

PRIMEIRO REGISTRO DO CARIÓTIPO DA MARRECA-PARDINHA *Anas flavirostris* (ANSERIFORMES, ANATIDAE) COM APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE BANDAMENTO C, Ag-NOR E FISH

VICTOR CRUZ CUERVO¹; RAQUELI TERESINHA FRANCA²; EDISON ZEFA³;
RAFAEL KRETSCHMER⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – vitorcervito@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – raquelifranca@ufpel.edu.br

³Universidade Federal de Pelotas – ezefa@ufpel.edu.br

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

1. INTRODUÇÃO

Estudos que envolvem a citogenética investigam os cromossomos, suas estruturas, funções, comportamento biológico, patológico e sua hereditariedade. A citogenética clássica utiliza métodos de coloração convencional, empregados principalmente na montagem cariotípica, incluindo a aplicação de técnicas de bandamento cromossômico, como a as bandas C, G e NOR. A Banda C identifica as regiões ricas em heterocromatina constitutiva, a Banda G identifica as regiões ricas em adenina/timina (AT) e citosina/guanina (CG), ao passo que a Banda Ag-NOR identifica as regiões organizadoras de nucléolo. A montagem dos cariótipos consiste no pareamento e ordenação dos cromossomos, fornecendo uma visão ampla do genoma do indivíduo, e das características estruturais de cada cromossomo. Esses métodos não apenas permitem a caracterização dos cromossomos, mas também contribuem para a comparação filogenética com outras espécies. Por outro lado, a citogenética molecular combina a citogenética clássica com a biologia molecular, utilizando principalmente técnicas de hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Essa técnica emprega genomas ou segmentos de DNA/RNA marcados com nucleotídeos conjugados a moléculas fluorescentes, possibilitando a identificação dos rearranjos cromossômicos com mais eficiência do que as técnicas da citogenética clássica.

As aves são reconhecidas pela sua significativa diversidade, abrangendo atualmente cerca de 11.000 espécies (GILL et al., 2024). Contudo, apesar dos grandes esforços para reconstruir a história evolutiva desse grupo nas últimas décadas, ainda existe uma carência de estudos relacionados à citogenética (KRETSCHMER et al., 2018). As aves possuem um alto número diploide (2n), variando entre 78 e 82 cromossomos (DEGRANDI et. al., 2020), e são caracterizadas por apresentarem vários pares de microcromossomos e poucos pares de macrocromossomos (CHRISTIDIS, 1990). No entanto, são encontradas algumas exceções que demonstram a grande variação cromossômica desse grupo taxonômico, com 2n partindo de 40 cromossomos para *Falco columbarius*, até 142 para *Corythaixoides concolor* (CHRISTIDIS, 1990; NISHIDA et al., 2008). Essa grande variação faz com que a classe das aves seja de extrema importância para investigar processos moleculares e evolutivos envolvidos em rearranjos cromossômicos. Em relação aos cromossomos sexuais, os machos são homogaméticos (ZZ) e as fêmeas heterogaméticas (ZW), sendo o cromossomo Z frequentemente maior que o cromossomo W, enquanto o cromossomo W é tipicamente heterocromático, demonstrando variações morfológicas (KRETSCHMER et al., 2018).

A família Anatidae (ordem Anseriformes) compõe um grupo numeroso e popular de aves aquáticas com distribuição mundial, ocorrendo em todos os continentes, com exceção da Antártida. Ela é comumente conhecida como a família dos patos, cisnes e gansos, compreendendo cerca de 53 gêneros e aproximadamente 178 espécies, sendo uma das famílias mais estudadas dentro da ordem Anseriformes nos últimos tempos, principalmente quanto às suas relações filogenéticas (GILL et al., 2024; DONNE-GOUSSÉ et al., 2002). O número diploide da família Anatidae varia de 74 a 98 cromossomos, considerando que 43 das suas espécies foram descritas, sendo, dentre elas, apenas cinco do gênero *Anas*, as quais apresentam de 80 a 82 cromossomos (DEGRANDI et. al., 2020).

Diante do exposto, a partir da análise de metáfases por coloração convencional com Giemsa, e das técnicas de bandamento C, Ag-NOR, e hibridização *in situ* de sequências de rDNA 18S, o presente estudo visa descrever pela primeira vez o cariótipo de *Anas flavirostris* (marreca-pardinha), espécie tipicamente encontrada no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, durante os meses de primavera e verão.

2. METODOLOGIA

As preparações cromossômicas foram obtidas através da cultura celular de fibroblastos de penas em crescimento, de dois indivíduos machos de *A. flavirostris* coletados no NURFS/CETAS da Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul. O protocolo de extração de cromossomos envolveu o tratamento com colchicina (0,05%) à 37°C por 1 h, seguido de solução hipotônica (0,075 M, KCl) à 37°C por 15 min, e, por último, de fixação em metanol e ácido acético (3:1). O pellet obtido após a conclusão dessas etapas foi armazenado em freezer a -20°C, para posteriores análises cromossômicas.

Para a determinação do número diploide e morfologia dos cromossomos foram analisadas 80 metáfases coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato (pH 6,8). A partir dessa análise, as melhores metáfases foram selecionadas e fotografadas para a construção do cariótipo, realizada através do software CorelDRAW PHOTO-PAINT 2021. O bandamento C seguiu a metodologia de LEDESMA et al. (2002) enquanto o bandamento Ag-NOR foi realizado de acordo com a metodologia de HOWELL & BLACK (1980). A hibridização *in situ* fluorescente utilizando sondas de rDNA 18S foram realizadas de acordo com DANIELS & DELANY (2003).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise das metáfases, a partir da contagem manual realizada para cada exemplar de *A. flavirostris* e do cariótipo confeccionado, identificou-se o número diploide de 80 cromossomos (2n=80), corroborando o que foi encontrado para outras espécies do mesmo gênero (DEGRANDI et al., 2020). Em relação a morfologia dos cromossomos de ambos os exemplares, foi constatado que os primeiros cinco pares de cromossomos autossômicos e o par sexual (ZZ) são macrocromossomos, sendo os pares 1 e 2 submetacêntricos, o par 3 telocêntrico, e os pares 4 e 5, assim como o par sexual ZZ, acrocêntricos. Os demais pares foram identificados como microcromossomos, todos com morfologia telocêntrica.

A definição dos pares autossômicos de macrocromossomos foi realizada a partir da análise de seus respectivos tamanhos e morfologias, ao passo que a definição dos microcromossomos foi realizada apenas com base em seus

tamanhos, visto que são morfologicamente idênticos. Já a definição do par sexual (ZZ) se deu com base na literatura encontrada para outras espécies da família Anatidae, a qual demonstra que o cromossomo sexual Z pode ser de dois braços ou telocêntrico, sendo geralmente classificado, em relação ao seu tamanho, como o quarto par encontrado (TAKAGI et al., 1966; WÓJICK et al., 2007; RODRIGUES et al., 2014).

As análises de bandamento C revelaram que *A. flavirostris* possui regiões heterocromáticas em apenas dois pares de microcromossomos. Em relação às sequências de rDNA 18S, estas foram identificadas em quatro pares de microcromossomos. Pela técnica de bandamento Ag-NOR, as regiões organizadoras do nucléolo ativas estão presentes em apenas três desses pares de microcromossomos. Esse padrão difere da maioria das espécies de aves já estudadas por meio dessa técnica, que apresentam apenas um ou dois pares de microcromossomos portadores de regiões organizadoras do nucléolo (KRETSCHMER et al., 2018).

4. CONCLUSÕES

A espécie analisada possui um cariótipo conservado, devido ao número cromossômico ($2n=80$) ser idêntico ao suposto ancestral das aves, além de ter alta similaridade com as espécies do mesmo gênero. Além disso, foram identificados quatro pares de microcromossomos portadores de regiões organizadoras de nucléolo, sendo três desses pares ativos.

Este estudo representa um passo inicial na compreensão da evolução e organização cromossômica da espécie *A. flavirostris*, uma vez que seu cariótipo foi descrito pela primeira vez nesse trabalho.

5. FINANCIAMENTO

O presente trabalho teve financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (128384/2024-7).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHRISTIDIS, L. **Animal Cytogenetics**. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1990, 4v.

DANIELS, L.M.; DELANY, M.E. Molecular and cytogenetic organization of the 5S ribosomal DNA array in chicken (*Gallus gallus*). **Chromosome Research**, v. 11, p. 305–317, 2003.

DEGRANDI, T. M. et al. Introducing the bird chromosome database: an overview of cytogenetic studies in birds. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 160, n. 4, p. 199-205, 2020.

GILL, F. et al. IOC World Bird List. **World Bird Names**, 2024. Disponível em: <https://www.worldbirdnames.org/new/>. Acesso em: 05 set. 2024.

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, p. 1014-1015, 1980.

KRETSCHMER, R. et al. Karyotype Evolution in Birds: From Conventional Staining to Chromosome Painting. **Genes**, v.9, n. 4, p. 181, 2018.

LEDESMA, M. A. et al. Análise do Cariótipo de duas espécies da Família Formicariidae (Aves: Passeriformes). **Ararajuba**, v. 10, p. 15-19, 2002.

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.

RODRIGUES, S. B. et al. Chromosomal studies on *Coscoroba coscoroba* (Aves: Anseriformes) reinforce the Coscoroba–Cereopsis clade, **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 111, n. 2, p. 274–279, 2014.

TAKAGI, N.; MAKINO, S. A Revised Study on the Chromosomes of three Species of Birds. **Caryologia**, v. 19, n.4, p. 443–455, 1966.

WÓJCIK, E.; SMALEC, E. Description of the mallard duck (*Anas platyrhynchos*) karyotype. **Folia biologica (Kraków)**, v. 55, n.3-4, p. 115-120, 2007.