram marcadas com Cy3 (vermelho). Barra = 5 µm. ....30

Figura 7 – Experimentos de FISH utilizando sondas de *G. gallus* (GGA) e *Z. auriculata* (ZAU) hibridizadas em metáfases de *P. tapera* - PTA (A-C), *P. chalybea* - PCH (D-F) e *P. cyanoleuca* - PCY (G-I). As sondas são indicadas no canto inferior esquerdo de cada imagem, as sondas foram marcadas com biotina / Cy3 (vermelho) ou fluoresceína (verde). ....32

Figura 8 – Mapa de homologia entre GGA e três espécies representativas de andorinhas: *P. tapera* (A), *P. chalybea* (B), *P. cyanoleuca* (C). ....33

## LISTA DE TABELAS

### RESULTADOS

Tabela 1 – Morfologia cromossômica de três espécies de andorinhas.....	27
Tabela 2 – Distribuição das sequências de DNA repetitivo em três espécies da família Hirundinidae.....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu$ l - Microlitro

2n - Número diplóide

A - Acrocêntrico

Ba(OH)<sub>2</sub> - Hidróxido de bário

°C - Celsius

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

Cy3 - Cianina 3

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

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA - Ácido desoxirribonucleico

FISH - Hibridização *in situ* Fluorescente

HCl - Ácido clorídrico

KCl - Cloreto de potássio

M - Metacêntrico

ml - Mililitro

NOR - Região organizadora de nucléolo

PAK - Putative Avian Ancestral Karyotype

PTA - *Progne tapera*

PCH - *Progne chalybea*

PCY - *Pygochelidon cyanoleuca*

RPM - Rotação por minuto

RPMI - Roswell Park Memorial Institute Medium

SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SSC - Solução Salina de Citrato de Sódio

SM - Submetacêntrico

T - Telocêntrico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1 A citogenética clássica e o genoma das Aves.....	16
1.2 Pintura cromossômica.....	16
1.3 DNA repetitivo.....	17
1.4 A família Hirundinidae.....	18
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>19</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
3.1 Objetivo geral.....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
4.1 Coleta de espécimes.....	21
4.2 Preparações cromossômicas.....	21
4.3 Citogenética clássica.....	22
4.4 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	23
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A citogenética clássica e o genoma das aves

Em geral, os cariótipos de aves possuem um alto número diplóide ( $2n$ ) de aproximadamente 80, composto por vários pares de microcromossomos e apenas alguns pares de macrocromossomos (TEGELSTRÖM; RYTTMAN, 1981; SANTOS; GUNSKI, 2006). No entanto, esses números podem variar de  $2n=40$  para *Falco columbarius* à  $2n=136-142$  para *Corythaixoides concolor* (CHRISTIDIS, 1990; NISHIDA et al., 2008). Deste modo, podemos observar através da citogenética a versatilidade do material genético das aves.

As aves possuem um sistema sexual ZZ/ZW, no qual a fêmea é heterogamética e o macho homogamético. O cromossomo Z é relativamente conservado e em geral possui um tamanho maior que o cromossomo W (SCHARTL; SCHMID, 2016). Em contraste, o cromossomo W pode apresentar uma grande variação, é geralmente pequeno e heterocromático, como observado na maior parte dos Passeriformes (CORREIA et al., 2009; BARBOSA et al., 2013; DOS SANTOS et al., 2015).

Entre os vertebrados, sabe-se que as aves têm um genoma pequeno e com pouca quantidade de DNA repetitivo (SZARSKI, 1976; SCHMID et al., 2000; BURT, 2002; GREGORY, 2002; KASAI; O'BRIEN; FERGUSON-SMITH, 2012; ZHANG et al., 2014). Este tamanho reduzido pode estar relacionado a perda de sequências repetitivas, fragmentos de genes ou até mesmo genes inteiros (PRIMMER et al., 1997; ZHANG et al., 2014; KRETSCHMER; FERGUSON-SMITH; DE OLIVEIRA, 2018b).

Apesar da grande diversidade de espécies da Classe Aves, existem poucos estudos relacionados à citogenética desse grupo (SANTOS; GUNSKI, 2006; KRETSCHMER; FERGUSON-SMITH; DE OLIVEIRA, 2018b). Através da citogenética clássica é possível analisar a distribuição da heterocromatina constitutiva e dos sítios das regiões organizadoras de nucléolo, características importantes para estudos das relações evolutivas (BARBOSA et al., 2013; KRETSCHMER; FERGUSON-SMITH; DE OLIVEIRA, 2018b).

### 1.2 Pintura cromossômica

Atualmente existem cinco tipos de sondas cromossômicas de aves, são elas: *Gallus gallus* (GGA), *Burhinus oedicephalus* (BOE), *Leucopternis albicollis* (LAL), *Gyps fulvus* (GFU) e recentemente *Zenaidura macroura* (ZAU), que possui alto grau sintênico tanto com os macrocromossomos de *G. gallus* bem como do ancestral hipotético das aves (KRETSCHMER; FERGUSON-SMITH; DE OLIVEIRA, 2018b; KRETSCHMER et al., 2018c). No entanto, as sondas mais comuns utilizadas para análises no genoma das aves são *Gallus gallus* (GGA) e *Leucopternis albicollis* (LAL) (GRIFFIN et al., 2007; DE OLIVEIRA et al., 2010).

Nas últimas décadas, a pintura cromossômica comparativa tem sido aplicada para identificar homologias cromossômicas em espécies distintas (KRETSCHMER; FERGUSON-SMITH; DE OLIVEIRA, 2018b). Esta técnica demonstrou-se muito eficiente para estudos de evolução cariotípica e biológica (FERGUSON-SMITH et al., 2005; ELLEGREN, 2010). A utilização dessas sondas em Passeriformes revelaram uma fissão e numerosas inversões no primeiro par de cromossomos autossômicos do ancestral sintênico (GGA1), das quais estavam presentes em todas as espécies pertencentes a esta ordem analisadas por hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (KRETSCHMER et al., 2014, 2015; DOS SANTOS et al., 2015, 2017; KRETSCHMER; FERGUSON-SMITH; DE OLIVEIRA, 2018b). No entanto, além da fissão do GGA1 foram observadas diferentes rearranjos cromossômicos em diversas espécies de aves (KRETSCHMER; FERGUSON-SMITH; DE OLIVEIRA, 2018b).

### 1.3 DNA repetitivo

O DNA repetitivo é formado por sequências idênticas ou muito semelhantes, dispostas lado a lado (*tandem*) ou distribuídas no genoma (MARTINS et al., 2010). Estas sequências podem ser funcionais ou não codificantes e podem ser classificadas em satélites, minissatélites, microssatélites, elementos transponíveis e famílias multigênicas (JURKA et al., 2005). Os microssatélites são uma classe de elementos repetitivos de pequenas sequências que consistem de 1 a 6 pares de bases, podendo estar associadas às áreas heterocromáticas ou eucromáticas (MARTINS, 2007).

As sequências repetitivas podem causar variações genéticas, além de contribuir com diferentes funções no genoma e na diferenciação de cromossomos

sexuais (CIOFFI et al., 2010; POKORNÁ; KRATOCHVÍL; KEJNOVSKÝ, 2011; YANO et al., 2014). Apesar da baixa densidade de elementos repetitivos no genoma das aves, estudos demonstram que sequências repetitivas como microssatélites desempenham inúmeras funções na evolução das espécies. Rearranjos cromossômicos tais como duplicações, deleções, inversões, translocações e em algumas alterações cariotípicas podem estar relacionados a presença dessas sequências (KIDWELL, 2002).

Recentemente, estudos utilizando sondas de microssatélites em algumas espécies das famílias Columbidae, Picidae e Psittacidae mostraram a importância desses elementos na organização do genoma, bem como na diferenciação cromossômica sexual desses indivíduos (FURO et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2017; KRETSCHMER et al., 2018a).

### **1.3 A família Hirundinidae**

Hirundinidae (Aves: Passeriformes), comumente conhecida como a família das andorinhas, compreende um grande número de espécies (DICKINSON, 2003; SHELDON et al., 2005). As andorinhas 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 um local seguro para ficar durante essa estação (SIGRIST, 2013). Esta família é dividida em dois clados, Pseudochelidoninae e Hirundininae, compreendendo 84 espécies, onde aproximadamente 19 delas podem ser facilmente encontradas na América Central e na América do Sul (TURNER; ROSE, 1989; SHELDON et al., 2005).

Apesar dos recentes 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. Estudos citogenéticos nesta família são extremamente limitados e até o momento, apenas 10% das espécies de andorinhas tiveram seu cariótipo descrito por coloração convencional (HOOPER; PRICE, 2017).

## 2 Justificativa

Análises citogenéticas principalmente na área da genômica têm fornecido novas evidências quanto às características tanto dos cromossomos autossômicos como dos sexuais. Sabe-se que apesar de conservados, os macrocromossomos das aves evoluem através de rearranjos cromossômicos. As espécies da família Hirundinidae possuem uma filogenia praticamente estabelecida, porém ainda despertam dúvidas sobre às relações taxonômicas existentes entre algumas espécies, como as do gênero *Progne*. Além disso, as andorinhas possuem características cromossômicas interessantes, como o tamanho elevado do cromossomo sexual W, quando comparado com a maioria dos Passeriformes. Assim, o estudo citogenético de espécies pertencentes à família Hirundinidae faz-se necessário, pois através deles será possível descrever alguns dos mecanismos envolvidos na evolução cariotípica, dos quais poderão auxiliar na taxonomia e filogenia desses animais.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Identificar os rearranjos cromossômicos ocorridos ao longo da evolução cariotípica em espécies da família Hirundinidae (Aves: Passeriformes).

#### 3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o cariótipo e o número diplóide de três espécies da família Hirundinidae através da coloração convencional (Giemsa);
- Determinar o padrão de bandas C, NOR's e proceder às análises comparativas;
- Identificar homologias utilizando sondas cromossômicas de *Gallus gallus* (GGA) e de *Zenaida auriculata* (ZAU);
- Analisar a distribuição das sequências de DNA repetitivo fazendo uso de sondas de 11 microssatélites.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta de espécimes

Doze exemplares de andorinhas foram analisados no presente estudo: três fêmeas e dois machos de *P. chalybea*, duas fêmeas e dois machos de *P. tapera* e três fêmeas de *P. cyanoleuca* (Figura 1), todos 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).

Figura 1 - Representação das espécies de andorinhas utilizadas neste estudo. *Progne chalybea* (A), *Progne tapera* (B) e *Pygochelidon cyanoleuca* (C).



Fonte: Adaptado de Wikiaves (2018).

### 4.2 Preparações cromossômicas

Os cromossomos foram obtidos a partir de cultura direta de medula óssea de curta duração e cultura de fibroblastos. A cultura de medula óssea foi realizada de acordo com Garnero e Gunski (2000). O procedimento requer a retirada da medula óssea do fêmur do exemplar com o auxílio de uma seringa hipodérmica com agulha, em meio RPMI em placa de Petri, a mesma foi dissociada com auxílio de seringa sem a agulha, o material foi transferido para um tubo de centrifuga e incubado com colchicina (0,05%) por 1h em banho maria a 37°C, logo após o material foi centrifugado por 8 minutos a 1000 rpm, descartou-se o sobrenadante e as células sedimentadas foram tratadas com solução hipotônica (KCl, 0,075M) por 15 minutos a 37°C, em seguida foram acrescentadas algumas (3-5) gotas de fixador (metanol e

ácido acético na proporção 3:1) ao tubo. O material foi ressuspensionado cuidadosamente e centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm, o sobrenadante foi retirado, acrescentou-se 5-8ml de fixador e ressuspensionou-se o material seguido de centrifugação por 10 minutos a 1000 rpm, este processo foi realizado 3 vezes e a amostra armazenada em freezer até o momento do uso.

Para a cultura de fibroblastos, primeiramente realizou-se biópsia de tecidos dos espécimes segundo Sasaki, Ikeuchi e Makino (1968), onde foram lavadas com solução salina (Hank's) e fracionadas em uma placa de petri. Em seguida, foram colocadas em um tubo de centrífuga de 15 ml e incubadas em 4 ml de colagenase tipo IV, por um período de 1 hora em estufa a 37°C, para a dissociação das células. Após, foi acrescentado 5 ml de meio DMEM e centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm. O material sedimentado foi transferido para garrafas de cultura contendo 8ml de meio DMEM acrescido de antibióticos e fungicida e 2 ml soro bovino fetal. Quando as garrafas apresentavam um nível ótimo de crescimento celular, a partir de análises no invertoscópio, foram adicionados 100 µl de colchicina. Após incubação por 1 hora em estufa a 37°C, as células foram soltas da garrafa com auxílio de solução de tripsina EDTA 0,25% e transferidas para um tubo de centrífuga. Posteriormente, o material foi centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm, descartou-se o sobrenadante e as células sedimentadas foram tratadas com solução hipotônica (KCl, 0,075M) por 10 minutos a 37°C, em seguida foram acrescentadas 3-5 gotas de fixador (metanol e ácido acético na proporção 3:1) ao tubo. O material foi ressuspensionado cuidadosamente e centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm, e o sobrenadante foi retirado, acrescentou-se 8 ml de fixador e após ressuspensão o material foi centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm, este processo foi realizado 3 vezes e o pellet armazenado em freezer até o momento do uso.

### **4.3 Citogenética clássica**

As análises foram realizadas com a utilização de lâminas novas e lavadas, nas quais as amostras foram ressuspensionadas em seus devidos tubos, com o auxílio de pipetas de Pasteur, das quais pingada uma gota de material por lâmina a cerca de 30 - 40 cm de altura da mesma, deixando-a secar a temperatura ambiente.

Para a coloração convencional, as lâminas foram coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato por 5 minutos, lavadas com água destilada e secadas ao ar,

foram observadas em microscópio óptico, contado o número diplóide e desenhadas cerca de 30 metáfases de cada exemplar. As melhores metáfases foram fotografadas, a partir destas imagens foi realizada a biometria cromossômica com o auxílio do software Micromeasure e realizada a montagem dos cariótipos.

As regiões heterocromáticas foram identificadas de acordo com Ledesma et al. (2002) com modificações. Essa técnica consiste em um tratamento com soluções ácidas e alcalinas, seguindo o tratamento com solução salina concentrada (2SSC) e coloração com Giemsa (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2001). O intuito dessa técnica é corar diferencialmente regiões específicas em que o cromossomo apresenta DNA altamente condensado, como nas regiões dos centrômeros e em outras regiões do genoma como cromossomos heteromórficos dos sistemas sexuais, que correspondem à heterocromatina constitutiva, motivo de sua denominação. Primeiramente as melhores metáfases foram fotografadas em coloração com Giemsa, removeu-se o óleo de imersão com o auxílio de Xilol e o Giemsa com auxílio de Fixador (3:1), e então, as lâminas foram submetidas ao tratamento com HCl e Ba(OH)<sub>2</sub>. As lâminas foram incubadas em HCl 0,2 N à temperatura ambiente por 10 minutos, logo lavadas em água destilada e mergulhadas em Hidróxido de Bário (50%) à 37°C durante 13 minutos. Após a incubação, as lâminas foram mergulhadas em HCl 0,01 N à temperatura ambiente por 2 minutos e lavadas em água destilada. Subsequentemente, as lâminas foram incubadas em 2 x SSC à 60°C por 1 hora e coradas em solução de Giemsa por 10 minutos, lavadas com água destilada e analisadas em microscópio óptico. Os melhores resultados foram obtidos com lâminas envelhecidas por mais de sete dias em temperatura ambiente. Ao final do procedimento, as melhores metáfases foram fotografadas e analisadas.

As regiões organizadoras de nucléolo foram detectadas pelo uso de nitrato de prata e solução coloidal de acordo com o protocolo de Howell e Black (1980).

#### **4.4 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)**

Para os experimentos com sondas de microssatélites utilizou-se o protocolo de Kubat et al. (2008) com modificações. Empregou-se 11 distintas sequências de microssatélites: (CA)<sub>15</sub>, (CAA)<sub>10</sub>, (CAC)<sub>10</sub>, (CAG)<sub>10</sub>, (CAT)<sub>10</sub>, (CGG)<sub>10</sub>, (CG)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub>,

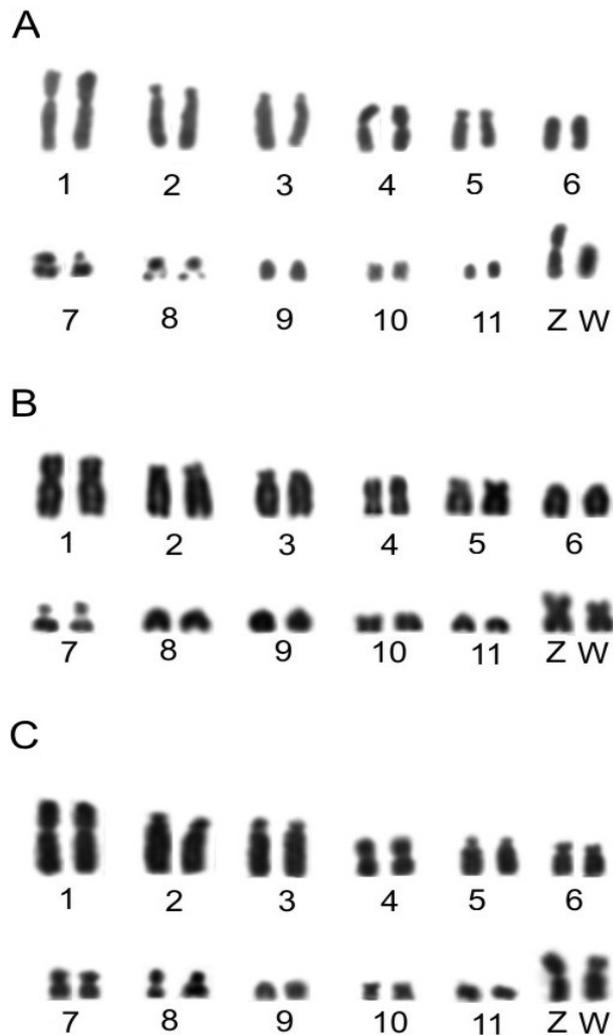
(GAA)<sub>10</sub>, (GAC)<sub>10</sub> and (TA)<sub>15</sub>, das quais foram marcadas com Cy3 durante a síntese. As lâminas com os cromossomos fixados foram envelhecidas em estufa a 37°C por 1 hora e em estufa a 60°C por 30 minutos. Logo após as lâminas foram tratadas com 200µL de ribonuclease (10µg/ml) em câmara úmida por 1 hora a 37°C e incubadas 3 vezes em 2xSSC por 5 minutos cada, em seguida incubadas em pepsina 0,005% por 10 minutos em temperatura ambiente repetindo-se o tratamento em 2xSSC. Em sequência, foram incubadas em formaldeído 1% por 10 minutos e novamente 3 vezes em 2xSSC. Posteriormente foram desidratadas em uma série de etanol 70%, 90% e 100% por 2 minutos em cada e secas em temperatura ambiente. Depois de secas foram desnaturadas em formamida 70% por 3 minutos a 72°C, imediatamente desidratadas em etanol 70%, 90% e 100% por 2 minutos cada. As sondas foram desnaturadas à 80°C por 10 minutos e transferidas imediatamente para o gelo. Após aspergiu-se 15µl de sonda sobre cada lâmina, foram vedadas com lamínula e cola sintética e incubou-se em câmara úmida e escura em estufa a 37°C overnight. As lamínulas foram retiradas cuidadosamente e as lâminas foram incubadas 2 vezes em 2xSSC por 5 minutos e 2 vezes em 1xSSC por 5 minutos, logo após lavadas em PBS e desidratadas em etanol 70%, 90% e 100% por 2 minutos cada. Após as lâminas foram montadas com 20µl de DAPI+anti-fade e analisadas em microscópio fluorescente. A pintura cromossômica foi realizada através da utilização de dois conjuntos de sondas: *Zenaida auriculata* (ZAU1 - 8 e Z) e *Gallus gallus* (GGA9-10). Os protocolos para hibridização foram realizados conforme descrito em Oliveira et al. (2010). Pingou-se uma gota da preparação cromossômica no centro de cada lâmina (15µL), em seguida as lâminas foram imersas em solução de Pepsina por 3 minutos e lavadas em 2xSSC por 5 minutos. Após, foram incubadas em estufa a 65°C por 1 hora. As mesmas foram desnaturadas em Formamida 70% a 73°C por 1 minuto e 30 segundos, em etanol 70% gelado por 4 minutos, e em seguida foram desidratadas em séries com Etanol 70% a temperatura ambiente por 4 minutos, Etanol 90% a temperatura ambiente por 2 minutos e Etanol 100% a temperatura ambiente por 4 minutos. Após os procedimentos as lâminas secaram em temperatura ambiente. Pingaram-se sobre as lâminas 15µL de tampão de hibridização contendo a sonda previamente desnaturada (10 minutos a 73°C e 30 minutos na estufa a 37°C), onde foram colocadas lamínulas sobre as lâminas que foram seladas com cola plástica e incubadas por 72 horas em estufa a a 37°C. Retirou-se as lamínulas e as lâminas foram lavadas duas vezes em Formamida (50%) por 5 minutos a 44°C. Para etapa

de detecção da sonda, pingou-se 100µL de solução de detecção em cada lâmina que foram cobertas com parafilme e colocadas na estufa a 37°C por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em Tween por 5 minutos e pingou-se 10µL de DAPI sobre cada lâmina que foram cobertas por lâminulas e vedadas com esmalte natural. Por fim, os resultados do FISH foram examinados por microscopia fluorescente.

## 5 Resultados

Em todas as espécies analisadas, encontrou-se  $2n = 76$ . A morfologia dos cromossomos em *P. tapera* e *P. chalybea* apresentaram as mesmas características, incluindo o par de cromossomos sexuais (Figura 2A, B e Tabela 1), no entanto foi observada uma constrição secundária no 8º par em *P. tapera*. Em contraste, *P. cyanoleuca* possui algumas diferenças morfológicas quando comparadas às outras duas espécies, especificamente nos 5º, 6º e 7º pares de macrocromossomos (Figura 1C e tabela 1). A biometria e a morfologia dos cromossomos das espécies de andorinhas estão descritas na tabela 1.

Figura 2 - Cariótipos parciais de três fêmeas em coloração convencional (Giemsa). *P. tapera* (A), *P. chalybea* (B) e *P. cyanoleuca* (C).



Fonte: Elaborada pela autora desta pesquisa.

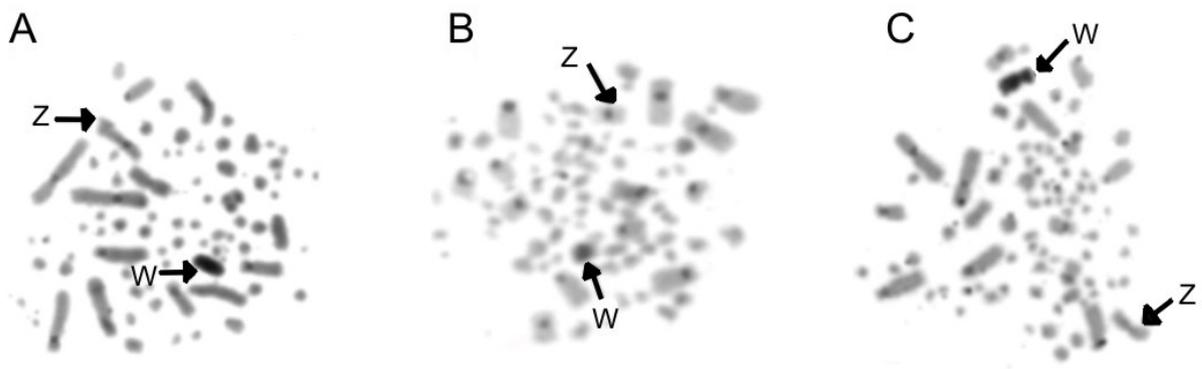
Tabela 1 - Morfologia cromossômica de três espécies de andorinhas.

Par cromossômico	<i>Progne tapera</i>				<i>Progne chalybea</i>				<i>Pygochelidon cyanoleuca</i>			
	Braço curto	Braço longo	CI	Morfologia	Braço curto	Braço longo	CI	Morfologia	Braço curto	Braço longo	CI	Morfologia
1°	30	45	40.00	SM	13.5	20.5	39.71	SM	21	32	39.62	SM
2°	14.5	48.5	23.02	A	15	47	24.19	A	11	33.5	24.72	A
3°	12	48	20.00	A	9	28	24.32	A	11	33	25.00	A
4°	24	27.5	46.60	M	14.5	14	50.88	M	17	17	50.00	M
5°	13.5	27.5	32.93	SM	10	15	40.00	SM	8	24	25.00	A
6°	0	27	0.00	T	0	20.5	0.00	T	12	27	30.77	SM
7°	0	26	0.00	T	0	17	0.00	T	11	16	40.74	M
8°	0	24	0.00	T	0	12	0.00	T	0	18.5	0.00	T
9°	0	22	0.00	T	0	11	0.00	T	0	15	0.00	T
10°	11	11	50.00	M	7	7	50.00	M	7	7	50.00	M
11°	0	14.5	0.00	T	0	9	0.00	T	0	11	0.00	T
Z	27	30	47.37	M	13	13	50.00	M	18	20	47.37	M
W	11	27	28.95	SM	8	12	40.00	SM	14	22	38.89	SM

CI = Índice centromérico, M = metacêntrico, SM = submetacêntrico, A = acrocêntrico, T = telocêntrico.  
 Fonte: Elaborada pela autora desta pesquisa.

Análises de bandeamento C apresentaram heterocromatina constitutiva em regiões centroméricas dos macrocromossomos e em alguns microcromossomos (Figura 3A - C). O cromossomo sexual Z possui morfologia metacêntrica com tamanho entre o 3° e 4° pares nestas espécies. Em contraste, o cromossomo W é na maior parte heterocromático, submetacêntrico para as três espécies e seu tamanho varia entre os 5° e 6° pares em *P. tapera*, 6° e 7° pares em *P. chalybea* e 3° e 4° pares em *P. cyanoleuca*.

Figura 3 - Bandas C em metáfases mitóticas de três fêmeas. *P. tapera* (A), *P. chalybea* (B) e *P. cyanoleuca* (C).

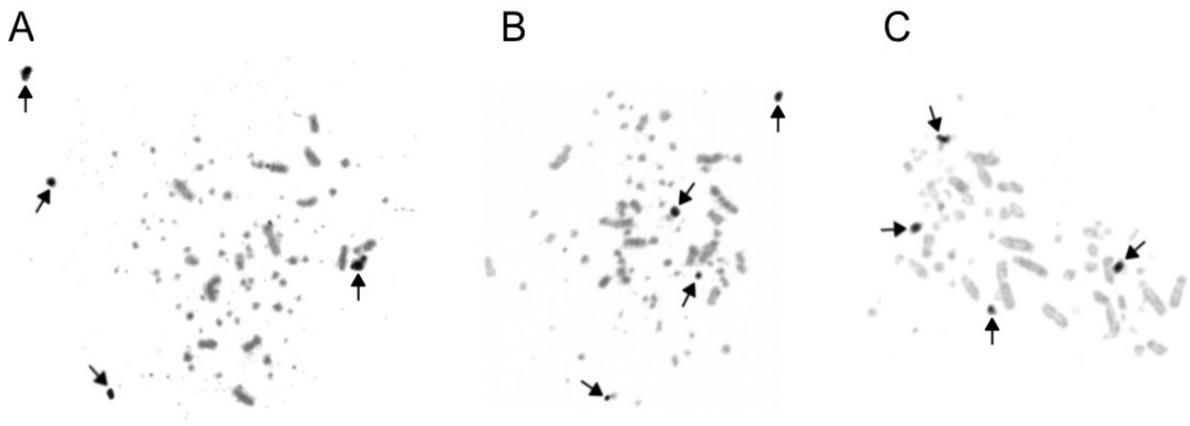


Fonte: Elaborada pela autora desta pesquisa.

As regiões organizadoras de nucléolo foram observadas em dois pares cromossômicos em todas as espécies analisadas, demonstrando diferentes localizações (Figura 4A - C). Em *P. chalybea*, Ag-NORs localizam-se em um par de microcromossomos e no 7° par de macrocromossomos (Figura 4B). Por outro lado,

*P. tapera* e *P. cyanoleuca* apresentaram as Ag-NORs em dois pares de macrocromossomos (Figura 4A e C), mais especificamente, no 7º e 8º pares.

Figura 4 - Distribuição das regiões organizadoras de nucléolo (NOR) em metáfases de *P. tapera* (A), *P. chalybea* (B) e *P. cyanoleuca* (C).



Fonte: Elaborada pela autora desta pesquisa.

Dos onze microssatélites utilizados neste estudo, nove deles apresentaram sinais claros de hibridização em *P. tapera*, dez em *P. chalybea* e oito em *P. cyanoleuca* (Tabela 2). Apenas a sequência de microssatélite (CG)<sub>15</sub> não demonstrou sinais de hibridização em nenhuma das espécies analisadas.

Tabela 2 - Distribuição das sequências de DNA repetitivo em três espécies de Hirundinidae.

Sondas	Cromossomos											
	Macrocromossomos			Microcromossomos			Z			W		
	PTA	PCH	PCY	PTA	PCH	PCY	PTA	PCH	PCY	PTA	PCH	PCY
(GAA) <sub>10</sub>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
(GAC) <sub>10</sub>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
(GA) <sub>15</sub>	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
(CG) <sub>15</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(TA) <sub>15</sub>	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
(CAG) <sub>10</sub>	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
(CGG) <sub>10</sub>	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
(CAC) <sub>10</sub>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
(CAT) <sub>10</sub>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
(CA) <sub>15</sub>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
(CAA) <sub>10</sub>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+

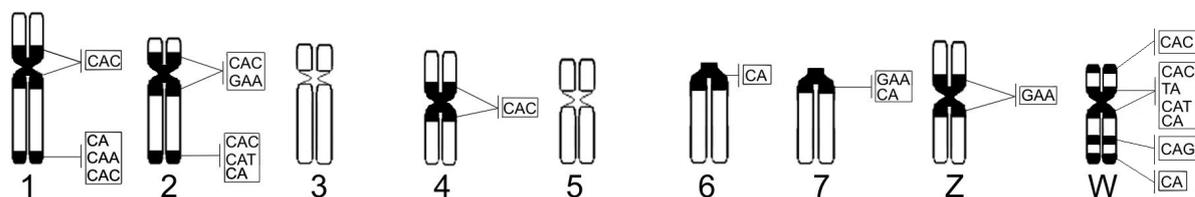
(+) Sinais positivos de hibridização; (-) Sinais negativos de hibridização; (PTA) *P. tapera*; (PCH) *P. chalybea*; (PCY) *P. cyanoleuca*.

Fonte: Elaborada pela autora desta pesquisa.

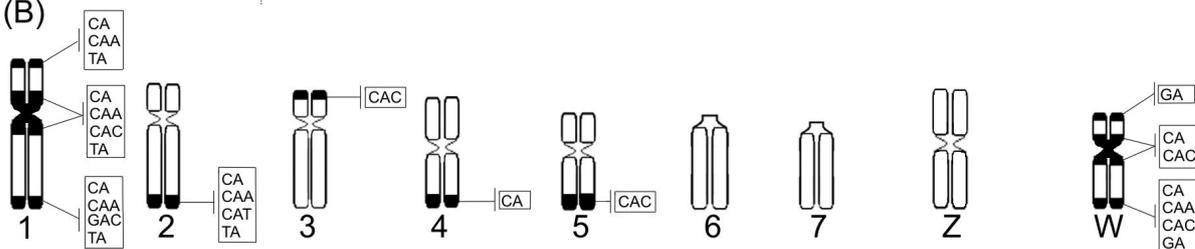
As andorinhas apresentaram distintos padrões de hibridização em macrocromossomos. Os microssatélites exibiram sinais nas regiões pericentroméricas, centroméricas e teloméricas desses cromossomos (Figuras 5A - C e 6A, B, C, D, E, G, H, I). Apenas dois blocos intersticiais foram observados, um da sequência (CAG)<sub>10</sub> em *P. tapera* e (CAT)<sub>10</sub> em *P. cyanoleuca*, ambos no braço longo do cromossomo W (Figura 5A e C).

Figura 5 - Distribuição e localização das sequências de microssatélites nos pares de cromossomos 1-7, Z e W. *P. tapera* (A), *P. chalybea* (B) e *P. cyanoleuca* (C).

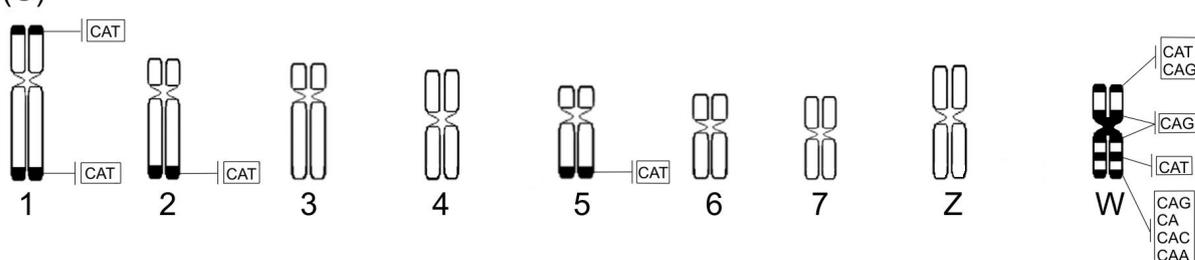
(A)



(B)

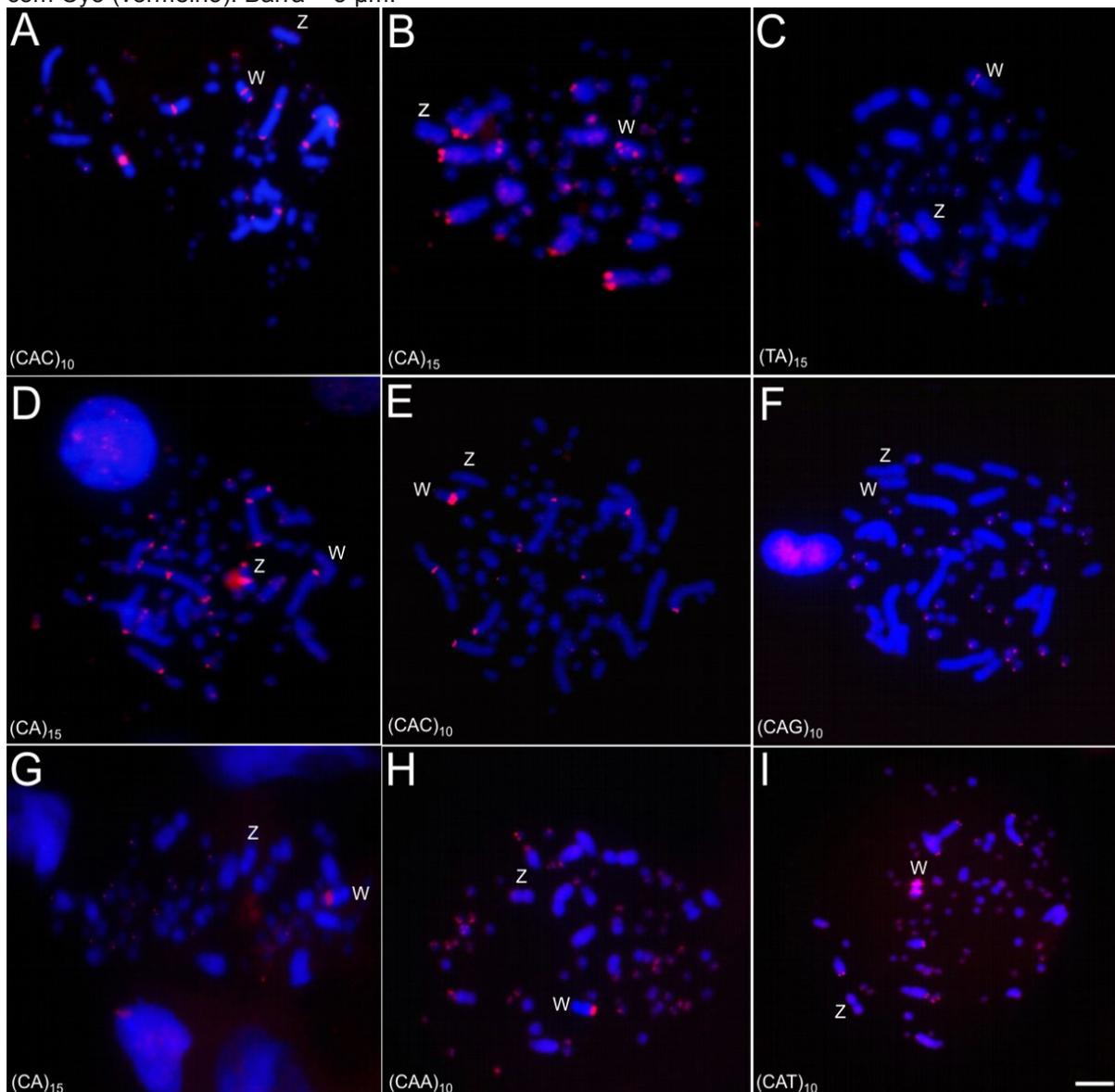


(C)



Fonte: Elaborada pela autora desta pesquisa.

Figura 6 - FISH de microssatélites por em *P. tapera* (A-C), *P. chalybea* (D-F) e *P. cyanoleuca* (G-I). Os cromossomos foram corados com DAPI (azul) e as sondas de microssatélites foram marcadas com Cy3 (vermelho). Barra = 5  $\mu$ m.



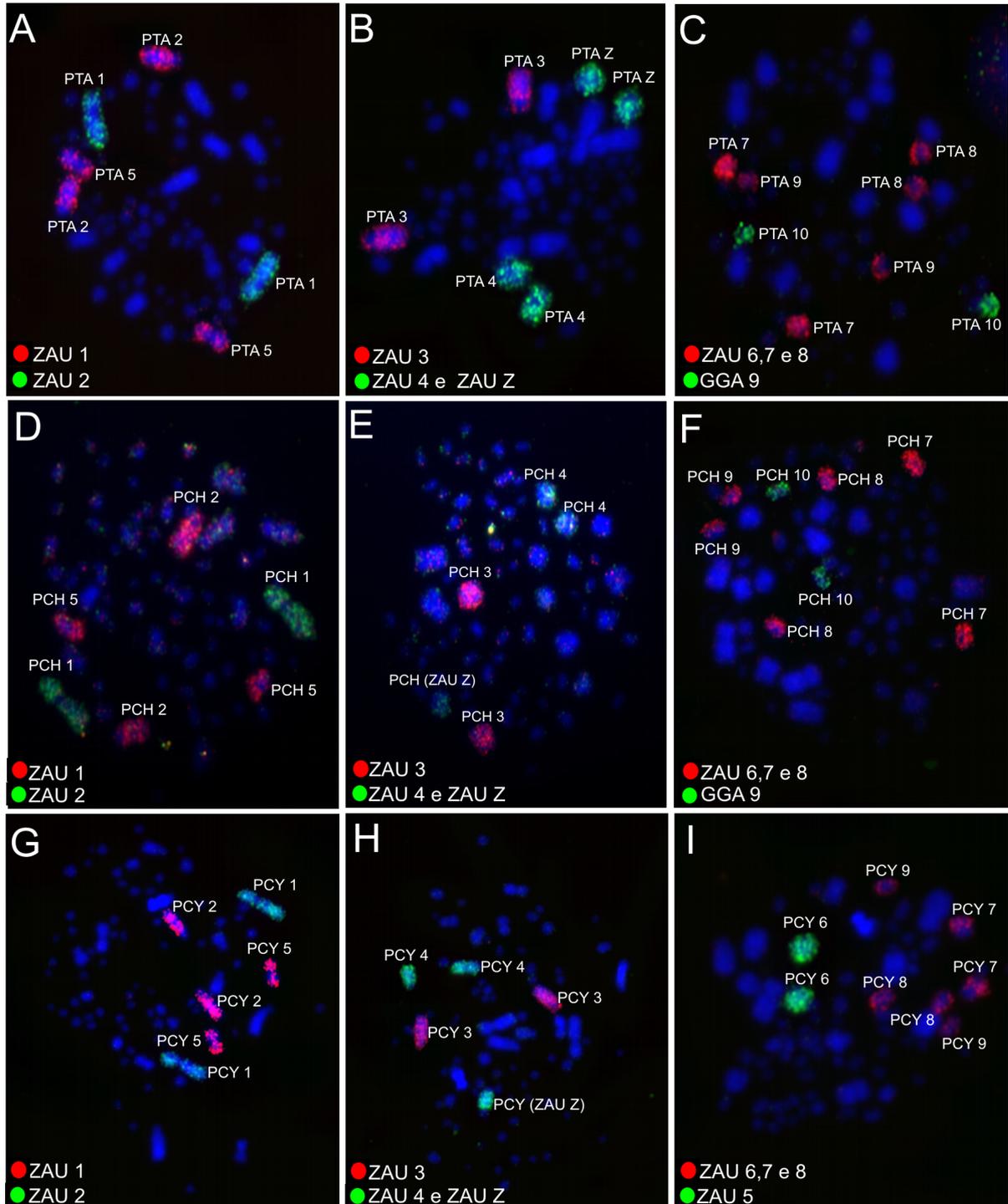
Fonte: Elaborada pela autora desta pesquisa.

O acúmulo de microssatélites em regiões pericentoméricas e centroméricas pode ser observado nos pares 1, 2, 4, 6, 7 e cromossomo Z em *P. tapera*, par 1 em *P. chalybea*, enquanto que apenas o cromossomo W apresentou este padrão de acumulação em *P. cyanoleuca* (Figura 5A - C). Sinais teloméricos estavam presentes nos pares de macrocromossomos 1 e 2 em *P. tapera*, pares 1, 2, 3, 4 e 5 em *P. chalybea*, enquanto *P. cyanoleuca* mostrou este padrão de distribuição nos pares 1, 2 e 5 (Figura 5A - C). A sequência  $(GAA)_{10}$  apresentou acúmulo preferencial em regiões heterocromáticas.

As sequências de microssatélites apresentaram sinais teloméricos de hibridização na maioria dos microcromossomos. Diferentemente do cromossomo W, que demonstrou ampla gama de sinais de microssatélites, apenas a sequência (GAA)<sub>10</sub> foi encontrada no cromossomo Z (Figura 5A). O cromossomo W apresentou sinais pericentroméricos, centroméricos e teloméricos nas três espécies amostradas (Figura 5A - C).

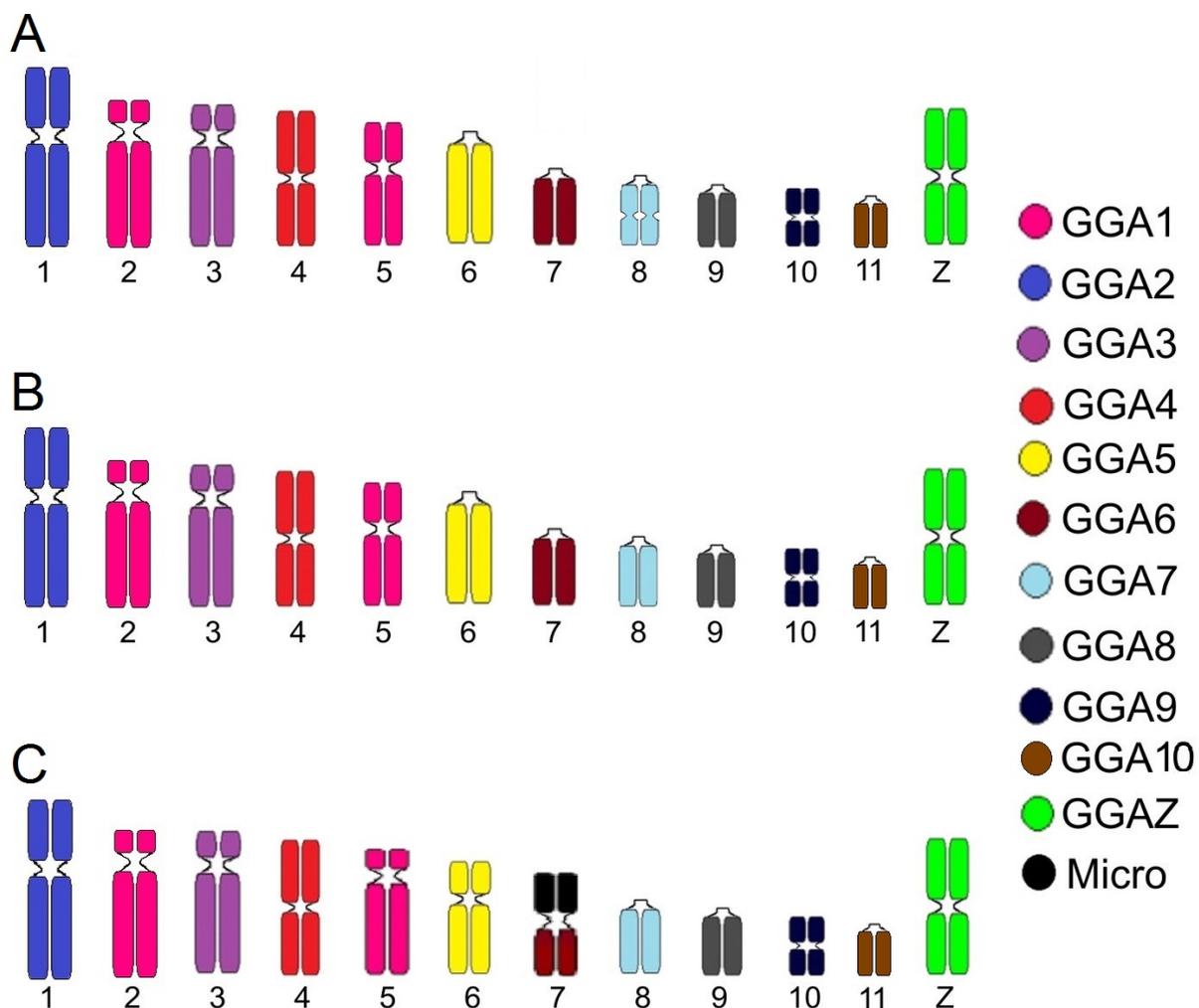
Experimentos utilizando sondas GGA e ZAU evidenciaram a conservação de alguns grupos sintênicos em andorinhas. ZAU1 hibridizou no segundo e quinto pares de cromossomos, enquanto ZAU2 demonstrou sinais de hibridização apenas no primeiro par cromossômico nas três espécies de andorinhas (Figura 7A, D e G). Os padrões de hibridização usando as sondas GGA e ZAU foram os mesmos para *P. tapera* e *P. chalybea*. 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 das andorinhas (Figura 8A - C). *P. cyanoleuca* exibiu um padrão de hibridização muito semelhante, exceto pelo sétimo par de cromossomos, que contém uma fusão com um microcromossomo (Figura 7I e 8C).

Figura 7 - Experimentos de FISH utilizando sondas de *G. gallus* (GGA) e *Z. auriculata* (ZAU) hibridizadas em metáfases de *P. tapera* - PTA (A-C), *P. chalybea* - PCH (D-F) e *P. cyanoleuca* - PCY (G-I). As sondas são indicadas no canto inferior esquerdo de cada imagem, as sondas foram marcadas com biotina / Cy3 (vermelho) ou fluoresceína (verde).



Fonte: Elaborada pela autora desta pesquisa.

Figura 8 - Mapa de homologia entre GGA e três espécies representativas de andorinhas: *P. tapera* (A), *P. chalybea* (B) e *P. cyanoleuca* (C).



Fonte: Elaborada pela autora desta pesquisa.

## 6 DISCUSSÃO

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, os cromossomos W dessas três espécies diferiram do padrão geral observado, considerando que as andorinhas apresentaram um cromossomo W relativamente grande quando comparado com a maioria dos Passeriformes (BERLIN; ELLEGREN, 2004; CHEN et al, 2012; ZHANG et al, 2014).

Análises de bandas C revelaram acúmulo preferencial de heterocromatina constitutiva em regiões centroméricas dos macrocromossomos e alguns microcromossomos nas três espécies. Esse padrão de bandas C também foi encontrado em outras espécies de Passeriformes, bem como em *Ramphocelus carbo*, *Tangara cayana* (CORREIA et al., 2009) e em duas espécies do gênero *Turdus* (KRETSCHMER et al., 2014).

A maioria das espécies de aves apresenta apenas um par de microcromossomos portadores de NOR (GARNERO; LEDESMA; GUNSKI, 2006; NISHIDA-UMEHARA et al., 2007; KRETSCHMER et al., 2014). Entretanto, as três espécies de andorinhas analisadas possuem dois pares de NORs, representando uma condição apomórfica, que também foi observada em *Elaenia spectabilis* (Passeriformes) (KRETSCHMER et al., 2015).

Embora o número de sequências repetitivas em genomas de 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., 2018a). Dos onze microssatélites utilizados nas andorinhas, apenas a sequência (CG)<sub>15</sub> não hibridizou em nenhuma delas, demonstrando que o acúmulo dessas sequências pode ser revelado através das técnicas de FISH.

O DNA repetitivo estava presente tanto nos macrocromossomos, como nos cromossomos sexuais e microcromossomos, demonstrando variação das sequências e posição em cada espécie de andorinha. No entanto, *P. tapera* e *P. chalybea* compartilharam mais sequências entre si quando comparadas com *P. cyanoleuca*. Sequências como (CA)<sub>15</sub>, (CAA)<sub>10</sub> e (CAC)<sub>10</sub> estão acumuladas no primeiro par de macrocromossomos em *P. tapera* e *P. chalybea*, enquanto que em

*P. cyanoleuca* foi observado um cenário distinto. Assim, do ponto de vista filogenético, as sequências (CA)<sub>15</sub>, (CAA)<sub>10</sub> e (CAC)<sub>10</sub>, podem ser consideradas características sinapomórficas para as duas espécies de *Progne*.

O acúmulo de microssatélites foi observado nos cromossomos W das três espécies, que demonstram um tamanho elevado quando comparados com a maioria dos 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 animais (SCHARTL; SCHMID, 2016). Por exemplo, 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*, *P. chalybea* e *P. cyanoleuca* é quase inteiramente heterocromático. Estes resultados corroboram com estudos que demonstram que os DNAs repetitivos tendem a se concentrar em áreas de heterocromatina constitutiva de muitos organismos (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)<sub>10</sub> hibridizou no cromossomo Z em *P. tapera*, da qual o sinal estava associado à região de heterocromatina constitutiva. Um cenário semelhante a este foi observado em nove espécies de Columbidae, das quais não demonstraram nenhum sinal de hibridização no cromossomo Z (KRETSCHMER et al., 2018a).

A espécie *P. tapera* foi previamente separada em um gênero monotípico denominado *Phaeoprogne*, enquanto o gênero *Progne* compreendia todas as outras oito espécies de *Progne* (SYBLEY; MONROE, 1990). Esta divisão ocorreu devido às diferenças morfológicas e genéticas entre *P. tapera* e as outras espécies de *Progne* (SYBLEY; MONROE, 1990; SHELDON et al., 2005; MOYLE et al., 2008). No entanto, as classificações atuais colocam essas 9 espécies em um único gênero (AOU, 1998; DICKINSON et al., 2003; SHELDON et al., 2005). Alguns estudos concordam com a filogenia atual, onde *P. tapera* está como membro do gênero *Progne* (SHELDON et al., 2005; MOYLE et al., 2008). De fato, observamos que *P. tapera* e *P. chalybea* apresentam a mesma morfologia cariotípica, compartilham semelhantes sequências de microssatélites e o mesmo padrão de pintura

cromossômica. Juntos, esses estudos dão suporte a atual filogenia da família Hirundinidae (SHELDON et al., 2005; MOYLE et al., 2008).

O genoma de *G. gallus* é bem conhecido e foi um dos primeiros genomas de vertebrados sequenciados (INTERNATIONAL CHICKEN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2004). Sondas de GGA são amplamente utilizadas na pintura cromossômica de aves, devido à sua semelhança com o cariótipo ancestral hipotético (GUTTENBACH et al., 2003; DERJUSHEVA et al., 2004; NANDA et al., 2006). 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., 2018c).

As principais diferenças encontradas quando comparadas ao suposto cariótipo ancestral das aves (PAK) é a fissão no primeiro par de cromossomos em dois pares distintos de macrocromossomos nas três espécies, uma fusão no quarto par cromossômico (PAK 4 + PAK 10) e a fusão de um microcromossomo no sétimo par de *P. cyanoleuca* (GRIFFIN et al., 2007). 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; FERGUSON-SMITH; DE OLIVEIRA, 2018b).

Dentre as andorinhas analisadas através da pintura cromossômica, foi observado apenas um rearranjo intercromossômico extra, trata-se de uma fusão com um par de microcromossomos em *P. cyanoleuca*. A 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).

## 7 CONCLUSÃO

A partir do estudo realizado podemos observar que as espécies de *Progne* possuem alta similaridade quanto ao seu complemento cromossômico. Desta forma, os dados citogenéticos obtidos corroboram com a filogenia atual dessas espécies, da qual agrupa *P. tapera* e *P. chalybea* em um mesmo gênero.

É notável que o cromossomo W das andorinhas encontra-se em estado de acúmulo de sequências microssatélites e heterocromatina por toda sua extensão, podendo ser resultado de diferentes mecanismos de resposta às pressões evolutivas que levaram esse 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.

Em suma, através das análises de pintura cromossômica foi possível identificar homologias entre as espécies, fornecendo dados sobre os mecanismos envolvidos na evolução dos cariótipos de três espécies pertencentes a família Hirundinidae, tais como a fusão encontrada em *P. cyanoleuca*, esclarecendo um pouco mais as relações entre as andorinhas.

## 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.
- 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.
- BURT, D. W. Origin and evolution of avian microchromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 96, n. 1-4, p. 97–112, 2002.
- CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2001.
- CHEN, N. et al. Identification of avian W-linked contigs by short-read sequencing. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 183, 2012.
- CHRISTIDIS, L. **Aves**. 4.ed. United States: Balogh Scientific Books, 1990.
- CIOFFI, M. B. et al. Differentiation of the XY sex chromosomes in the fish *hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae): Unusual accumulation of repetitive sequences on the X chromosome. **Sexual Development**, v. 4, n. 3, p. 176–185, 2010.
- CORREIA, C. V. S. et al. Alta similaridade cariotípica na família Emberezidae (Aves: Passeriformes). **Journal of Biosciences**, v. 25, n. 2, p. 99–111, 2009.
- DE OLIVEIRA E. H. 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 FURO, I. et al. Chromosomal diversity and karyotype evolution in South American macaws (Psittaciformes, Psittacidae). **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0130157, 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, n. 3, p. 151-160, 2017.
- 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.
- DERJUSHEVA S. et al. High chromosome conservation detected by comparative chromosome painting in chicken, pigeon and passerine birds. **Chromosome Research**, v. 12, n. 7, p. 715–723, 2004.

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. 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. et al. 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.

\_\_\_\_\_; LEDESMA, M. A.; \_\_\_\_\_. Alta homeologia cariotípica na família Tinamidae (Aves: Tinamiformes). *Revista Brasileira de Ornitologia*, v. 14, n. 1, p. 53-58, 2006.

GREGORY, T. R. Genome size and developmental complexity. **Genetica**, v. 115, n. 1, p. 131–146, 2002.

GRIFFIN, D. K. et al. The evolution of the avian genome as revealed by comparative molecular cytogenetic. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 117, p. 64–77, 2007.

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

GUTTENBACH, M. 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.

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.

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

INTERNATIONAL CHICKEN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (ICGSC). Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature**, V. 432, N. 7018, p. 695-716, 2004.

JURKA, Jerzy et al., Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenetic and genome research**, v. 110, n. 1-4, p. 462-467, 2005.

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.

KIDWELL, M. G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, v. 115, n. 1, p. 49–63, 2002.

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 elaeinia (*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, 2018a.

\_\_\_\_\_; 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, 2018b.

\_\_\_\_\_. et al. Comparative chromosome painting in Columbidae (Columbiformes) reinforces divergence in Passerea and Columbea. **Chromosome Research**, v. 26, n. 188, p 1-13, 2018c.

KUBAT, Z. et al. Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. **Genome**, v. 51, n. 5, p. 350-356, 2008.

LEDESMA, M. A. et al. Descrição do cariótipo e padrões de bandas C e NOR em *Pheucticus aureoventris* (Emberizidae: Cardinalinae). **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 14, n. 1, p 5962, 2002.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. **Fish cytogenetics**, p. 421-453, 2007.

\_\_\_\_\_. et al. Cytogenetic Mapping and Contribution to the Knowledge of Animal Genomes Chromosomes as a Tool for Understanding. In: URBANO, K. V. (Ed.). *Advances in Genetics Research*. [s.l.] Nova Science Publishers, 2010. v. 4p. 1–81.

MOYLE, R. G. et. al. DNA sequence assessment of phylogenetic relationships among New World martins (Hirundinidae: Progne). **Wilson Journal of Ornithology**, v. 120, n. 4, p. 683-691, 2008.

NANDA, I.; SCHMID, M. Conservation of avian Z chromosomes as revealed by

comparative mapping of the Z-linked aldolase B gene. **Cytogenetic and genome research**, v. 96, n. 1-4, p. 176-178, 2002.

\_\_\_\_\_. 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-UMEHARA, C. et al., The molecular basis of chromosome orthologies and sex chromosomal differentiation in palaeognathous birds. **Chromosome Research**, v. 15, n. 6, p. 721-734, 2007.

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.

PRIMMER, C. R. et al H. Low frequency of microsatellites in the avian genome. **Genome Research**, v.16, n. 7, p. 471–482, 1997.

POKORNÁ, M.; KRATOCHVÍL, L.; KEJNOVSKÝ, E. Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). **BMC genetics**, v. 12, n. 1, p. 90, 2011.

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

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.

SCHMID, M. et al. First report on chicken genes and chromosomes 2000. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 90, n. 3-4, p. 169-218, 2000.

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.

SIGRIST, T. **Guia de campo avis brasiliis: Avifauna brasileira**. 3. ed. São Paulo: Avis brasiliis editora, 2013

SYBLEY, C. G.; MONROE, JR B. L. Distribution and taxonomy of the birds of the world. New Haven; **Yale University Press**, 1990.

SZARSKI, H. Cell size and nuclear DNA content in vertebrates. **International Review of Cytology**. v. 44, p. 93–209, 1976.

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.