Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico - CNPq

Projeto de Pesquisa

Pintura cromossômica comparativa em aves da família Trochilidae (Beija-flor)

Pós-doutorando: Tiago Marafiga Degrandi

Supervisor: Dr. Roberto Ferreira Artoni

Ponta Grossa

2019

1.dados de identificação

Título do projeto: Pintura cromossômica comparativa em aves da família Trochilidae (Beija-flor)

Pós-doutorando: Tiago Marafiga Degrandi

Supervisor: Dr. Roberto Ferreira Artoni

Instituição/Programa de Pós-Graduação: Universidade Estadual de Ponta Grossa- Programa de Pós-Graduação em Biologia evolutiva

Outras Instituições participantes:

-Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA);

-Universidade Federal do Pará (UFPA);

-Instituto Evandro Chagas (IEC);

Dados da Equipe:

Nome	Instituição	Função
Dr. Tiago Marafiga Degrandi	UEPG	Pós-doutorando
Dr. Roberto Ferreira Artoni	UEPG	Supervisor
Drª Analía del Valle Garnero	UNIPAMPA	Colaborador
Dr. Ricardo José Gunski	UNIPAMPA	Colaborador
Suziane Alves Barcelos	UNIPAMPA	Colaborador
Miguel Airton Carvalho	UEPG	Apoio técnico

Título: Pintura cromossômica comparativa em aves da família Trochilidae (Beija-flor)

Resumo:

Os beija-flores, pertencem a família Trochilidae, que inclui mais de 300 espécies reconhecidas por suas adaptações nectarívoras. Eles evoluíram exclusivamente nas Américas e os estudos moleculares baseados em sequências multilocus e no genoma completo, são divergentes quanto a origem dos beija-flores, ora considerando-os como Apodiformes ou Caprimulgiformes. Além disso, os dados cromossômicos do grupo são escassos, evidenciando a necessidade de novos estudos. Em vista disso, este projeto tem como objetivo compreender os processos cromossômicos evolutivos que atuaram nas espécies da família Trochilidae, bem como analisar a relação filogenética dos beija-flores com os Caprimulfiformes. O número cromossômico e cariótipo de nove espécies da família Trochilidae serão determinados. As comparações serão realizadas através da pintura cromossômica utilizando as sondas dos macrocromossomos de *Gallus gallus* e *Leucopternis albicollis*. As relações filogenéticas serão analisadas utilizando os dados das homologias cromossômicas obtidos e uma filogenia molecular disponível na literatura como referência.

Palavras-chave: Evolução, FISH, Cariótipo, Cromossomo.

2. Introdução/justificativa

As aves representam a classe dos vertebrados terrestres, que contém a maior diversidade de espécies. Entre as mais de 10 mil espécies listadas, 1919 são reconhecidas com distribuição no Brasil (Piacentini et al., 2015). Nos últimos anos, os avanços no sequenciamento de nova geração, contribuíram substancialmente para o conhecimento sobre os genomas, a diversidade e evolução das aves (Jarvis et al., 2014). As análises de mais de 50 genomas aviários completos, permitiram revisar as relações evolutivas entre as principais ordens do grupo, dando apoio a clássica divisão das aves nas infra classes Paleognata e Neognata (Jarvis et al., 2014; Prum et al., 2015). No entanto, apesar destes avanços, estamos muito longe de conhecer uma pequena fracção destes genomas, permanecendo ainda muitas lacunas nas relações filogenéticas ao nível ordens, famílias, gêneros e espécies, evidenciando a necessidade de outras abordagens.

Os estudos de citogenética clássica, durante muito tempo forneceram dados importantes sobre a evolução das aves. Em geral, os cariótipos aviários são caracterizados pela variação interna no tamanho entre os cromossomos, apresentando dois grupos distintos, os macrocromossomos e os microcromossomos. Aproximadamente, oito pares de macrocromossomos são vistos conservados entre maioria das aves, e o restante são microcromossomos (Rodionov, 1996). O número de cromossomos (2n) é variável, incluindo tanto espécies com número diploide baixo, como *Burhinus oedicnemus* (Charadriiformes) com 2n= 40 (Nie et al., 2009), quanto elevado como em *Corythaixoides concolor* (Musophagiformes) com 2n= 142 (Christidis, 1990). Entretanto, a maioria das espécies com cariótipos conhecidos possui em torno de 80 cromossomos (Kretschmer et al., 2018).

Com a disseminação da técnica de hibridização in situ fluorescente (FISH), e a pintura cromossômica com as sondas de cromossomos inteiros, informações ainda mais precisas sobre o complemento cariotípico das aves, puderam ser identificadas (Griffin et al., 2007; Kretschmer et al., 2018). Com as sondas cromossômicas de *Gallus gallus* (GGA) 2n= 78, foi visto que os macrocromossomos são inteiramente conservados entre espécies distantemente aparentadas (Griffin et al., 1999; de Oliveira et al., 2005; Nishida-Umehara et al., 2007; Kretschmer et al., 2014). Porem em alguns grupos como os Accipitriformes, foi visto que os macrocromossomos evoluem através de rearranjos inter-cromossômicos como fusões, fissões e translocações, sendo estes os principais mecanismos responsáveis pelas variações cromossômicas numéricas do grupo (de Oliveira et al., 2005).

Com o advento das sondas cromossômicas de *Leucopternis albicollis* (LAL) 2n= 66, foi possível identificar a ocorrência de rearranjos intra-cromossômicos, que

não eram visualizados nas análises de citogenética clássica ou com as sondas de *Gallus* (de Oliveira et al., 2010). Estudos seguintes, realizaram a pintura cromossômica comparativa entre espécies de diferentes ordens utilizando as sondas de LAL e identificaram por exemplo que cromossomos previamente homólogos ao GGA1, apresentam uma inversão pericêntrica, somente observada com o uso da sonda do LAL18 (Kretschmer et al., 2014; dos Santos et al., 2015; Degrandi et al., 2017). Estes achados, tem sido de extrema importância para diferenciar espécies e propor as relações evolutivas entre as espécies (Furo et al., 2015).

Os beija-flores, pertencem a família Trochilidae, que inclui mais de 300 espécies, reconhecidas por suas adaptações nectarívoras. A família Trochilidae é dividida em nove clados *Topazes*, *Hermits*, *Mangoes*, *Brilliants*, *Coquettes*, *Patagona*, todas com distribuição exclusiva nas Américas (McGuire et al., 2007). Em um recente estudo evolutivo baseado em sequências de DNA multilocus, foi observado que os Beija-flores passaram por uma rápida diversificação de espécies, considerando o curto tempo evolutivo, aproximadamente 22 milhões de anos (McGuire et al., 2014). De acordo com a proposta filogenética de Jarvis et al., (2014), os beija-flores pertencem a ordem Caprimulgiformes, que agrupa espécies de aves noturnas comumente chamadas de Bacurau. No entanto, para McGuire et al., (2014) os beija-flores compartilham um ancestral em comum com os andorinhões e são agrupados como Apodiformes. Considerando os estudos citogenéticos, pouco se sabe sobre o complemento cromossômico dos Trochilidae. Desde 1977, apenas quatro espécies de diferentes gêneros tiveram seus cariótipos analisados, *Amazilia lacteal*, *Chlorestes notatus*, *Colibri serrirostris* e *Lophornis magnificus*, todas exibindo 2n=82 cromossomos (Lucca, 1977).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Compreender os processos cromossômicos evolutivos que atuaram na família Trochilidae.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar e comparar os cariótipos de nove espécies da família Trochilidae, afim de compreender os processos de diferenciação cariotipica que atuaram no grupo;

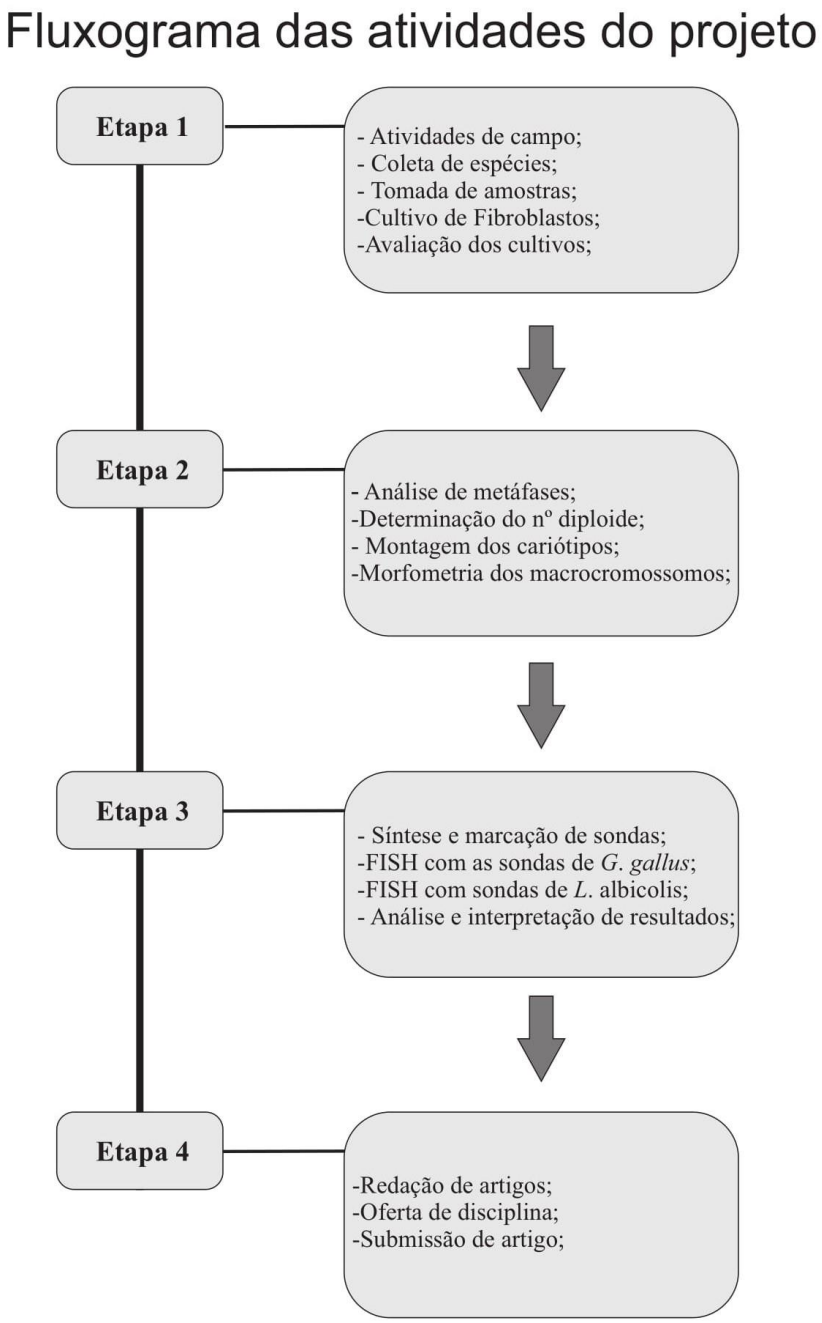
- Identificar a homologia cromossômica entre as espécies da família Trochilidae e o cariótipo de *Gallus gallus*, a fim de verificar a existência de assinaturas cromossômicas exclusivas para o grupo.

- Identificar a ocorrência de rearranjos intracromossômicos e sua contribuição para os eventos de especiação;

- Analisar a relação filogenética dos beija-flores com outras espécies de Caprimulfiformes;

4. Materiais e métodos

Este projeto terá suas atividades organizadas em quatro etapas, conforme o fluxograma abaixo. Os procedimentos para realização de cada uma delas são apresentados a seguir. O cronograma de atividades encontra-se na página nº16.



Etapa 1

4.1 Espécies e amostragem

Neste projeto serão analisadas nove espécies pertencentes as famílias Trochilidae (*Anthracothorax nigricollis*, *Chlorostilbon notatus*, *Campylopterus largipennis*, *Phaetornis superciliosus, Leucochloris albicollis*, *Hylocharis chrysura*, *Ramphodon naevius*, *Thalurania glaucopis* e *Amazilia versicolor*) e ao menos duas espécies da ordem Caprimulgiformes (*Hydropsalis torquata* e *Streptoprocne biscutata*). É importante destacar, que as espécies podem ser modificadas de acordo com as amostragens que forem realizadas durante atividades de campo.

Para a coleta de amostras, serão efetuadas expedições de campo nas cidades de Ponta Grossa-Paraná, São Gabriel e Santa Maria- Rio Grande do Sul. Para. A captura das espécies será utilizado redes de neblina, abertas no início da manhã e fechadas ao entardecer. Todos os procedimentos de captura e coleta de amostras serão realizados sob normas e condições previamente estabelecidas na licença do SISBIO nº 44173-1 e CEUA 010/2018.

4.2 Obtenção de cromossomos

A obtenção das preparações cromossômicas, será realizada através do cultivo de fibroblastos conforme Sasaki et al., (1968). Para cada espécime capturado será coletado uma biópsia de pele ou polpa da pena, está é armazenada para transporte em meio de cultivo contendo antibióticos. No laboratório, o material será cortado em pedaços pequenos e transferida para um novo tubo contendo 3 ml de Colagenase tipo IV 1%, que será incubado por 3 horas a 37ºC. A suspensão celular obtida, será adicionada em garrafa de cultivo contendo 5 ml de meio de cultura suplementado com 5% de soro fetal bovino e antibióticos. Após as células serão incubadas a 37ºC até obter-se um nível satisfatório de células em divisão. Ao final as células serão tratadas com Colchicina 0,05% por 1 hora, e os procedimentos de

fixação das células serão realizados com solução hipotônica (KCl 0,75M) e metanol/ácido acético (3:1).

Etapa 2

4.3 Número diploide e cariótipo

Para determinação do número diploide de cada espécie estudada, serão produzidas lâminas em coloração convencional. Serão analisadas aproximadamente 40 metáfases em microscópio óptico, observando a morfologia e número de cromossomos. O cariótipo será montado ordenando os cromossomos em ordem decrescente de tamanho, alinhando-se a posição do centrômero. O comprimento do braço curto, do braço longo e comprimento total de cada par de macrocromossomos serão estimados no *software* Image J. Estes valores serão utilizados para calcular o valor do índice centromérico (razão entre o braço curto e o comprimento total do cromossomo) e determinar a morfologia dos cromossomos conforme método proposto por Guerra (1986).

Etapa 3

4.4 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Para identificar as homologias cromossômicas entre as diferentes espécies em estudo, serão realizados experimentos de FISH utilizando sondas dos macrocromossomos 1 ao 10 da espécie *Gallus gallus* e cromossomos 1 ao 19 da espécie *Leucopternis albicollis*, isolados por de Oliveira et al., (2010). Além destas, também será utilizado sondas do DNA ribossômico (rDNA 18S e 5S) para identificar os sítios de rDNA.

Para a amplificação das sondas cromossômicas, será utilizado o DNA cromossômico em uma reação de DOP-PCR utilizando o primer 6-MW

(5’CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG3’) conforme descrito por Telenius et al., (1992). Serão realizadas três reações de DOP-PCR. A primeira é utilizando o DNA matriz (cromossomo isolado). A segunda reação de DOP-PCR, utilizado o produto da primeira DOP como DNA molde. A terceira e última DOP é realizada para promover a marcação fluorescente da sonda com biotina ou fluoresceina, que serão incorporadas ao *mix* da reação. Os resultados de todas as reações serão conferidos em eletroforese utilizando gel de Agarose 1%.

4.5 Procedimentos do FISH

As hibridizações serão realizadas de acordo com os procedimentos descritos por de Oliveira et al., (2005): Preparação das lâminas: As preparações cromossômicas serão fixadas no centro da lâmina e tratadas com solução de Pepsina 1% e RNase 10mg. Logo será realizado os procedimentos de desidratação em séries de etanol 70%, 90% e 100%. Após, e as lâminas serão incubadas *over nigth* a 37ºC em estufa.

Hibridização: A hibridização será feita utilizando sondas cromossômicas e/ou rDNA. Os cromossomos serão desnaturados em Formamida 70% a 65ºC. Logo será produzido o *mix* de hibridização contendo 1µl da sonda sintetizada em 14 µL de tampão de hibridização. A solução de hibridização será desnaturada a 75ºC em Banho Maria, aplicada na lâmina e selada com lamínula para incubação em câmara úmida a 37°C por 72 horas, para sondas cromossômicas e 24 horas para sondas de rDNA.

Lavagens: Nesta etapa as laminas serão submetidas a uma série de lavagens em Formamida 50%, 2xSSC e 4xSSC Tween. Ao final será realizado a contra coloração dos cromossomos com 10µL de DAPI/antifade. A análise das lâminas será feita em Microscópio de fluorescência.

Etapa 4:

A etapa 4 é sinalizada com o início das análises e interpretação dos resultados totais, serão produzidas as figuras e redação dos artigos. Após os artigos serão formatados de acordo com as normas dos periódicos escolhidos e então submetidos. Além disso, reserva-se para esta etapa um período para considerações dos revisores e readequação de texto e figuras, caso necessário.

5. Infraestrutura e recursos disponíveis

Este projeto, terá suas atividades realizadas em diferentes laboratórios, que fornecerão a infraestrutura e os reagentes necessários para sua viabilidade. Esta possibilidade é proporcionada através dos professores colaboradores do projeto, que estabeleceram previamente esta parceria. Abaixo é apresentado uma breve descrição da estrutura e recursos disponíveis em cada um dos laboratórios parceiros.

O Laboratório de Diversidade Genética Animal (DGA) da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) localizado em São Gabriel/ RS, é chefiado pelos professores Dr. Ricardo José Gunski e Drª. Analía del Valle Garnero. Atualmente, o laboratório conta com todos os recursos (equipamentos e reagentes) necessários para a realização do projeto, em especial para as atividades de campo, coletas de amostras, cultivo celular e também para as análises citogenética clássica.

O Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética (LCTC) do Instituto Evandro Chagas (IEC) localizado em Ananindeua/PA, é chefiado pelo professor Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira. O laboratório possui vários dos recursos necessários para as atividades do projeto, destaco aqui especialmente os reagentes e equipamentos para o desenvolvimento da técnica de FISH, que incluem: as

sondas cromossômicas das espécies *G. gallus* e *L. albicollis*, sondas para 10 sequencias de DNA microssatélite, telomérica, e sonda para os *clusters* de rDNA 45S e 5S. Todas estas sondas serão necessárias para a realização da técnica de FISH e comparação das espécies que serão analisadas.

O Laboratório de Biologia Evolutiva localizado na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em Ponta Grossa-PR é chefiado pelo professor Dr. Roberto Ferreira Artoni. O laboratório conta com todos os recursos (equipamentos e reagentes) necessários para a realização dos experimentos de FISH incluindo Microscópio de fluorescência equipado com câmera e microdissector, termocicladores necessários para produção de sondas.

6. Principais contribuições científicas, tecnológicas e educacionais da proposta.

7.1 Na Pesquisa:

Espera-se que com a execução deste projeto, as parcerias já estabelecidas entre os laboratórios de pesquisa envolvidos sejam fortalecidas, facilitando trocas de experiências, recursos e de pessoal. Além disso, espera-se que o bolsista possa ampliar suas experiências profissionais e pessoais relacionadas a pesquisa.

Como os resultados, pretende-se formatar pelo menos dois artigos para publicação: o primeiro utilizando os dados obtidos nas espécies de beija-flor e o Bacurau; e outro com os materiais didáticos desenvolvidos para ensino de genética.

Espera-se que os dados obtidos neste projeto, possam conjuntamente com outros trabalhos previamente publicados, promover o melhor entendimento sobre a diversidade e evolução das espécies da Classe Aves.

8. Plano de atividades e cronograma

Atividade/Mês	**1º**	**2º**	**3º**	**4º**	**5º**	**6º**	**7º**	**8º**	**9º**	**10º**	**11º**	**12º**
Coleta de amostras	**X**	**X**										
Obtenção de Cromossomos	**X**	**X**										
Determinação do número diploide e cariótipo			**X**	**X**								
Síntese e marcação das sondas cromossômicas					**X**							
Hibridização *in situ* Fluorescente					**X**	**X**	**X**	**X**				
Análise e Interpretação dos resultados					**X**	**X**	**X**	**X**	**X**			
Adaptação de experimentos adicionais									**X**			
Redação de artigos científicos									**X**			
Disciplina ofertada							**X**	**X**	**X**			
Outras colaborações	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**
Submissão de artigo										**X**	**X**	**X**

9. REFERÊNCIAS

Christidis L: Animal Cytogenetics 4: Chordata 3 B. Aves (Gebrüder Borntraeger, Berlin 1990).

Degrandi TM, Garnero ADV, 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, v. 151, p. 208-215.

de Oliveira EHC, Habermann F, Lacerda O, Sbalqueiro IJ, Wienberg J, Muller S. (2005). Chromosome reshuffling in birds of prey: the karyotypes of the world's largest eagle (*Harpy eagle*, *Harpia harpyja*) compared to that of the chicken (*Gallus gallus*). Chromosoma, v. 114, p. 338-343.

de Oliveira EHC, Tagliarini MM, Rissino JD, Pieczarka JC, Nagamachi CY, O'brien PMC, Ferguson-Smith MA. (2010). 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.

dos Santos MD, Kretschmer R, Silva FAO, Ledesma MA, O' Brien PMC, Smith MAF, Garnero ADV, de Oliveira EHC, Gunski RJ. (2015). Intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus *Saltator* (Thraupidae, Passeriformes) and the occurrence of heteromorphic Z chromosomes. Genetica, v. 143, p. 535-543.

Furo IDO, Kretschmer R, O'Brien PC, Ferguson-Smith MA, de Oliveira EHC (2015). Chromosomal Diversity and Karyotype Evolution in South American Macaws (Psittaciformes, Psittacidae). PLoS ONE 10(6): e0130157.

Guerra MS. (1986). 'Reviewing the Chromosome Nomenclature of Levan et al,'

Rev Revista Brasileira de Genetica, v. 9, p. 741-743.

Griffin DK, Robertson LBW, Tempest HG, Skinner BM. (2007). The evolution of the avian genome as revealed by comparative molecular cytogenetics. Cytogenet Genome Res, v. 117, p. 64–77.

Griffin DK, Haberman F, Masabanda J, O'brien P, Bagga M, Sazanov A, Smith J, Burt DW, Ferguson-Smith MA. Wienberg J. (1999). Micro- and macrochromosome paints generated by flow cytometry and microdissection: tools for mapping the chicken genome. Cytogenet Cell Genet, v. 87, p. 278-281.

Jarvis ED, Mirarab S, Aberer AJ, Li B, Houde P, Li C, Ho SYW, Faircloth BC, Nabholz B and Howard JT et al. (2014). Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. Science, v. 346, p. 1320-1331.

Kretschmer R, Ferguson-Smith MA and de Oliveira EHC. (2018). Karyotype evolution in birds: From conventional staining to chromosome painting. Genes, v. 9, p. 181.

Kretschmer R, Gunski RJ, Garnero ADV, Furo IDO, O'brien PCM, Smith MAF, de Oliveira EHC. (2014). Molecular cytogenetic characterization of multiple intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus Turdus (Turdidae, Passeriformes). PLoS ONE v. 9, p.e103338.

Lucca EJ. (1977). O complemento cromossômico e a evolução do cariótipo em Apodiformes, Gruiformes e Passeriformes. Botucatu Cient, Ser. B 2: 31-38.

McGuire JA, Witt CC, Remsen JVJr. Corl A, Rabosky DL, Altshuler DL, Dudley R. (2014). Molecular Phylogenetics and the Diversification of Hummingbirds. Current Biology, v. 24, p. 1-7.

McGuire, J.A., Witt, C.C., Altshuler, D.L., and Remsen, J.V., Jr. (2007). Phylogenetic systematics and biogeography of hummingbirds: Bayesian and maximum likelihood analyses of partitioned data and selection of an appropriate partitioning strategy. Syst. Biol. v.56, p. 837-856.

Nie W, O'Brien PCM, Ng BL, Fu B, Volobouev V, Carter NP, Ferguson-Smith MA, Yang F. (2009). Avian comparative genomics: reciprocal chromosome painting between domestic chicken (Gallus gallus) and the stone curlew (Burhinus oedicnemus, Charadriiformes)-An atypical species with low diploid number Chromosome Research, v.17, p. 99-113.

Nishida-Umehara C, Tsuda Y, Ishijima J, Ando J, Fujiwara A, Matsuda Y, Griffin DK. (2007). The molecular basis of chromosome orthologies and sex chromosomal differentiation in palaeognathous birds Chromosome Research, v. 15, p. 721-734.

Piacentini VQ, Aleixo A, Agne CE, Maurício GN, Pacheco JF, et al. (2015). Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee. Revista Brasileira de Ornitologia, v.23, p. 91-298.

Prum RO, Berv JS, Dornburg A, Field DJ, Townsend JP, Lemmon EM, Lemmon AR. (2015). A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. Nature, v.526, p. 569-573.

Rodionov AV. (1996). Micro vs. macro: a review of structure and functions of avian micro- and macrochromosomes. Genetika, v. 32, p. 597-608.

Sasaki M, Ikeuchi T, Maino S. (1968). A feather pulp culture for avian chromosomes with notes on the chromosomes of the peafowl and the ostrich. Experientia, v. 24, p. 1923-1929.

Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A. (1992). Degenerate oligonucleotide primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer. Genomics, v. 13, p. 718-725.