

ANÁLISE DO SATELITOMA DO QUERO-QUERO (*Vanellus chilensis*, CHARADRIIFORMES, CHARADRIIDAE): DADOS PRELIMINARES

CUERVO, VICTOR CRUZ¹; DA SILVA, MAIRA LOPES²; TOMA, GUSTAVO AKIRA³; KRETSCHMER, RAFAEL⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – vitorcuervito@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – mairalopes890@gmail.com

³Universidade Federal de São Carlos – gustavo_toma@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – rafael.kretschmer@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Entende-se por citogenética como a ciência que estuda a estrutura, organização e função dos cromossomos, a qual divide-se em clássica e molecular. A citogenética clássica utiliza a coloração convencional com Giemsa e também as técnicas de bandeamento cromossômico, especialmente a Banda C, G e NOR, responsáveis, respectivamente, pela identificação de regiões ricas em heterocromatina constitutiva, regiões ricas em adenina/timina (AT) e citosina/guanina (CG), e regiões organizadoras de nucléolo. A citogenética molecular é a junção da biologia molecular com a citogenética clássica, a qual compreende principalmente técnicas de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), como por exemplo a hibridização genômica comparativa (CGH) e pintura cromossômica (WCP), as quais usam o genoma ou segmentos de DNA/RNA incorporadas a nucleotídeos conjugados a moléculas fluorescentes, permitindo identificar os rearranjos cromossômicos de forma mais eficiente que as técnicas empregadas na citogenética clássica.

A variação cromossômica encontrada na classe das aves torna-as um grupo ideal para investigar processos moleculares e evolutivos envolvidos em rearranjos cromossômicos e estabilidade cariotípica. Ao compararmos o cariótipo de diversas espécies com o suposto cariótipo ancestral das aves, composto por 80 cromossomos, podemos identificar espécies com cariótipos conservados ou derivados (GRIFFIN et al., 2007). Entre as inúmeras espécies de aves, a família Charadriidae (Charadriiformes) possui uma notável estabilidade cariotípica, com números diplóides (2n) variando de 72 a 78 cromossomos (DEGRANDI et al., 2020). Os cromossomos sexuais seguem o padrão típico para as aves, onde o cromossomo Z é geralmente maior que o cromossomo W, sendo este último tipicamente pequeno e heterocromático, exibindo variações morfológicas (KRETSCHMER et al., 2015; KRETSCHMER et al., 2020). Dentro desta família, a espécie *Vanellus chilensis* (Quero-Quero) com 2n = 78 apresenta apenas um rearranjo intercromossômico, resultante da fusão dos cromossomos ancestrais 7 e 8 (KRETSCHMER et al., 2015). Além disso, análises detalhadas utilizando sondas de cromossomos artificiais bacterianos (BAC) para os microcromossomos 11-28 revelaram a conservação desses cromossomos nesta espécie (DE SOUZA et al., 2022).

Curiosamente, outras famílias dentro da ordem Charadriiformes apresentam diversidade cromossômica significativa. Por exemplo, o membro da família Burhinidae, *Burhinus oedipnemus*, apresenta um cariótipo com baixo número diplóide, 2n = 42, com extensa fusão cromossômica, envolvendo principalmente os microcromossomos (NIE et al., 2009). Em contrapartida, o membro da família Jacanidae, *Jacana jacana*, possui um número diploide típico para as aves, com

$2n=82$, entretanto, contendo vários rearranjos cromossômicos, que envolvem especialmente fusões e fissões de macrocromossomos (KRETSCHMER et al., 2020).

A análise de sequências repetitivas de DNAs é uma interessante ferramenta para se investigar rearranjos cromossômicos, uma vez que estas sequências estão muitas vezes envolvidas com pontos de quebra (KRETSCHMER et al., 2022). O Satelitoma, coleção de DNAs satélite (sequências repetitivas de DNA organizadas em tandem) mais representativos em um genoma, têm demonstrado que estas sequências estão associadas principalmente à manutenção e formação de centrômeros, sendo encontradas majoritariamente em regiões heterocromáticas, em regiões pericentroméricas e subteloméricas, possuindo três diferentes padrões de distribuição: agrupados, dispersos e mistos (RUIZ-RUANO et al., 2016).

Os estudos de DNAs satélites em aves permanecem relativamente inexplorados. Nesse sentido, em nossa investigação procuramos sanar esta carência de dados, conduzindo uma análise do satelitoma de *V. chilensis* utilizando plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS), juntamente com a caracterização *in silico* e a localização cromossômica *in situ* dos DNAs satélites encontrados. Tais resultados serão importantes para entender o complexo contexto de rearranjos cromossômicos encontrados em espécies próximas.

2. METODOLOGIA

As preparações cromossômicas foram obtidas através da cultura direta de embriões (um macho e uma fêmea) de *V. chilensis*, coletadas em São Gabriel, Rio Grande do Sul. Resumidamente, o protocolo de extração de cromossomos envolveu o tratamento com colchicina (0,05%) à 37°C por uma hora, solução hipotônica (0,075 M, KCl) à 37°C por 15 minutos, e fixação em metanol e ácido acético (3:1). O pellet obtido foi armazenado em freezer -20°C para as análises cromossômicas.

Para a análise do satelitoma, o DNA genômico de cada indivíduo foi extraído e sequenciado na empresa BGI (BGI Shenzhen Corporation, Shenzhen, China). Os dados do sequenciamento foram analisados por ferramentas de bioinformática para a identificação dos DNAs satélites. Para cada DNA satélite identificado foram desenhados primers, os quais foram amplificados pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os produtos de PCR foram usados para a produção de sondas para os experimentos de FISH.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nossas análises, junto a revisões da literatura, confirmou-se o número diploide ($2n=78$) descrito previamente em *V. chilensis*, sendo o primeiro, segundo e quinto pares de macrocromossomos submetacêntricos; terceiro par e o cromossomo Z acrocêntricos; quarto e sexto pares metacêntricos; e os demais pares telocêntricos (KRETSCHMER et al., 2015).

As aves são conhecidas por possuírem genomas pequenos, com poucas sequências repetitivas (HUGHES & HUGHES, 1995), o que é corroborado com nosso estudo, uma vez que a caracterização do satelitoma da espécie *V. chilensis* (VchSat) por meio de ferramentas de bioinformática evidenciou a presença de apenas sete famílias de DNA satélite (Tabela 1). Estudos prévios em diferentes espécies demonstram a presença de um número maior de famílias de DNA satélite. Por exemplo, no gafanhoto da espécie *Locusta migratória*, confirmou-se o conjunto

de 62 famílias de DNAs satélites (RUIZ-RUANO et al., 2016), enquanto no peixe da espécie *Triportheus auritus*, observou-se o conjunto de 53 famílias de DNAs satélites (KRETSCHMER et al., 2022). O tamanho das unidades de repetição (RUL) no genoma de *V. chilensis* variou de 36 a 5351 pb, sendo os satélites longos (>100 pb) predominantes a aqueles considerados como curtos (<100pb) (VchSat07-36) a aqueles considerados como curtos (<100pb) (VchSat07-36).

Satélites com unidades de repetições maiores é outra característica que parece ser marcante no genoma das aves, uma vez que espécies de outros grupos geralmente apresentam satélites mais curtos, como por exemplo *L. migratória*, onde a variação do tamanho de DNAs Satélites foi de 8-400 pb (RUIZ-RUANO et al., 2016) e no *T. auritus* onde a variação encontrada foi de 16-2229 pb (KRETSCHMER et al., 2022).

O mapeamento cromossômico pela FISH mostrou que a maioria dos VchSat está acumulado nos microcromossomos. O VchSat01 foi encontrado nos centrômeros de todos os cromossomos, autossomos e sexuais, evidenciando um possível papel na função centromérica. O VchSat02 marca o braço longo do cromossomo W. VchSat04 e 05 produziram sinais de FISH em cinco pares de microcromossomos, enquanto o VchSat07 produziu sinais em três pares de microcromossomos. VchSat03 e VchSat06 não produziram sinais de FISH nos cromossomos de *V. chilensis*, indicando que eles estão organizados em pequenos clusters no genoma desta espécie.

Tabela 1. Características Gerais do Satelitoma de *V. chilensis*.

SatDNA	RUL	(A+T)
VchSat01-179	179	47.4%
VchSat02-5351	5351	54.0%
VchSat03-2447	2447	56.9%
VchSat04-145	145	44.1%
VchSat05-958	958	52.4%
VchSat06-234	234	37.6%
VchSat07-36	36	16.7%

RUL = Tamanho das unidades de repetição (em inglês “repeat unit lengths”).

4. CONCLUSÕES

A caracterização do satelitoma da espécie *V. chilensis* mostrou a existência de sete famílias de DNA satélites, sendo predominante satélites com unidades de repetição maiores que 100pb. O mapeamento cromossômico destas sequências mostrou que os mesmos estão presentes principalmente nas regiões centroméricas, no cromossomo W e nos microcromossomos. Por fim, o presente trabalho contribuiu significativamente para uma melhor compreensão da evolução e organização cromossômica de sequências repetitivas na espécie analisada.

FINANCIAMENTO

O presente trabalho teve financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (22/2551-0000572-1 e 22/2551-0000762-7).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DEGRANDI, T.M.; BARCELLOS, S.A.; COSTA, A.L.; GARNERO, A.D.V.; HASS, I.; GUNSKI, R.J. Introducing the Bird Chromosome Database: An Overview of Cytogenetic Studies in Birds. **Cytogenetic and Genome Research**, v.160, p.199-205, 2020.

DE SOUZA, M.S.; BARCELLOS, S.A.; DOS SANTOS, M.S.; GUNSKI, R.J.; GARNERO, A.D.V.; DE OLIVEIRA, E.H.C.; O'CONNOR, R.E.; GRIFFIN, D.K.; KRETSCHMER, R. Microchromosome BAC-FISH Reveals Different Patterns of Genome Organization in Three Charadriiformes Species. **Animals**, v.12, p.3052, 2022.

GILL, F.; DONSKER, D.; RASMUSSEN, P. (Eds). 2023. **IOC World Bird List** (v13.2).

GRIFFIN, D.K.; ROBERTSON, L.B.W.; TEMPEST, H.G.; SKINNER, B.M. The evolution of the avian genome as revealed by comparative molecular cytogenetics. **Cytogenetic and Genome Research**, v.117, p.64-77, 2007.

HUGHES, A.L.; HUGHES, M.K. Small genomes for better flyers. **Nature**, v.377, p.391, 1995.

KRETSCHMER, R.; GUNSKI, R.J.; GARNERO, A.D.V.; O'BRIEN, P.C.M.; FERGUSON-SMITH, M.A.; DE FREITAS, T.R.O.; DE OLIVEIRA, E.H.C. Chromosome painting in *Vanellus chilensis*: Detection of a fusion common to clade Charadrii (Charadriiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, v.146, p.58-63, 2015.

KRETSCHMER, R.; DE SOUZA, M.S.; BARCELLOS, S.A.; DEGRANDI, T.M.; PEREIRA, J.C.; O'BRIEN, P.C.M.; FERGUSON-SMITH, M.A.; GUNSKI, R.J.; GARNERO, A.D.V.; DE OLIVEIRA, E.H.C.; et al. Novel insights into chromosome evolution of Charadriiformes: Extensive genomic reshuffling in the wattled jacana (*Jacana jacana*, Charadriiformes, Jacanidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.43, p.e20190236, 2020.

KRETSCHMER, R.; GOES, C.A.G.; BERTOLLO, L.A.C.; EZAZ, T.; PORTO-FORESTI, F.; TOMA, G.A.; UTSUNOMIA, R.; CIOFFI, M.B. Satellitome analysis illuminates the evolution of ZW sex chromosomes of Triportheidae fishes (Teleostei: Characiformes). **Chromosoma**, v.131, p.29-45, 2022.

NIE, W.; O'BRIEN, P.C.M.; NG, B.L.; FU, B.; VOLOBOUEV, V.; CARTER, N.P.; FERGUSON-SMITH, M.A.; YANG, F. Avian comparative genomics: Reciprocal chromosome painting between domestic chicken (*Gallus gallus*) and the stone curlew (*Burhinus oedipnemus*, Charadriiformes)—An atypical species with low diploid number. **Chromosome Research**, v.17, p.99-113, 2009.

RUIZ-RUANO, F.; LÓPEZ-LEÓN, M.; CABRERO, J.; CAMACHO, J.P.M. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific Reports**, v.6, p.28333, 2016.