



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

CITOGENÔMICA DO GAVIÃO-PEGA-MACACO (*Spizaetus tyrannus*) (AVES,
ACCIPITRIFORMES): MAPEAMENTO GENÔMICO COMPARATIVO COM
Gallus gallus E PRODUÇÃO DE SONDAS CROMOSSOMO-ESPECÍFICAS.

CARLOS AUGUSTO DE LIMA CARVALHO

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Genética e Biologia
Molecular da UFPA como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em
Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. EDIVALDO
HERCULANO CORREA DE OLIVEIRA

BELÉM
DEZEMBRO, 2021

CARLOS AUGUSTO DE LIMA CARVALHO

CITOGENÔMICA DO GAVIÃO-PEGA-MACACO (*Spizaetus tyrannus*) (AVES, ACCIPITRIFORMES): MAPEAMENTO GENÔMICO COMPARATIVO COM *Gallus gallus* E PRODUÇÃO DE SONDAS CROMOSSOMO-ESPECÍFICAS.

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFPA como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Banca Examinadora:



Profa. Dra. Analia Del Vale Garnerio – UNIPAMPA

Membro Titular



Prof. Dr. Ricardo J. Gunski – UNIPAMPA

Membro Titular



Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni – UEPG

Membro Titular



Prof. Dr. André Salim Khayat – UFPA

Membro Titular

Dr. Rafael Kretschmer – UFSCAR

Membro Suplente

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

- C331c Carvalho, Carlos Augusto de Lima.
Citogenômica do gavião-pega-macaco (*Spizaetus tyrannus*) (Aves, Accipitriformes): mapeamento genômico comparativo com *Gallus gallus* e produção de sondas cromossomo-específicas / Carlos Augusto de Lima Carvalho.
— 2021.
xii, 111 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Belém, 2021.
1. Accipitridae. 2. Citogenômica. 3. *Spizaetus*. 4. Microcromossomos. I. Título.

CDD 572.8

Instituições Participantes:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO EVANDRO CHAGAS
LABORATÓRIO DE CULTURAS DE TECIDOS E CITOGENÉTICA – SAMAM
CNPQ – MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira, sobretudo pela relação de amizade ao longo de tantos anos de orientação, pela compreensão, paciência e pela ajuda durante todos esses anos.

A minha companheira de laboratório e de linha de pesquisa Ivanete de Oliveira Furo, pela parceria na realização de experimentos, dicas e conselhos.

Ao Centro de Genômica Comparativa de Cambridge (Reino Unido), por ceder boa parte das sondas utilizadas nesse trabalho.

Ao Instituto Evandro Chagas, pelo suporte logístico fornecendo todo o material e equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

Ào CNPQ, pelo apoio financeiro através da concessão de bolsa.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1	ASPECTOS EVOLUTIVOS DA CLASSE AVES	13
1.2	ORDEM ACCIPITRIFORMES	15
1.3	FAMÍLIA ACCIPITRIDAE	18
1.4	SUBFAMÍLIA AQUILINAE	21
1.4.1	Gavião-pegamacaco (<i>Spizaetus tyrannus</i>)	22
1.5	CITOGENÉTICA DE AVES	24
1.5.1	Cariótipo Ancestral de Aves	27
1.5.2	Dados Citogenéticos da Família Accipitridae	30
1.6	CITOGENÉTICA MOLECULAR	32
1.6.1	Pintura Cromossômica em Aves de Rapina	34
1.6.2	Sondas alternativas para pintura cromossômica em Aves	36
2.	OBJETIVOS	39
2.1	OBJETIVO GERAL	39
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1	ASPECTOS ÉTICOS	40
3.2	OBTENÇÃO DE AMOSTRAS E CULTIVO DE CÉLULAS	40
3.3	OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS METAFÁSICOS	42
3.4	CARACTERIZAÇÃO DO CARIÓTIPO	43
3.5	CITOMETRIA DE FLUXO	43
3.6	SONDAS CROMOSSOMO-ESPECÍFICAS E CLONES DE BACs	44
3.6.1	Amplificação e Marcação de Sondas	46
3.7	EXPERIMENTOS DE HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> COM FLUORESCÊNCIA (FISH)	48
3.7.1	Captura e análise de imagens	51
4.	RESULTADOS	52
4.1	CAPÍTULO 1	53
4.2	CAPÍTULO 2	71
5.	DISCUSSÃO GERAL	88
6.	CONCLUSÃO	94
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

LISTA DE ABREVIATURAS

BAC - *Bacterial Artificial Chromosome*

BOE - *Burhinus oedicephalus*

DAPI - 4',6-Diamidino-2-Phenylindole

DMEM - Meio Eagle Modificado por Dulbecco

dNTP's - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DOP-PCR - Degenerate Oligonucleotide-Primed Polymerase Chain Reaction

FACs - Fluorescent Activated Cell Sorting

FISH - Fluorescent *in situ* hybridization (Hibridização *in situ* com fluorescência)

FTIC - Fluorescein isothiocyanate (Anticorpo primário Anti-Fluoresceína)

GFU - *Gyps fulvus*

GGA - *Gallus gallus*

LAL - *Leucopternis albicollis*

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

NNI – *Nisaetus nipalensis orientalis*

PAK – *Putative ancestral karyotype* (Cariótipo Ancestral Hipotético de Aves)

SSC - Saline-sodium citrate (Citrato de sódio salino)

STY - *Spizaetus tyrannus*

TGU - *Taeniopygia guttata*

TX - Fluorocromo Texas Red

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Estimativa do tempo de divergência entre a linhagem Dinossauros-Aves (~140 milhões de anos) e entre o ancestral comum dos crocodilos atuais (~230 milhões de anos). Ma = milhões de anos (Fonte: adaptado de SCHWEITZER, 2003). **13**
- Figura 2 -** Ilustração de como deveria se parecer um exemplar de *Archaeopteryx lithographica* (lado esquerdo) e um fóssil encontrado preservado desta mesma espécie (lado direito) (Hermann von Meyer, 1861). (Fonte: http://www.dinosaur-world.com/feathered_dinosaurs/archaeopteryx_lithographica.htm & <https://australianmuseum.net.au/image/archaeopteryx-fossil-cast>). **14**
- Figura 3 -** Relações cladísticas entre os principais táxons da Classe Aves. *Archaeopteryx*, *Hesperornithiformes* e *Ichthyornithiformes* representam a sub-classe *Archaeornithes*. A sub-classe *Neornithes* é composta por espécies basais sem capacidade de voar (*Paleognathae*), enquanto as demais aves existentes compõem a superordem *Neognathae*. Os números nos nós representam caracteres derivados que suportam a monofilia de cada grupo (Fonte: adaptado de CRACRAFT, 1988). **15**
- Figura 4 -** Filogenia de Aves em escala genômica. A árvore de evidência nucleotídica total de alta resolução (TENT) mostra a distância entre os falcões (*Falconiformes*) das demais aves de rapina diurnas (*Accipitriformes*), ambos destacados em vermelho. Essas duas ordens se separaram com a divergência entre os clados *Australaves* e *Afroaves* (Fonte: adaptado de JARVIS et al., 2014). **17**

Figura 5 -	Filogenia da família Accipitridae inferida a partir da análise de sequências dos genes mitocondriais <i>cyt-b</i> e ND2, além de sequências do <i>intron 7</i> do gene nuclear β -fibrinogênio, mostrando a sua divisão em 14 subfamílias. Topologia obtida através de inferência Bayesiana (Fonte: adaptado de LERNER & MINDELL, 2005).	20
Figura 6 -	Exemplar de um gavião-pega-macaco (<i>Spizaetus tyrannus</i>) jovem (à esquerda) e outro adulto (à direita) realçando a diferença na coloração da plumagem (Fonte: adaptado de MENQ, 2018).	22
Figura 7 -	Distribuição geográfica de <i>Spizaetus tyrannus</i> em território brasileiro baseado nos relatos de observadores (esquerda), e em demais países das Américas Central e do Sul. No Brasil, ocorre sobretudo na faixa marítima que vai do sul da Bahia até o Rio Grande do Sul (Fonte: adaptado de MENQ, 2018; adaptado de <i>The IUCN Red List of Threatened Species</i> , 2016).	23
Figura 8 -	Comparação do tamanho médio de íntrons, éxons e sequências intergênicas entre aves, répteis e mamíferos. Mostrando que em Aves esses elementos são menores e menos frequentes (Fonte: adaptado de ZHANG et al., 2014).	25
Figura 9 -	Cariótipo padrão da maioria das aves já estudadas, reforçando seu caráter bimodal, com poucos pares de macrocromossomos e muitos pares de microcromossomos. Caráter que se repete em espécies das mais variadas ordens: A) <i>Phalacrocorax brasilianus</i> (Suliformes); B) <i>Hydropsalis torquata</i> (Caprimulgiformes); C) <i>Pteroglossus inscriptus</i> (Piciformes); D) <i>Trogon surrucura</i> (Trogoniformes) (Fonte: adaptado de KRETSCHMER et al., 2021).	26

- Figura 10 -** Análise comparativa entre o cromossomo 4 de *Gallus gallus* (GGA4) e seus homólogos no mandarim, *Taeniopygia guttata* (TGU4 e TGU4a). Os números indicam a posição de BACs nas duas espécies (Fonte: adaptado de VOLKER et al., 2010). **28**
- Figura 11 -** Comparação entre os macrocromossomos de *Gallus gallus* (números pretos) e o cariótipo ancestral hipotético comum de Aves (números em azul). (Fonte: adaptado de GRIFFIN et al., 2007). **29**
- Figura 12 -** Organização ancestral exemplificada pelo cromossomo 5 e seus ortólogos em seis espécies de diversas Ordens (avestruz, galo, peru, pato, mandarim e periquito-australiano) mostrando o alto grau de conservação de *Gallus gallus* em relação ao ancestral comum de Aves. Setas vermelhas indicam inversões e setas azuis indicam translocações (Fonte: Adaptado de ROMANOV et al., 2014). **30**
- Figura 13 -** Estrutura de um BAC. Uma sequência de DNA de interesse pode ser inserida numa bactéria por meio de um plasmídeo, e a medida que a bactéria vai se multiplicando, a sequência de interesse vai se amplificando até ser isolada para ser utilizada como base para produzir uma sonda, dentre outras diversas finalidades (Fonte: adaptado de GREEN [s.d]). **33**
- Figura 14 -** Ilustração mostrando os rearranjos cromossômicos ocorridos no cariótipo do gavião-real (*Harpia harpyja*), em comparação com o cariótipo ancestral das aves. Os primeiros cinco pares sofreram 10 fissões e 1 fusão, os pares 6-10 apresentam 3 fusões com microcromossomos, enquanto 19 pares de microcromossomos sofreram 3 fusões entre si. (Fonte: adaptado de DE OLIVEIRA et al., 2005). **35**

- Figura 15 -** Mapa de homologia entre *Gallus gallus* (GGA), *Leucopternis albicollis* (LAL) e o Hipotético Cariótipo Ancestral de Aves (PAK, em inglês). As marcações com sondas cromossomo-específicas de LAL são indicadas pelas barras verticais ao lado dos cromossomos de PAK. As cores representam os cromossomos de GGA (Fonte: adaptado de KRETSCHMER et al., 2018). **37**
- Figura 16 -** Localização geográfica do município de Capitão Poço, onde as amostras foram coletadas (Adaptado de DE ABREU, 2006). **40**
- Figura 17 -** Esquema simplificado de um experimento de Hibridização in situ com Fluorescência (FISH). Mais detalhes no texto abaixo (Fonte; adaptado de BRAMMER et al., 2009). **49**

RESUMO

Embora a maioria das aves apresente cariótipos com número diplóide em torno de $2n=80$, com poucos macrocromossomos e muitos pares de microcromossomos, alguns grupos, como os Accipitriformes, são caracterizados por uma grande reorganização cariotípica, que resultou em cariótipos com números diplóides baixos e um menor quantidade de pares de microcromossomos quando comparados a outras aves. Dentre os Accipitriformes, a família Accipitridae é a mais diversa e inclui, entre outras subfamílias, a subfamília Aquilinae, composta por espécies de médio a grande porte. O gavião pega macaco (*Spizaetus tyrannus*-STY), encontrado na América do Sul, é membro desta subfamília. Os dados cromossômicos disponíveis para esta espécie incluem apenas a coloração convencional. Assim, a fim de fornecer informações adicionais sobre o processo de evolução do cariótipo dentro deste grupo, realizamos pinturas cromossômicas comparativas entre *S. tyrannus* e *Gallus gallus* (GGA). Além disso, a fim de fornecer novas ferramentas para citogenômica comparativa em aves, obtivemos sondas cromossomo-específicas dessa espécie. Os cromossomos de STY originaram 18 picos no cariótipo de fluxo, nos quais os cromossomos 2, 15, 16 e 31 pares formaram um pico separado cada. No entanto, devido ao seu tamanho semelhante, alguns picos incluíram dois a quatro pares. Em relação à pintura cromossômica comparativa, nossos resultados revelaram que pelo menos 29 eventos de fissão-fusão ocorreram no cariótipo STY, com base na homologia com GGA. As fissões ocorreram principalmente em grupos sintênicos homólogos a GGA1-GGA5. Por outro lado, a maioria dos microcromossomos foram encontrados fundidos a outros elementos cromossômicos em STY, indicando que esses rearranjos desempenharam um papel importante na redução do $2n$ para 68. Considerando essa reorganização cariotípica observada, as sondas cromossomo-específicas terão grande utilidade na análise cromossômica comparativa em Aves. Em relação à comparação dos resultados de STY com o padrão de hibridização da águia-da-montanha (*Nisaetus nipalensis orientalis*), não foi observada nenhuma sinapomorfia que pudesse representar uma assinatura cromossômica para esta subfamília. Portanto, as conclusões sobre a evolução do cariótipo em Aquilinae requerem estudos adicionais de pintura cromossômica.

Palavras-chave: Accipitridae; Citogenômica; *Spizaetus*; Microcromossomos

ABSTRACT

Although most birds show karyotypes with diploid number around $2n=80$, with few macrochromosomes and many microchromosomes pairs, some groups, such as the Accipitriformes, are characterized by a large karyotypic reorganization, which resulted in complements with low diploid numbers, and a smaller number of microchromosomal pairs when compared to other birds. Among Accipitriformes, the Accipitridae family is the most diverse and includes, among other subfamilies, the subfamily Aquilinae, composed of medium to large sized species. The Black-Hawk-Eagle (*Spizaetus tyrannus*-STY), found in South America, is a member of this subfamily. Available chromosome data for this species includes only conventional staining. Hence, in order to provide additional information on karyotype evolution process within this group, we performed comparative chromosome painting between *S. tyrannus* and *Gallus gallus* (GGA). In addition, in order to provide new tools for comparative cytogenomics in birds, we obtained whole-chromosome paints from this species. The chromosomes of STY correspond to 18 peaks on flow karyotype, in which chromosomes 2, 15, 16 and 31 pairs formed a separate peak each. However, because of their similar size, some peaks included from two to four pairs. Concerning the comparative chromosome painting, our results revealed that at least 29 fission-fusion events occurred in the STY karyotype, based on homology with GGA. Fissions occurred mainly in syntenic groups homologous to GGA1-GGA5. On the other hand, the majority of the microchromosomes were found fused to other chromosomal elements in STY, indicating these rearrangements played an important role in the reduction of the $2n$ to 68. Considering this observed karyotypic reorganization, chromosome-specific probes of STY will be very useful in comparative chromosomal analysis in birds. Concerning the comparison of our results with hybridization pattern of the Japanese-Mountain-Eagle (*Nisaetus nipalensis orientalis*), the only Aquilinae analyzed by comparative chromosome painting previously, did not reveal any synapomorphy that could represent a chromosome signature to this subfamily. Therefore, conclusions about karyotype evolution in Aquilinae require additional chromosome painting studies.

Key words: Accipitridae; Citogenomics; *Spizaetus*; Microchromosomes

1. INTRODUÇÃO

1.1- ASPECTOS EVOLUTIVOS DA CLASSE AVES

Existem muitas evidências que indicam que os membros da classe Aves evoluíram de um grupo de dinossauros terópodes, caracterizados por serem bípedes, carnívoros e onívoros, que com o passar de milhões de anos adquiriram penas e posteriormente capacidade de voar (XU et al., 2014).

De acordo com (SCHWEITZER, 2003), a linhagem de dinossauros que deu origem às aves divergiu do ancestral comum dos crocodilos atuais há cerca de 230 a 250 milhões de anos, sendo que a divergência entre dinossauros e aves se deu em algum momento mais recente na história evolutiva, por volta de 140 milhões de anos atrás (Figura 1).

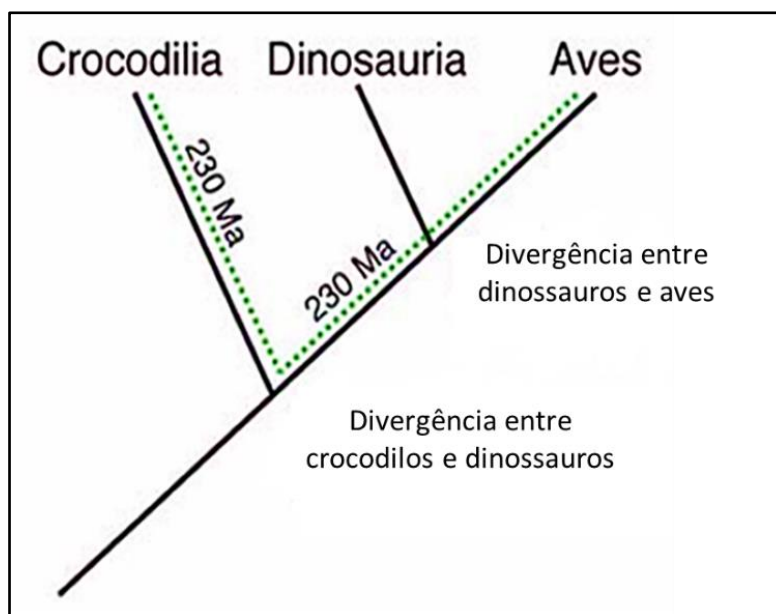


Figura 1: Estimativa do tempo de divergência entre a linhagem Dinossauros-Aves (~140 milhões de anos) e entre o ancestral comum dos crocodilos atuais (~230 milhões de anos). Ma = milhões de anos (Fonte: adaptado de SCHWEITZER, 2003).

Essa teoria se baseia em fósseis encontrados e uma série de dados obtidos nos mais diversos ramos da biologia, sendo que o ponto de partida para essa discussão está relacionado à transição dos terópodes para as aves por meio do *Archaeopteryx lithographica* (Figura 2), fóssil de um dinossauro muito semelhante às Aves cujo nome significa “asa antiga desenhada em pedra”, datado do período Cretáceo da era Mesozóica, cerca de 145 milhões a 65 milhões de anos atrás (CHIAPPE, 1995; XU et al., 2014).



Figura 2: Ilustração de como deveria se parecer um exemplar de *Archaeopteryx lithographica* (lado esquerdo) e um fóssil encontrado preservado desta mesma espécie (lado direito) (Hermann von Meyer, 1861). (Fonte: http://www.dinosaur-world.com/feathered_dinosaurs/archaeopteryx_lithographica.htm & <https://australianmuseum.net.au/image/archaeopteryx-fossil-cast>).

Apesar do grande número de estudos a respeito das relações filogenéticas entre os diferentes grupos de Aves, esse tema ainda é bastante polêmico. Atualmente, de acordo com CRACRAFT (1988) e HICKMAN et al. (2004), a classe Aves está dividida em duas sub-classes: Archaeornithes, composta de aves primitivas já extintas; e Neornithes, composta pelas aves existentes atualmente, que é ramificada em duas super-ordens, que são: Paleognathae, que engloba aves com asas atrofiadas ou ausentes; e Neognathae, que inclui as demais aves existentes, com capacidade de voar (Figura 3).

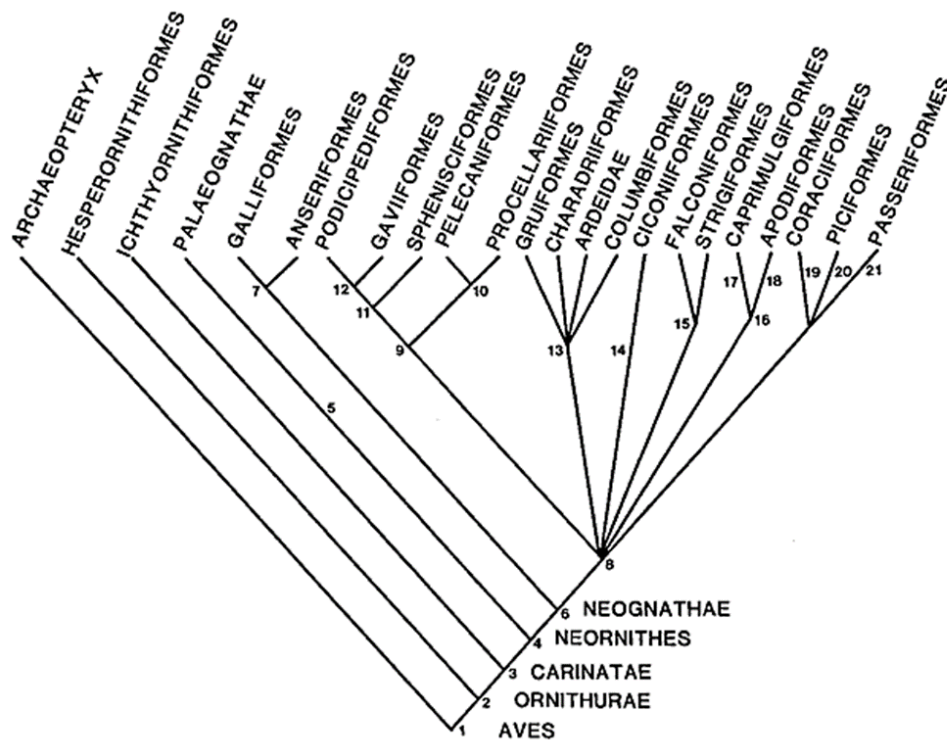


Figura 3: Relações cladísticas entre os principais táxons da Classe Aves. Archaeopteryx, Hesperornithiformes e Ichthyornithiformes representam a sub-classe Archaeornithes. A sub-classe Neornithes é composta por espécies basais sem capacidade de voar (Paleognathae), enquanto as demais aves existentes compõem a super-ordem Neognathae. Os números nos nós representam caracteres derivados que suportam a monofília de cada grupo (Fonte: adaptado de CRACRAFT, 1988).

1.2- ORDEM ACCIPITRIFORMES

Nas primeiras propostas de classificação das Aves, todas as espécies com características predatórias em relação a outros animais, como águias, falcões, abutres e corujas, eram agrupadas em uma mesma ordem (LINNAEUS, 1758). Com avanços em conceitos evolutivos, estudos posteriores questionaram o grau de parentesco entre aves de rapina e corujas, e análises mais detalhadas propuseram sua separação em duas ordens distintas: Falconiformes, englobando as aves de rapina de habitat diurno; e Strigiformes, sendo representada pelas aves de rapina de habitat noturno (WETMORE, 1960).

Posteriormente, as aves de rapina constituíam a Ordem Falconiformes sendo classificadas em cinco famílias: Cathartidae (urubus e condores), Falconidae (falcões e carcarás), Accipitridae (águias, gaviões e abutres do Velho Mundo), e duas famílias monotípicas, Pandionidae (*Pandion halieatus*, conhecida como águia-pescadora) e Sagittariidae (*Sagittarius serpentarius*, conhecida como ave-secretária africana) (BROWN & AMADON, 1968).

No entanto, muito se questionou a respeito da natureza monofilética da Ordem Falconiformes devido à presença de uma grande heterogeneidade cariotípica e morfológica, além de alterações na ordem de genes mitocondriais em diferentes famílias dessa Ordem (BROWN & MINDELL, 2009).

Estudos de ERICSON et al. (2006) e HACKETT et al. (2008), utilizaram marcadores moleculares de genes nucleares e apoiaram uma filogenia na qual a família Falconidae foi alocada mais próxima a outra ordem de Aves (Ciconiiformes), e detectaram a característica monofilética das demais famílias de Falconiformes. Estudos filogenéticos à nível genômico confirmaram que os falcões pertencem ao clado Australaves, enquanto as demais aves de rapina diurnas pertencem ao clado Afroaves, clados esses oriundos da primeira divergência entre Neoaves: Passarea e Columbea (Figura 4) (JARVIS et al., 2014).

A cada ano que passa aumenta os esforços para reforçar as classificações filogenéticas das aves. O trabalho mais recente de FENG et al. (2020) realiza uma análise comparativa com um total de 363 espécies de aves (correspondendo à cerca 92,4% de todas as famílias da classe) com pelo menos uma parte significativa do genoma sequenciado, tornando-se assim o estudo mais completo no que diz respeito à filogenias das aves em geral. E seus resultados corroboram com a classificação supracitada das aves de rapina.

Logo, a ordem Falconiformes, atualmente, se restringe à família Falconidae, enquanto as demais famílias de aves de rapina de habitat diurno (Cathartidae, Accipitridae, Pandionidae e Sagittariidae) constituem a nova Ordem Accipitriformes (Revisado por NIE et al., 2015).

A Ordem Accipitriformes engloba mais de 320 espécies classificadas em mais de 70 gêneros, que dividem alguns caracteres em comum, como o bico curto e afiado, em forma de gancho, com uma massa macia em sua base superior, chamado de cera, sendo o local por onde passam suas narinas. As patas apresentam-se fortes, com garras longas e curvadas e com um dedo oposto. A dificuldade para se obter um número exato de espécies e gêneros consiste no fato de que a sistemática desta ordem ainda é bastante polêmica, e pela grande quantidade de subespécies e variações (FEDUCCIA, 1999).

Segundo RANGEL & DINIZ-FILHO (2004), a distribuição geográfica das aves de rapina varia entre os grupos. Gaviões e águias (Accipitridae e Pandionidae) são aqueles que habitam praticamente todos os continentes, com exceção da Antártida. Já a ave-secretária (Sagittariidae) se restringe ao continente africano, em especial à região sub-saariana. Os abutres do Novo Mundo estão presentes apenas nas regiões Neotropicais.

1.3- FAMÍLIA ACCIPITRIDAE

A família Accipitridae é a maior dentro da ordem, compreendendo 256 espécies divididas em 67 gêneros distribuídos por todo planeta, sendo que a maioria deles ocorre em todos os continentes, porém alguns são exclusivos do Velho Mundo. Aparece como uma das linhagens mais representativas de aves não-passeriformes, composta por gaviões, águias e abutres do Velho Mundo (MIGOTTO, 2013). De acordo com SICK (1997), as fêmeas geralmente são maiores que os machos, em alguns casos chegando a ser 33% maior que o companheiro, permitindo sua distinção. Os jovens apresentam um rápido crescimento de penas e demoram cerca de 6 a 8 semanas para realizar as primeiras tentativas de voo, e necessitam de pelo menos três anos para atingir a maturidade sexual.

A questão da condição de monofiletismo da família Accipitridae parece estar resolvida, no entanto as relações filogenéticas entre os diferentes grupos de espécies ainda são bastante controversas, uma vez que os primeiros autores da sistemática dos accipitrideos fizeram uso apenas de características do

esqueleto e estudos comportamentais para classificar os grupos (PETERS, 1931; BROWN & AMADON, 1968; THIOLLAY, 1994).

No entanto, o advento de técnicas de biologia molecular e sequenciamento de DNA vêm ajudando a eliminar tais dúvidas quanto à filogenia da família. Estudos de LERNER & MINDELL (2005) utilizaram sequências dos genes mitocondriais do citocromo-b (*cyt-b*) e da NADH desidrogenase (*ND2*) e nucleares (β -fibrinogênio) no intuito de estabelecer uma nova taxonomia para essas aves (Figura 5). Essa proposta é considerada como a mais bem resolvida no que diz respeito à filogenia da família Accipitridae, dividindo-a em 14 subfamílias, sendo elas: Elaninae, Polyboroidinae, Gypaetinae, Perninae, Aegypiinae, Circaetinae, Harpiinae, Melieraxinae, Accipitrinae, Circinae, Milvinae, Haliaeetinae, Buteoninae e Aquilinae.

Tais resultados que dividiram a família Accipitridae em catorze subfamílias foram comprovados por GRIFFITHS et al. (2007), utilizando sequências de *exons* do gene nuclear de ativação de recombinação (*RAG-1*), confirmando que as relações baseadas em estudos morfológicos e comportamentais não apresentavam corroborações filogenéticas, em sua maioria.

Dentre as subfamílias, a Buteoninae é aquela com maior número de espécies, com 11 gêneros distribuídos, sobretudo, em regiões neotropicais. Os gêneros com maior variedade de espécies são *Accipiter* (Accipitrinae) e *Buteo* (Buteoninae), com 50 e 29, respectivamente. Já outras subfamílias apresentam um menor número de espécies e são mais restritas geograficamente, como Harpiinae, compostas por apenas três espécies monotípicas que compõem as águias de grande porte que habitam majoritariamente regiões neotropicais, e Polyboroidinae, com compreende apenas duas espécies de um mesmo gênero distribuídas apenas no continente africano (MIGOTTO, 2013).

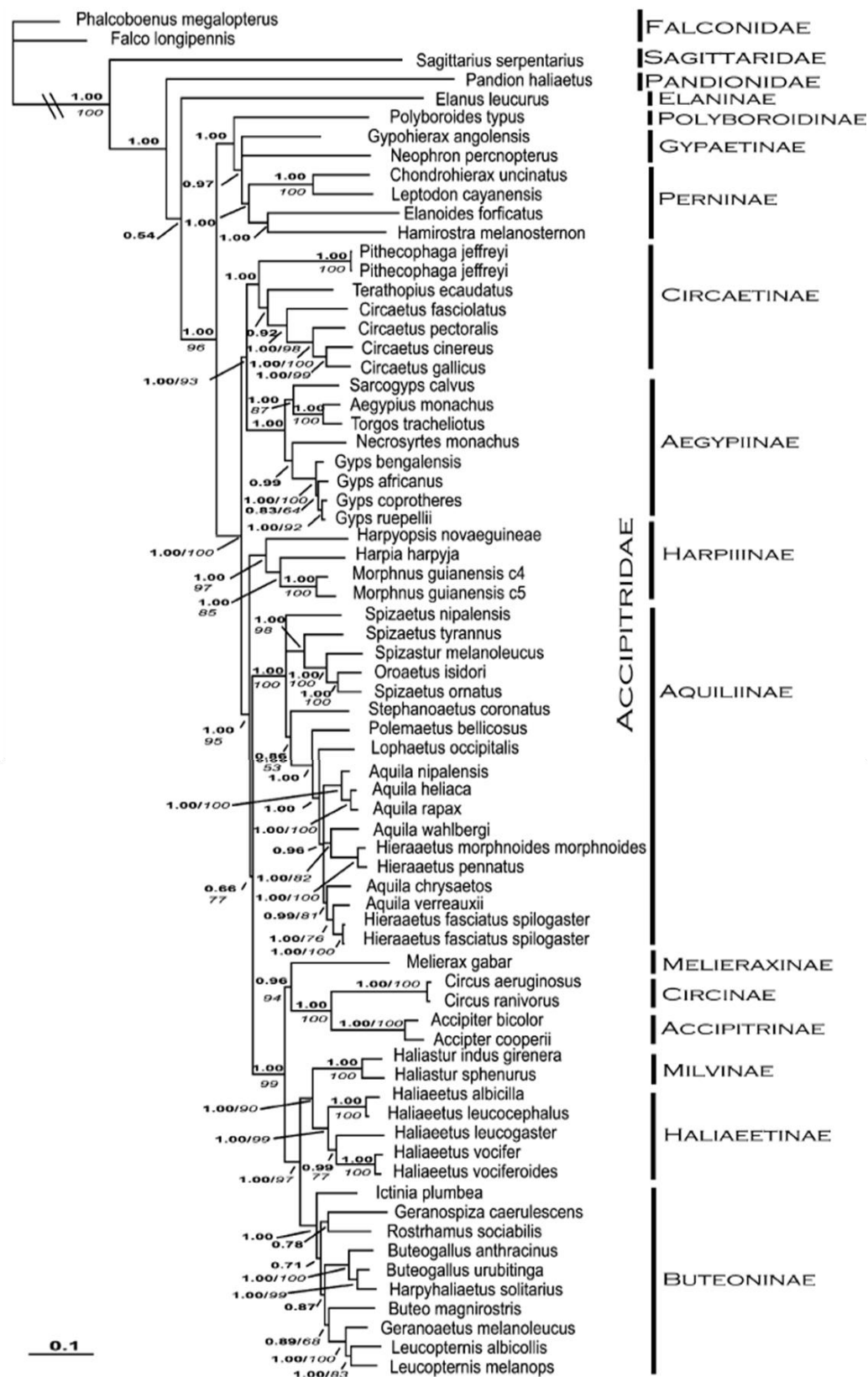


Figura 5: Filogenia da família Accipitridae inferida a partir da análise de sequências dos genes mitocondriais *cyt-b* e ND2, além de sequências do *intron 7* do gene nuclear β -fibrinogênio, mostrando a sua divisão em 14 subfamílias. Topologia obtida através de inferência Bayesiana (Fonte: adaptado de LERNER & MINDELL, 2005).

As subfamílias Aegypiinae (JOHNSON et al., 2006), Buteoninae (AMARAL et al., 2006; LERNER et al., 2008), Aquilinae (HELBIG et al., 2005; HARING et al., 2007) e Perninae (GAMAUF & HARING, 2004) são aquelas que apresentam uma maior quantidade de estudos filogenéticos. Todos esses estudos contando com uma grande quantidade de táxons e topologias bem definidas, na qual definiram que alguns gêneros, anteriormente reconhecidos, não eram de fato táxons monofiléticos, resultando em um rearranjo ou intercâmbio de espécies entre si.

1.4- SUBFAMÍLIA AQUILINAE

A subfamília Aquilinae engloba os seguintes gêneros: *Aquila*, *Hieraaetus*, *Lophotriorchis*, *Clanga*, *Ictinaetus*, *Polemaetus*, *Stephanoaetus*, *Lophaetus*, *Nisaetus* e *Spizaetus* (MIGOTTO, 2013), sendo esse último o de maior interesse no presente trabalho, pois é o gênero de qual faz parte a nossa espécie de interesse: *Spizaetus tyrannus*.

As espécies desta subfamília são aves de médio a grande porte, estão distribuídas globalmente, se alimentam quase que exclusivamente de pequenos mamíferos. Dentre suas características, se destaca o tarso emplumado, que faz com que suas espécies recebam o nome popular de “águias-de-bota”, ou “*booted eagles*” em inglês (DICKINSON & REMSEN, 2013; MIGOTTO, 2013).

O gênero *Spizaetus*, além de despertar o interesse para o presente trabalho, apresenta uma problemática interessante: este gênero passou por uma recente reformulação filogenética na qual suas 15 espécies foram realocadas em 2 gêneros diferentes baseado análises filogenéticas utilizando sequencias de DNA mitocondrial (gene *cyt-b*), fazendo uma espécie de divisão geográfica: *Spizaetus* (Ámerica do Sul e Central), *Nisaetus* (Ásia), enquanto o táxon africano que pertencia ao gênero *Spizaetus* (*Spizaetus africanus*) foi transferido para o gênero *Aquila* (HARING et al., 2007).

De acordo com MENQ (2018) as três espécies do gênero *Spizaetus* (*S. ornatus*, *S. tyrannus* e *S. melanoleucus*) que podem ser encontradas no Brasil são conhecidas como “águias-açores” ou “águias-florestais”, de habitat

estritamente florestal e caracterizadas por uma excelente aerodinâmica que permite voos ágeis e precisos pelo interior das matas.

1.4.1- *Spizaetus tyrannus* (Gavião-pega-macaco)

O gavião-pega-macaco, *Spizaetus tyrannus* (Wied, 1820), também conhecido como apacanim-preto, cutiu-preto, papa-macaco em algumas regiões, ou *Black-hawk-eagle* em inglês, é uma espécie florestal que mede entre 58 e 66 cm e pesa entre 900g (machos) a 1100g (fêmeas). Seu nome científico pode ser traduzido do grego como falcão-águia-tirano (*Spiza* = falcão; *aetos* = águia; *tyrannus* = tirano, sem piedade).

Os indivíduos adultos apresentam uma plumagem preta, com poucas penas brancas espalhadas pelo corpo e um penacho em forma de coroa também na cor preta. A cauda é longa com um padrão de barras na cor cinza-escuro inconfundível (Figura 6). Já os indivíduos jovens se apresentam com uma plumagem quase toda acinzentada, com penacho e garganta na cor branca contrastando com manchas e listras pretas (SICK, 1997; MENQ, 2018).

Atualmente existem duas subespécies, *Spizaetus tyrannus tyrannus* (Wied, 1820), que é a subespécie analisada neste trabalho, e *Spizaetus tyrannus serus* (Friedmann, 1950). *S. t. tyrannus* ocorre do leste do Brasil até o extremo nordeste da Argentina, enquanto *S. t. cerus* ocorre desde a região central do México, passando pelo caribe até a região central do Brasil, além de países como Colômbia, Venezuela, Peru e Bolívia (PIACENTINI et al., 2015). A distribuição geográfica do gavião-pega-macaco é ilustrada na Figura 7.



Figura 6: Exemplar de um gavião-pega-macaco (*Spizaetus tyrannus*) jovem (à esquerda) e outro adulto (à direita) realçando a diferença na coloração da plumagem (Fonte: adaptado de MENQ, 2018).

O gavião-pega-macaco apresenta uma dieta bastante diversificada, constituída de mamíferos arborícolas (pequenos primatas, marsupiais, morcegos e esquilos), aves (tucanos e araçarís), roedores (ratazanas) e até reptéis (ROBINSON, 1994). No entanto, a preferência se dá por mamíferos noturnos. Por apresentarem tamanhos distintos, macho e fêmea se alimentam de presas distintas, o que não gera competição e facilita a reprodução (FUNES et al., 1992). Constrói seu ninho no alto das árvores e o período de incubação dos ovos (geralmente 2 por ninho) dura em torno de 60 dias. Vive solitariamente ou em par, não sendo tão raro encontrar indivíduos sobrevoando áreas semiabertas e parques urbanos (CANUTO et al., 2012).

É uma espécie que necessita de grandes áreas para sua preservação, logo, a ação antrópica destruindo biomas, sobretudo a Mata Atlântica e a Amazônia, gera um risco elevado para a preservação de *S. tyrannus*, fazendo com que alguns indivíduos ataquem pequenas fazendas e sejam comumente perseguidos por agricultores. Não possui predador natural quando adulto (SICK, 1997; MENQ, 2018). De acordo com a *Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (The IUCN Red List*

of *Threatened Species*, 2016), o gavião-pegamacaco está classificado como “Pouco Preocupante” quanto ao seu risco de extinção.

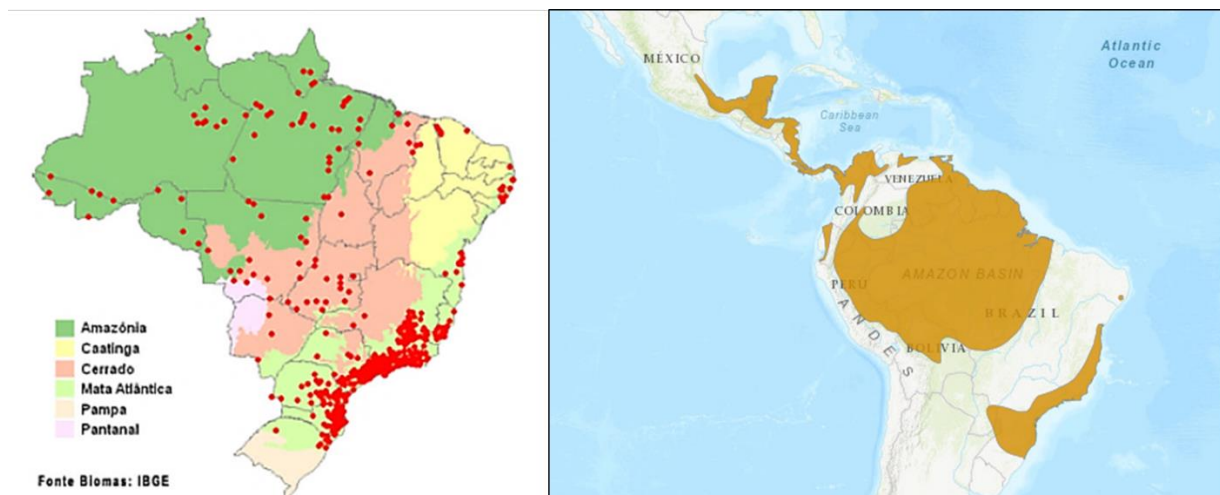


Figura 7: Distribuição geográfica de *Spizaetus tyrannus* em território brasileiro baseado nos relatos de observadores (esquerda), e em demais países das Américas Central e do Sul. No Brasil, ocorre sobretudo na faixa marítima que vai do sul da Bahia até o Rio Grande do Sul (Fonte: adaptado de MENQ, 2018; adaptado de *The IUCN Red List of Threatened Species*, 2016).

1.5- CITOGENÉTICA DE AVES

Entre os vertebrados, depois dos peixes, as aves representam o grupo mais especioso, com cerca de 9.000 espécies descritas (HOWARD & MOORE, 1991). No entanto, de acordo com BARROWCLOUGH et al. (2016), esse é um número bastante subestimado, uma vez que a quantidade estimada de espécies de Aves gira em torno de 18.000, incluindo as espécies já extintas. Segundo a última atualização do Comitê Brasileiro de Registros de Aves (CRBO, 2014), o Brasil apresenta um total de 1901 espécies descritas, o que coloca o país como um dos mais ricos e diversos no que diz respeito às espécies de Aves, juntamente com Colômbia e Peru.

Em termos de estudos citogenéticos, a Classe Aves é uma das menos conhecidas, apesar da grande quantidade de espécies. No Brasil, até o ano de 2006, apenas cerca de 14% das espécies presentes em nosso território tinham

seu cariótipo definido, sendo que três ordens e 38 famílias de Aves ainda não tinham nenhum tipo de informação publicada à cerca da organização de seus cromossomos. Isso pode ser relacionado ao pequeno número de citogeneticistas voltados para o estudo desse grupo, seja pela dificuldade de se obter material ou pelas barreiras impostas pelas próprias características do cariótipo aviário: elevado número diploide e muitos pares de microcromossomos (DOS SANTOS & GUNSKI, 2006).

As aves são caracterizadas por apresentarem um genoma pequeno e compacto em relação a outros vertebrados, com poucas sequências de DNA repetitivo, altas taxas de recombinação e *introns* menores que outros organismos, como répteis e mamíferos (Figura 8) (ELLEGREN, 2005; ZHANG et al., 2014).

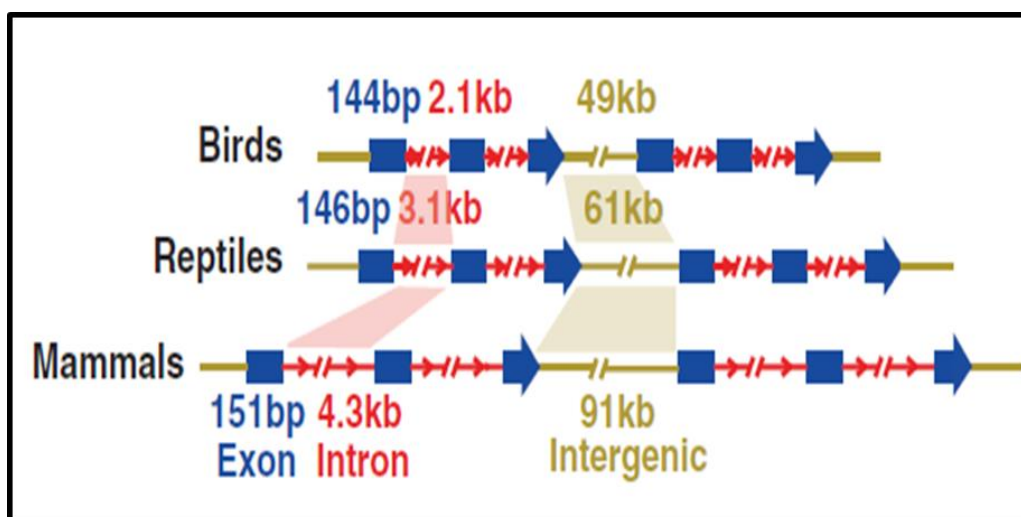


Figura 8: Comparação do tamanho médio de íntrons, éxons e sequências intergênicas entre aves, répteis e mamíferos. Mostrando que em Aves esses elementos são menores e menos frequentes (Fonte: adaptado de ZHANG et al., 2014).

Outra característica peculiar das aves é a ocorrência de um sistema ZZ/ZW de cromossomos sexuais presente em todas as espécies, onde a fêmea representa o sexo heterogamético (cromossomos sexuais ZW) e o macho representa o homogamético (cromossomos sexuais ZZ) (CHRISTIDIS, 1989; DE OLIVEIRA & JORGE, 2000).

As aves também apresentam um número diploide consistente, pois 63% delas apresentam o $2n=74-86$ e 24% têm o $2n=66-74$, embora existam aves que tenham um número cromossômico bem menor, como *Burhinus oedicnemus* (Charadriiformes, $2n=40$), ou muito alto, como *Corythaixoides concolor* (Cuculiformes, $2n=136-142$), que são considerados exemplos raros (CHRISTIDIS, 1990). O cariótipo típico é do tipo bimodal (Figura 9), consistindo em um grande número de microcromossomos (± 32 pares) e de poucos macrocromossomos (± 8 pares) (TEGELSTROM et al., 1983).

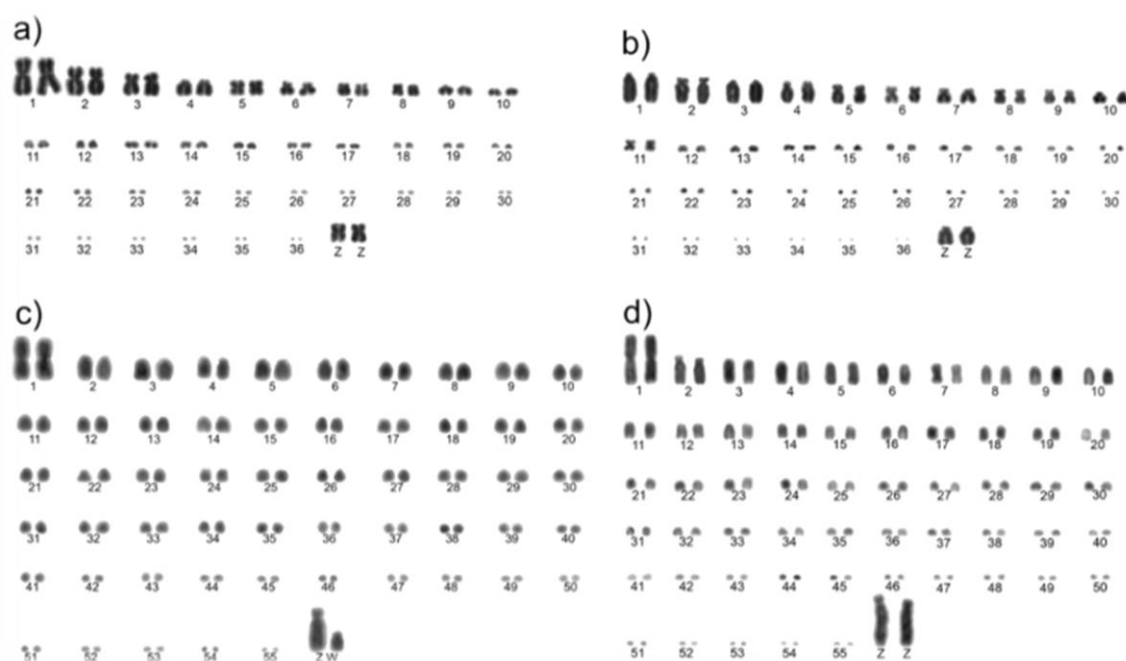


Figura 9: Cariótipo padrão da maioria das aves já estudadas, reforçando seu caráter bimodal, com poucos pares de macrocromossomos e muitos pares de microcromossomos. Caráter que se repete em espécies das mais variadas ordens: A) *Phalacrocorax brasilianus* (Suliformes); B) *Hydropsalis torquata* (Caprimulgiformes); C) *Pteroglossus inscriptus* (Piciformes); D) *Trogon surrucura* (Trogoniformes) (Fonte: adaptado de KRETSCHMER et al., 2021).

No que se refere aos microcromossomos, eles são considerados uma característica universal do cariótipo de todas as aves e teriam evoluído de 100 à 250 milhões de anos atrás. Diferentemente do que se imaginava, os microcromossomos têm um papel fundamental no genoma das aves, apresentam centrômeros e telômeros, são hiperacetilados, se replicam antes e durante o processo de divisão celular, são ricos em ilhas CpG e abrigam cerca de 50% dos genes existentes, mesmo representando apenas 25-30% do

genoma, uma vez que possuem densidade gênica pelo menos duas vezes maior que os macrocromossomos. Esses pequenos elementos também estão presentes em outras classes de vertebrados, como peixes e répteis (RODIONOV, 1996; McQUEEN et al., 1996, 1998; SMITH et al., 2000).

Segundo BURT (2002), o processo de diferenciação entre macro e microcromossomos pode ser explicado como produto da ação evolutiva que tende a minimizar o conteúdo de DNA e aumentar a taxa de recombinação. Para ele, os microcromossomos, em sua maioria, são oriundos de fissões e podem representar sintonias ancestrais entre peixes, répteis, aves e mamíferos.

1.5.1- Cariótipo Ancestral de Aves

O cariótipo das aves é mais conservado do que outros grupos, mantendo os cromossomos praticamente intactos durante a evolução, contrastando, por exemplo, com a alta taxa de variação observada no cariótipos dos mamíferos (ELLEGREN, 2010).

No entanto, o fato do cariótipo de Aves variar pouco em número e rearranjos intercromossômicos, não significa que o mesmo é imune a qualquer tipo de variação cromossômica. Segundo SKINNER & GRIFFIN (2012), o genoma aviário é repleto de regiões suscetíveis a serem pontos de quebra, sendo que um terço dessas regiões pode ser recorrente em diferentes linhagens. Estudos de sequenciamento e mapeamento completo de espécies como o peru (*Meleagris gallopavo*) e o mandarim (*Taeniopygia guttata*) (Figura 10) mostraram um número surpreendentemente alto de rearranjos intracromossômicos, apesar dos blocos sintênicos permanecerem bem conservados de um modo geral, que estão diretamente associados à evolução cromossômica em Aves (GRIFFIN et al., 2008; VOLKER et al., 2010).

Corroborando com evidências de DNA mitocondrial, que colocam as Aves no mesmo grupo evolutivo de crocodilos e tartarugas, a comparação de mapas citogenéticos entre o genoma do galo doméstico (*Gallus gallus*) e o conteúdo de cDNA da tartaruga chinesa de casco mole (*Pelodiscus sinensis*), mostra uma

homologia altamente conservada entre as espécies, sendo os cinco maiores pares praticamente equivalentes entre si, além do cromossomo 6q da tartaruga ser homólogo ao cromossomo Z do galo (MATSUDA et al., 2005).

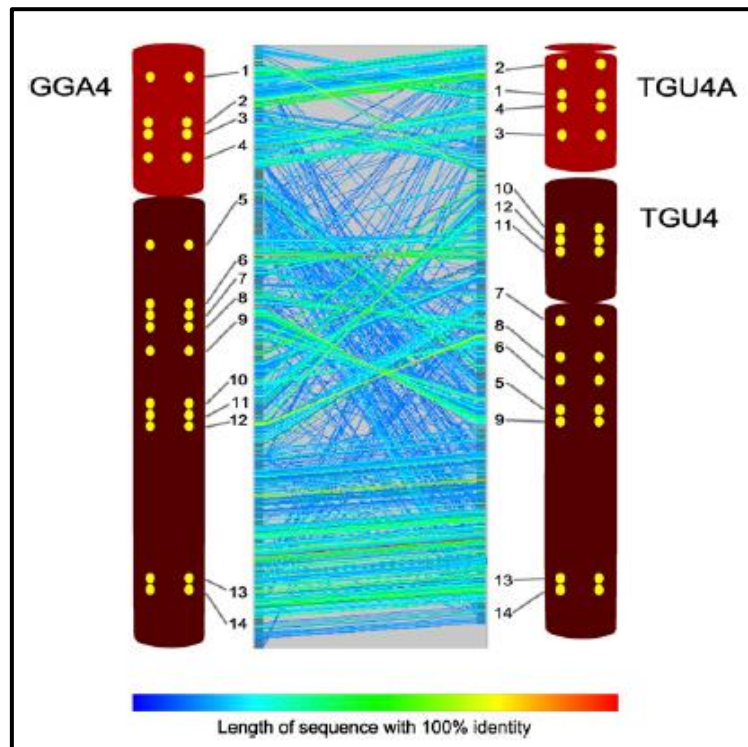


Figura 10: Análise comparativa entre o cromossomo 4 de *Gallus gallus* (GGA4) e seus homólogos no mandarim, *Taeniopygia guttata* (TGU4 e TGU4a). Os números indicam a posição de BACs nas duas espécies (Fonte: adaptado de VOLKER et al., 2010).

A partir de informações obtidas de padrão de bandeamento e pintura cromossômica comparativa, chegou-se ao cariótipo hipotético do ancestral comum das aves (PAK, $2n=80$), na qual o cariótipo do galo doméstico (GGA) é considerado aquele mais próximo à organização ancestral (Figura 11), tendo como única diferença uma fissão no 4º par, que corresponderia a dois cromossomos no cariótipo do ancestral (GRIFFIN et al., 2007; ELLEGREN, 2010).

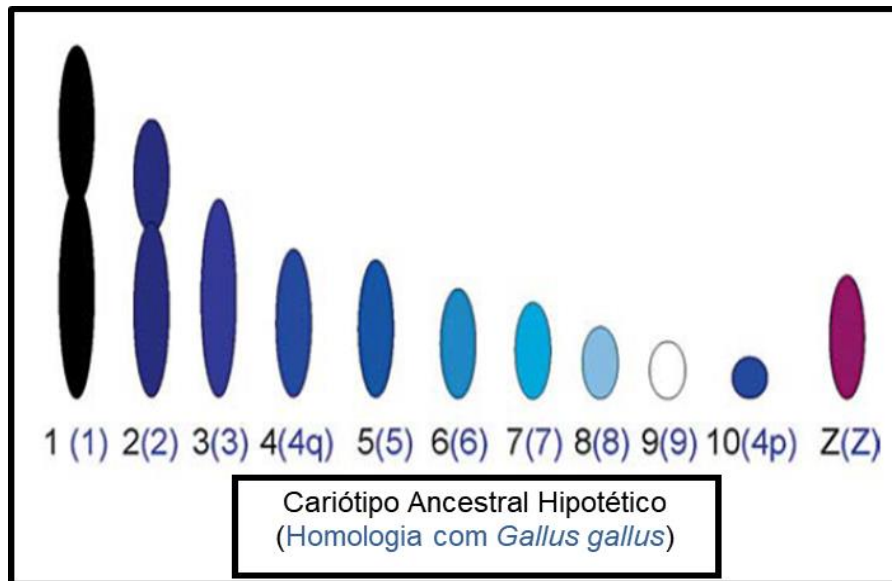


Figura 11: Comparação entre os macrocromossomos de *Gallus gallus* (números pretos) e o cariótipo ancestral hipotético comum de Aves (números em azul). (Fonte: adaptado de GRIFFIN et al., 2007).

Estudos mais recentes de ROMANOV et al. (2014) corroboram com esta ideia por meio de uma comparação realizada entre genomas completos de 20 espécies de diferentes ordens, na qual, após a divisão da Super-Ordem Neognathae em Galloanserae e Neoaves, o cariótipo do galo foi aquele que sofreu menos alterações cromossômicas em relação ao cariótipo hipotético ancestral de Aves (Figura 12).

Até mesmo aves mais recentes evolutivamente, como o mandarim (Ordem Passeriformes) e o periquito-australiano (Ordem Psittaciformes), apresentaram uma taxa de rearranjos intracromossômicos muito maior após a divergência Passeriformes-Psittaciformes, caracterizados por inversões que mantêm os grupos sintênicos conservados, porém altera a ordem na qual os genes estão organizados nos cromossomos.

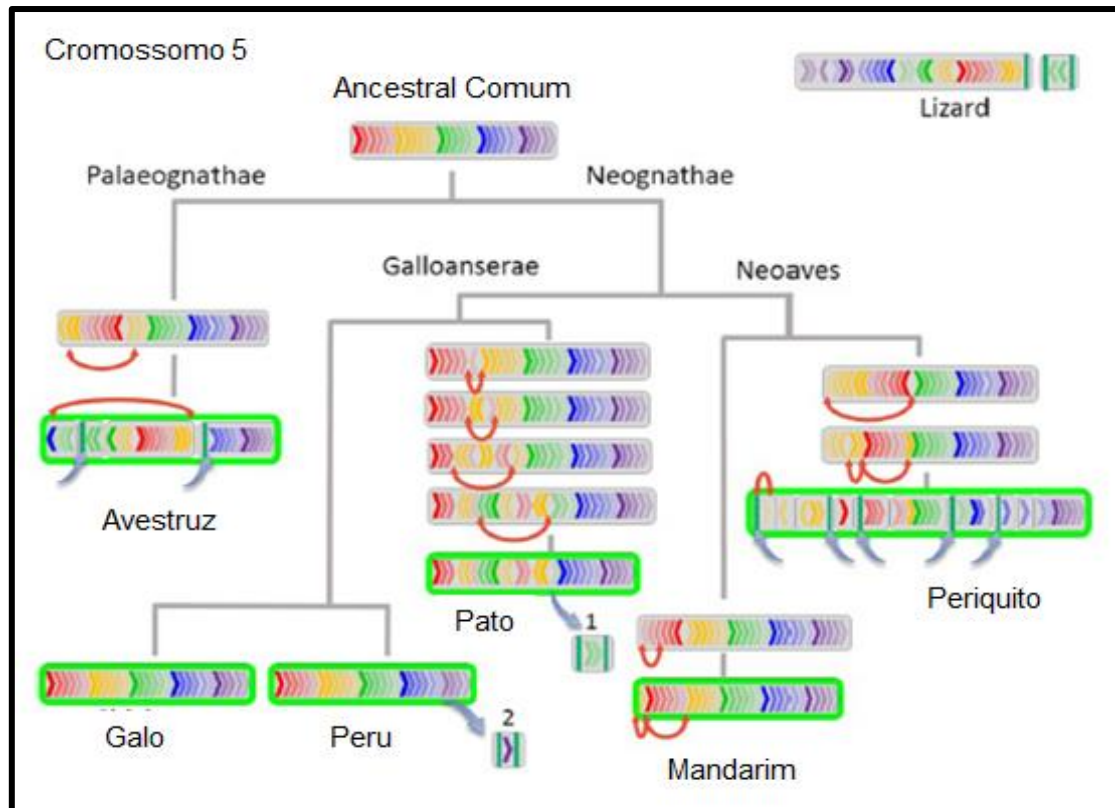


Figura 12: Organização ancestral exemplificada pelo cromossomo 5 e seus ortólogos em seis espécies de diversas Ordens (avestruz, galo, peru, pato, mandarim e periquito-australiano) mostrando o alto grau de conservação de *Gallus gallus* em relação ao ancestral comum de Aves. Setas vermelhas indicam inversões e setas azuis indicam translocações (Fonte: adaptado de ROMANOV et al., 2014).

1.5.2- Dados Citogenéticos da Família Accipitridae

As aves de rapina encontram-se entre os grupos de aves com o maior número de espécies analisadas citogeneticamente, devido principalmente à atraente diversidade cariotípica observada, incomum para a maioria das ordens de aves, que geralmente apresentam cariótipos muito semelhantes entre si, sem grandes variações no número ou fórmula cromossômica. As espécies da família Accipitridae apresentam números cromossômicos relativamente baixos, entre 50-70, e poucos pares de microcromossomos (DE BOER, 1990; BED'HOM, 1999; AMARAL & JORGE, 2003; DOS SANTOS & GUNSKI, 2006).

Baseado em estudos de citogenética clássica, a principal hipótese para uma reorganização tão grande no cariótipo das aves de rapina era a ocorrência

de fusões envolvendo os microcromossomos. Mais tarde tal hipótese se confirmou com o advento de novas ferramentas e tecnologias da citogenética molecular e citogenômica (KRESTCHMER et al., 2018).

No Brasil, poucas são as espécies da Ordem Accipitriformes que apresentam seus cariótipos definidos, o que não condiz com a riqueza e diversidade de espécies que habitam o território nacional. O Quadro I mostra as espécies brasileiras já cariotipadas.

Quadro I: Número diploide (2n), morfologia dos cromossomos sexuais Z e W e referências bibliográficas das espécies da família Accipitridae estudadas citogeneticamente que habitam o território brasileiro. Em negrito está a nossa espécie de interesse *Spizaetus tyrannus*. Legenda: m = metacêntrico; sm = submetacêntrico.

Espécie	2n	Z	W	Fonte
<i>Geranospiza caerulescens</i>	66	sm	sm	WILLIAMS & BENIRSCHKE, 1976
<i>Morphnus guianensis</i>	54	sm	m	WILLIAMS & BENIRSCHKE, 1976
<i>Buteo swainsoni</i>	68	m	-	SCHMUTZ et al., 1993
<i>Buteo platypterus</i>	68	m	-	SCHMUTZ et al., 1993
<i>Parabuteo unicinctus</i>	68	sm	m	SCHMUTZ et al., 1993
<i>Harpia harpyja</i>	58	sm	sm	HOFFMANN et al., 1976
<i>Spizaetus tyrannus</i>	68	sm	m	TAGLIARINI et al., 2007
<i>Leucopternis albicollis</i>	66	sm	sm	DE OLIVEIRA et al., 2010
<i>Rupornis magnirostris</i>	68	sm	m	DE OLIVEIRA et al., 2013
<i>Asturina nítida</i>	68	sm	sm	DE OLIVEIRA et al., 2013
<i>Buteogallus meridionalis</i>	68	sm	sm	DE OLIVEIRA et al., 2013

Dentre essas espécies se encontra o gavião-pega-macaco, (*Spizaetus tyrannus*), que teve seu cariótipo descrito por (TAGLIARINI et al., 2007) e apresentou número diploide 2n=68, com a grande maioria de seus cromossomos de dois braços, incluindo a par sexual, e apenas 4 pares considerados microcromossomos, o que é comum em aves de rapina.

1.6- CITOGENÉTICA MOLECULAR

As técnicas de citogenética molecular são baseadas na Hibridização *in situ* com Fluorescência (FISH), que permitiu a união da citogenética clássica aos dados de genética molecular. Nessa técnica, sequências de DNA são utilizadas como sondas, permitindo a localização e identificação de cromossomos ou mapeamento de genes no cariótipo (WOLFF & SCHWARTZ, 2005). De acordo com RENS et al. (2006) a técnica de FISH é uma ferramenta muito importante na comparação entre espécies diferentes (Zoo-FISH), através da determinação de mapas de homologia e construção de cariótipos ancestrais.

Segundo GROENEN et al. (2000), o padrão de cariótipo de aves a ser usado como base para comparação com as demais espécies é o do galo doméstico (GGA). Esta foi a primeira espécie de ave a ter seu genoma (THE INTERNATIONAL CHICKEN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2004) e seu cariótipo (MASABANDA et al., 2004) totalmente mapeados e publicados, além de seu tamanho e organização serem bastante similares à maioria das demais aves já estudadas.

Além disso, as sondas cromossomo-específicas de macrocromossomos de GGA foram, durante muito tempo, as únicas a serem usadas em experimentos de hibridização entre aves, justamente por apresentar um mapeamento gênico muito bem desenvolvido, o que facilita estudos de pintura comparativa em espécies não apenas de Aves das mais variadas ordens (revisado por GRIFFIN et al., 2007), como também em algumas espécies de répteis como a tartaruga-de-orelha-vermelha (*Trachemys scripta elegans*) e o crocodilo-do-nilo (*Crocodylus niloticus*) (KASAI et al., 2012).

Outras metodologias envolvem a utilização de sondas de microcromossomos de *Gallus gallus*, que, por serem muito semelhantes em tamanho e conteúdo, dificultam a obtenção de sondas individuais, sendo geralmente usadas em *pools* contendo dois ou mais cromossomos (GRIFFIN et al., 1999). Adicionalmente, a utilização de BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*), que apresentam uma estrutura ilustrada na Figura 13, aumenta a eficiência da pintura cromossômica, pois esse tipo de sonda apresenta uma precisão de nível gênico, identificando de forma exata em qual cromossomo está

inserida determinada sequência ou segmento cromossômico (LITHGOW et al., 2014).

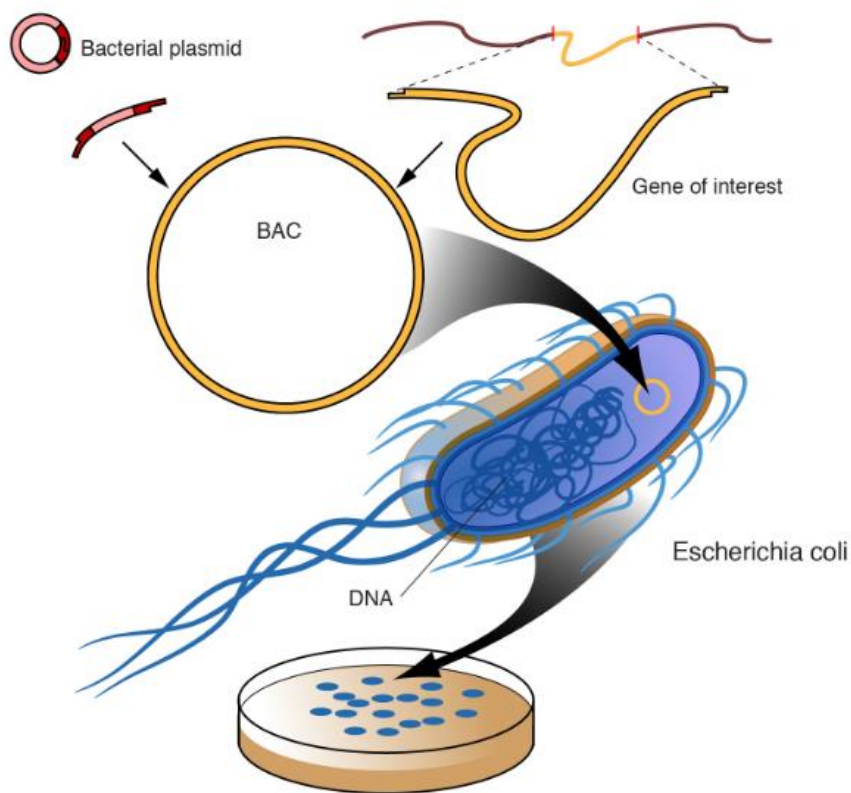


Figura 13: Estrutura de um BAC. Uma sequência de DNA de interesse pode ser inserida numa bactéria por meio de um plasmídeo, e a medida que a bactéria vai se multiplicando, a sequência de interesse vai se amplificando até ser isolada para ser utilizada como base para produzir uma sonda, dentre outras diversas finalidades (Fonte: adaptado de GREEN [s.d]).

A utilização de bibliotecas de clones de BACs surge como uma ferramenta importante para estudos citogenômicos, sobretudo para delimitação de mapas cromossômicos. Estudos de LUO et al., (2006) determinaram a estrutura da região genômica referente ao receptor de andrógeno em Aves com a construção e utilização de BACs de “zebra finch” ou mandarim (*Taeniopygia guttata*). O condor-da-califórnia é outra espécie que também tem uma biblioteca de BACs para estudos genômicos em Aves (ROMANOV et al., 2006).

Logo, a utilização de sondas cromossomo-específicas juntamente com sondas de clones de BACs, sobretudo para os cromossomos menores do cariótipo aviário, se apresenta como uma alternativa bastante interessante uma

vez que pode identificar em definitivo à qual cromossomo ou região uma determinada sequência está associada, diminuindo assim uma das principais barreiras da citogenética de aves, qual seja, a identificação correta e exata dos muitos pares de microcromossomos. E de que forma essa precisão pode alterar as análises de evolução cromossômica.

Para a utilização correta desta ferramenta é necessário que exista uma biblioteca de BACs muito bem definida e uma montagem de genomas, de preferência um sequenciamento de genoma completo, da espécie na qual se tem interesse em trabalhar. Para estudos na Classe Aves, a biblioteca de clones de BACs padrão a ser usada é a do galo doméstico (GGA), justamente por preencher os requisitos citados (CROOIJMANS et al., 2000). Estudos de mapeamento *cross-species* com sondas de BAC ainda apresentam barreiras, com resultados que variam em torno de 70% de sucesso no peru-selvagem (*Meleagris gallopavo*) e 40% no pato-real (*Anas platyrhynchos*), o que pode ser um indicativo que a distância filogenética entre as espécies tenha um papel crucial para o sucesso desse método.

1.6.1- Pintura Cromossômica em Aves de Rapina

Por ser aquela que mais se difere de *Gallus gallus*, apresentando um número diploide menor e uma pequena quantidade de microcromossomos, a ordem Accipitriformes gera bastante interesse em estudos de pintura cromossômica (DE BOER, 1990; DE OLIVEIRA et al., 2010).

A primeira ave de rapina a ter seu mapeamento cromossômico descrito foi o gavião-real (*Harpia harpyja*) (Figura 14), na qual foi mostrado, por meio da utilização de sondas cromossomo-específicas de *Gallus gallus*, uma série de rearranjos caracterizados pela presença de várias fissões envolvendo os maiores pares (homólogos aos pares GGA 1-5) e várias fusões envolvendo os microcromossomos (DE OLIVEIRA et al., 2005).

No entanto, algumas dúvidas ainda pairavam no ar em relação a este mapeamento no que diz respeito à quantidade de marcações de algumas

hibridizações devido à utilização de sondas misturadas em um único *pool*. Dúvidas que foram sanadas com a utilização de sondas cromossomo-específicas individuais para os 10 primeiros pares de GGA, além de uma comparação feita com outra o outro membro da subfamília Harpiinae e espécie-irmã do gavião-real, o falso-uirapuru (*Morphnus guianensis*), mostrando que as espécies neotropicais das águias-harpas apresentam rearranjos com pontos de quebra recorrentes e quatro sinapomorfias, ou seja, rearranjos compartilhados entre as espécies desta subfamília (CARVALHO, 2017).

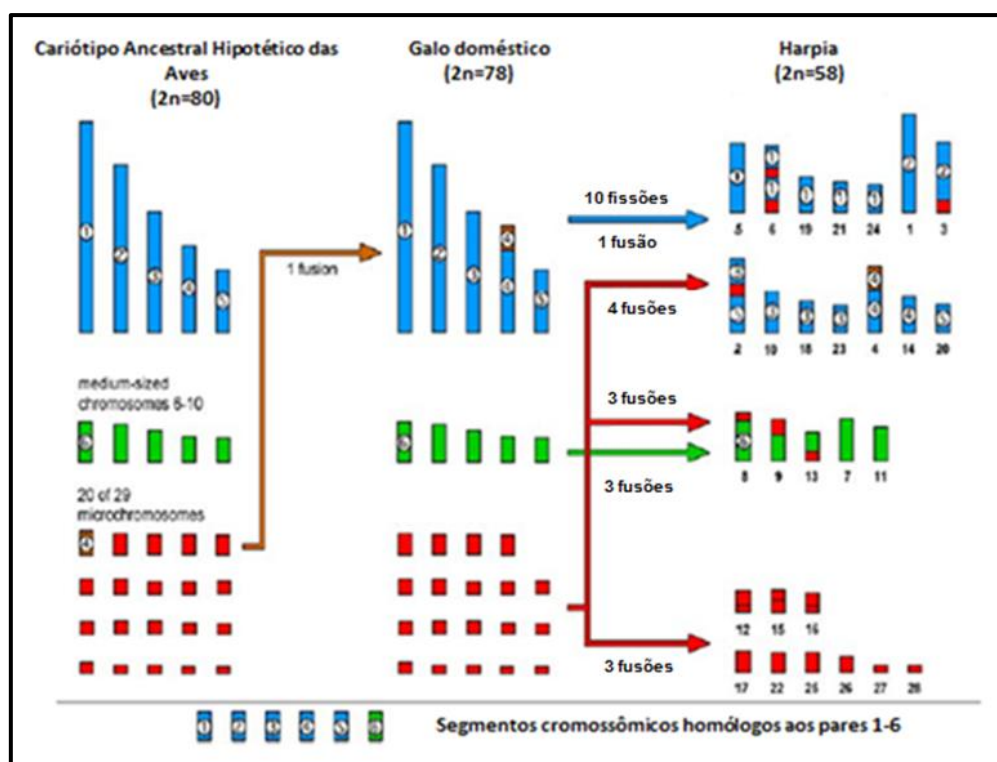


Figura 14: Ilustração mostrando os rearranjos cromossômicos ocorridos no cariótipo do gavião-real (*Harpia harpyja*), em comparação com o cariótipo ancestral das aves. Os primeiros cinco pares sofreram 10 fissiones e 1 fusão, os pares 6-10 apresentam 3 fusões com microcromossomos, enquanto 19 pares de microcromossomos sofreram 3 fusões entre si. (Fonte: adaptado de DE OLIVEIRA et al., 2005).

Uma série de estudos complementares de pintura cromossômica comparativa com sondas cromossomo-específicas de GGA vem sendo desenvolvidos. De acordo com o último levantamento referente aos dados de pintura cromossômica com sondas de *Gallus* disponíveis na literatura, realizado por DEGRANDI et al. (2020), menos de 1% das espécies com algum tipo de dado citogenético publicado foram submetidas às técnicas de citogenética

molecular comparativa. De 1.067 espécies encontradas, apenas 96 foram mapeadas com sondas cromossomo-específicas de GGA.

Até o presente momento já foram estabelecidas homologias entre *Gallus gallus* e mais de 65 espécies de 12 ordens diferentes, sendo 11 dessas espécies pertencentes à família Accipitridae, sendo elas: *Harpia harpyja*, *Rupornis magnirostris*, *Asturina nitida*, *Buteogallus meridionalis*, *Leucopternis albicollis*, *Buteo buteo*, *Gyps himalayensis*, *Nisaetus nipalensis orientalis*, *Gyps rueppelli*, *Gyps fulvus*, *Gypaetus barbatus* e *Morphnus guianensis* (DE OLIVEIRA et al., 2005, 2010, 2013; NANDA et al., 2006; NISHIDA et al., 2013; NIE et al., 2015; CARVALHO, 2017).

Todas essas espécies de Accipitrídeos são caracterizadas por um intenso rearranjo envolvendo fissões nos primeiros cinco pares de GGA além de muitas fusões entre macrocromossomos (ou apenas segmentos deles) e microcromossomos, o que contribui para cariótipos com mais cromossomos de dois braços e com números diploides menores apesar das inúmeras fissões envolvendo os maiores pares (revisado por KRETSCHMER et al., 2018).

1.6.2- Sondas Alternativas para Pintura Cromossômica em Aves

Devido ao alto nível de reorganização do cariótipo de aves de rapina, as sondas de GGA sozinhas não são capazes de responder todas as perguntas impostas pela organização cariotípica dos accipitrídeos. Nesse contexto, sondas cromossomo-específicas de outras espécies com cariótipos distintos surgem como alternativa para uma abordagem mais completa quando se fala em citotaxonomia em Aves (KRETSCHMER et al., 2018).

Atualmente, além das pioneiras de *Gallus gallus*, existem sondas cromossomo-específicas para cinco espécies de aves: *Burhinus oedicephalus* (BOE) 2n=42, *Leucopternis albicollis* (LAL) 2n=66, *Gyps fulvus* (GFU) 2n=66, *Zenaidura macroura* (ZAU) 2n=76 e *Myiopsitta monachus* (MMO) 2n=48, que se apresentam como novas ferramentas para estudos de citotaxonomia em Aves

(NIE et al., 2009, 2015; DE OLIVEIRA et al., 2010; KRETSCHMER et al., 2018; FURO et al, 2020).

As sondas de *B. oedicnemus* (BOE), conhecido popularmente como alcavirão ou maçarico, e pertencente à família Burinidae (Charadriiformes), já foram utilizadas em 8 espécies de 6 ordens diferentes. Por apresentar uma alta homologia com *G. gallus*, seus resultados não chamaram muita atenção destacando-se apenas rearranjos envolvendo microcromossomos (NIE et al., 2009; HANSMANN et al., 2009).

O gavião-branco (*Leucopternis albicollis*) foi a primeira ave de rapina a ter sondas cromossomo-específicas produzidas (DE OLIVEIRA, et al., 2010). Tais sondas são capazes de identificar rearranjos intracromossômicos referentes à possíveis sinapomorfias relacionadas às regiões dos macrocromossomos de *Gallus gallus*, que são incapazes de serem detectadas por sondas de *G. gallus* e *B. oedicnemus*. A homologia entre as sondas de *L. albicollis* e *G. gallus* (Figura 15) foi obtida por meio da técnica de pintura cromossômica recíproca, identificando homologias subcromossômicas entre as duas espécies.

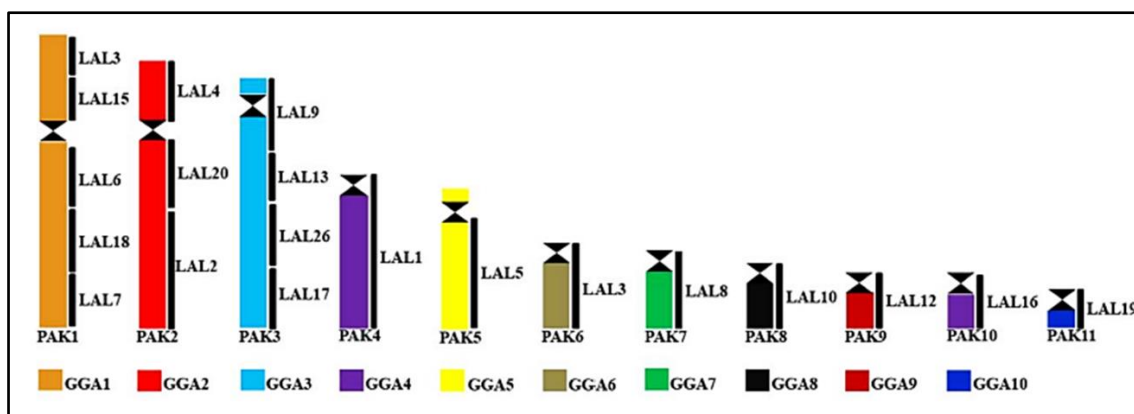


Figura 15: Mapa de homologia entre *Gallus gallus* (GGA), *Leucopternis albicollis* (LAL) e o Cariótipo Ancestral Hipotético de Aves (PAK, de *Putative Ancestor Karyotype*), proposto a partir do estudo de pintura cromossômica comparativa de diversas espécies de Aves de diferentes ordens. As marcações com sondas cromossomo-específicas de LAL são indicadas pelas barras verticais ao lado dos cromossomos de PAK. As cores representam os cromossomos de GGA (Fonte: adaptado de KRETSCHMER et al., 2018).

Foi proposto que o gênero do gavião-branco fosse modificado para *Pseudastur*, passando a se chamar *Pseudastur albicollis*. Apesar de a mudança

apresentar grande aceitação atualmente, continuaremos nos referindo ao gavião-branco como *Leucopternis albicollis* ou LAL, para facilitar a compreensão, uma vez que todos os dados presentes na literatura utilizam a nomenclatura antiga.

As sondas de LAL já foram utilizadas com sucesso na determinação de pontos de quebra e identificação de segmentos envolvidos rearranjos em espécies das mais variadas Ordens como Psittaciformes, Gruiformes, Charadriiformes, Passeriformes (Famílias Turdidae, Thraupidae e Tyrannidae), além das próprias aves de rapina da Ordem Accipitriformes (KRETSCHMER et al., 2014, 2015; FURO et al., 2015a, b; SANTOS et al., 2015; RODRIGUES et al., 2017).

As sondas de *Gyps fulvus*, conhecido como abutre-fouveau ou grifo, representante da Família Cathartidae, foram analisadas apenas em apenas três espécies (*Gyps himalayensis*, *Buteo buteo* e *Burhinus oedipnemos*). Seus resultados mais significativos até o momento se referem à filogenia das aves de rapina. Apesar de ser um accipitrídeo com $2n=66$, os poucos resultados com tais sondas impedem uma abordagem mais ampla sobre o comportamento e distribuição das mesmas (NIE et al., 2015).

As sondas de *Zenaida auriculata*, uma pomba campestre da Ordem Columbiformes, apresentam uma grande homologia com as sondas de GGA, porém suas marcações se apresentaram uma intensidade maior não somente em espécies mais próximas como o próprio *Gallus*, mas em espécies mais distantes como o *Gyps fulvus*, a outra espécie na qual esse conjunto de sondas foi testado. Logo, as sondas de ZAU são indicadas para uso em espécies no qual as sondas de gallus apresentem alguma dificuldade nas hibridizações.

Já as sondas de *Myiopsitta monachus*, um pequeno periquito popularmente conhecido como caturrita (Psittaciformes), identificaram um rearranjo que ainda não havia sido descrito na literatura, muito em decorrência de seu número diploide extremamente baixo e incomum ($2n=48$), uma fusão de seu cromossomo 10 com a região homóloga à GGA5. No entanto essas sondas precisam ser mais difundidas no intuito de analisar se esse rearranjo é

compartilhado por outras espécies da Ordem. As sondas de MMO foram usadas apenas em outra espécie de arara (*Ara macao*).

O presente trabalho visa oferecer, além do mapeamento citogenômico completo da espécie tanto com sondas cromossomo-específicas como clones de BACs de *Gallus*, uma nova opção para estudos citotaxonômicos em aves com produção de sondas cromossomo-específicas de *Spizaetus tyrannus* para que possa servir na obtenção de novas informações acerca da evolução cromossômica não apenas em aves de rapina, mas como também nas mais variadas espécies e ordens da Classe Aves.

2- OBJETIVOS

2.1- OBJETIVO GERAL

Realizar o mapeamento genômico comparativo entre gavião-pegamacaco (*Spizaetus tyrannus*) e *Gallus gallus*, e produzir um novo conjunto de sondas para auxiliar em estudos de citotaxonomia em Aves.

2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as homologias entre o cariótipo de *Spizaetus tyrannus* e *Gallus gallus*.
- Determinar as sinapomorfias e autapomorfias entre *Spizaetus tyrannus* e outras aves de rapina da família Accipitridae, a partir da comparação dos dados de mapeamento comparativo com *Gallus gallus*.
- Identificar o comportamento e a importância dos microcromossomos no processo de diversificação cariotípica, a partir dos dados das hibridizações com clones de BACs.
- Inferir sobre a evolução cromossômica na família Aquilinae a partir de uma análise comparativa entre *Spizaetus tyrannus* com *Nisaetus nipalensis orientalis*, única espécie da família com dados de mapeamento já publicados.
- Produzir um conjunto de sondas cromossomo-específicas de *Spizaetus tyrannus* como uma nova ferramenta para análises citogenômicas em Aves.
- Tentar traçar possíveis caminhos e mecanismos pelos quais o processo de evolução cariotípica foi submetido durante a diversificação das aves de rapina de habitat diurno.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho faz parte de um projeto maior intitulado **“CITOTAXONOMIA E EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA EM AVES ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DE PINTURA CROMOSSÔMICA”**, submetido ao CEPAE-UFPA e aprovado sob o número 170-2013, e licença SISBIO nº 68443-1.

3.2- OBTENÇÃO DE AMOSTRAS E CULTIVO DE CÉLULAS

As amostras para o cultivo de células foram obtidas de biópsias de pele retiradas da parte inferior das asas e de penas em crescimento coletadas de duas fêmeas de *Spizaetus tyrannus*. As aves eram mantidas no Criadouro Gavião-Real localizado na cidade de Capitão Poço, no Estado do Pará, a cerca de 260km da capital Belém (Figura 16), e o procedimento de coleta foi acompanhado por veterinários da própria instituição. Atualmente esse criadouro se encontra desativado.



Figura 16: Localização geográfica do município de Capitão Poço, onde as amostras foram coletadas (Fonte: adaptado de DE ABREU, 2006).

Para o cultivo celular de fibroblastos, utilizou-se o protocolo de SASAKI et al. (1968) com algumas modificações:

- As biópsias de pele e os bulbos de pena foram colocados em uma placa de Petri estéril, e com uso de pinças e bisturi o material foi fragmentado em pequenos pedaços para facilitar a dissociação tecidual. No caso dos bulbos, estes foram primeiramente abertos para que a polpa fosse retirada.
- Em seguida esse tecido foi transferido para outra placa e acrescentados 3 ml de colagenase tipo IV a 0,1%. O material foi então transferido para um tubo de centrifuga onde passou por um processo de incubação por 1 hora a 37°C.
- Após esse tempo foram acrescentados 2 ml de meio de cultivo com 10% de soro bovino fetal, o material foi ressuspendido e então centrifugado à 1000 rpm por 10 minutos.
- Após essa etapa o sobrenadante foi descartado e 5 ml de meio foram adicionados. O material foi então ressuspendido e transferido para uma garrafa de cultura, que ficou incubada em estufa a 37°C. A partir de então iniciou-se a cultura.
- Quando foi possível observar um bom número de células em mitose nas garrafas após trocas de meio e repiques, algumas seguiram para extração de cromossomos enquanto outras foram criopreservadas para experimentos futuros.

Para realização do presente projeto, utilizamos as ampolas criopreservadas, que foram descongeladas e cultivadas nas mesmas condições descritas anteriormente (em estufa a 37°C, com meio de cultivo DMEM enriquecido com 10% de soro bovino fetal).

3.3- OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS METAFÁSICOS

Quando as garrafas de cultura se apresentaram confluentes e com um bom número de células em mitose, em torno de 30 ou mais células, foi iniciada a extração de cromossomos metafásicos.

- Foram adicionados 100 µl de colchicina à garrafa de cultura e o material ficou incubado durante 1 hora a 37°C.
- Em seguida foi acrescentada tripsina à garrafa para desagregar as células da parede da mesma, que foi lavada com solução salina Hank's. O material contido na garrafa foi então transferido em sua totalidade para um tubo Falcon e centrifugado à 1000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante descartado.
- Foram adicionados 10 ml de solução hipotônica de cloreto de potássio 0,075 M mantido previamente em estufa a 37°C por uma hora. Em seguida o material foi ressuspensionado e incubado a 37°C por 15 minutos.
- Logo após, 1 ml de fixador Carnoy (metanol e ácido acético 3:1) foi acrescentado ao material, que foi então ressuspensionado e centrifugado por 10 minutos à 1000 rpm.
- O sobrenadante foi novamente descartado e então acrescentados 5 ml de fixador para a primeira lavagem do material, na qual foi ressuspensionado e centrifugado novamente por 10 minutos à 1000 rpm.
- Esta etapa de lavagem foi repetida no mínimo mais duas vezes, dependendo da qualidade das metáfases observadas, e o tubo então mantido com 2 ml de fixador e acondicionado à uma temperatura de -20°C para posteriores experimentos.

Para o preparo de lâminas contendo o material biológico, 3 ml de fixador gelado foram adicionados ao tubo Falcon, o material então ressuspensionado e centrifugado por 10 minutos à 1000 rpm. Esse padrão é repetido sempre que se pingava o material na lâmina. Após essa lavagem, um pingo do material foi despejado no centro da lâmina, com uso de uma pipeta, secando à temperatura ambiente.

3.4- CARACTERIZAÇÃO DO CARIÓTIPO

Para caracterização do cariótipo foi utilizada a coloração convencional com Giemsa (Eozina azul de metileno) para determinar o número e a morfologia dos cromossomos.

- Solução de Giemsa a 5% (0,5 ml de corante diluído em 10 ml de tampão fosfato pH 6,8) é despejada sobre a lâmina contendo o material cromossômico por um período 5 a 8 minutos.
- Após esse tempo a lâmina é lavada com água destilada e seca à temperatura ambiente.

Em seguida as melhores metáfases foram capturadas em microscópio óptico de luz e fotografadas com uma câmera digital acoplada ao mesmo, utilizando o software GeneASIs, da Applied Spectral Imaging. A ordenação dos cromossomos para padronização do cariótipo ocorrerá de acordo com o tamanho e a posição do centrômero dos mesmos (GUERRA, 1986).

3.5- CITOMETRIA DE FLUXO

A separação dos cromossomos por citometria de fluxo foi realizado na Universidade de Cambridge, utilizando-se um equipamento do modelo FACStar Plus (Becton Dickinson). Para isso, no processo de obtenção das preparações cromossômicas, após a hipotonização das células por 15 minutos, o material foi centrifugado a 289 g por 5 min. O sedimento celular foi ressuspenso suavemente em 3 ml de um tampão de isolamento de poliamina gelado (PAB: Tris 15 mM, EDTA 2 mM, EGTA 0,5 mM, KCl 80 mM, ditiotretitol 3 mM, Triton X-100 a 0,25%, espermina 0,2 mM, Espermidina 0,5 mM, pH 7,5) e incubado em gelo durante 10 min.

A suspensão foi agitada vigorosamente em vortex durante 20-40 s, para rompimento das células e liberação dos cromossomos. A suspensão foi então centrifugada a 201g durante 2 min. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro 20 μ m (Celltrics, Partec, Münster, Alemanha). Os cromossomos foram corados *overnight* com uma solução preparada com 5 ng/ml de Hoechst 33258 (Sigma), 50 ng/ml de cromomicina A3 (Sigma) e 10 mM de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Sigma). Em seguida, 10 mM de citrato de sódio (Sigma) e 25 mM de sulfito de sódio (Sigma) foram adicionados à suspensão de cromossomos corados pelo menos uma hora antes da análise de fluxo e classificação.

Os lasers UV 355 nm e 444 nm foram usados para a classificação de cromossomos. O laser UV excita eficientemente o Hoechst 33258 (afinidade A-T), e o laser de 444 nm excita a cromomicina A3 (afinidade G-C). Neste estudo, o poder dos lasers UV e 444 nm foi ajustado para 50 e 20 mW, respectivamente.

A fluorescência que foi emitida a partir da Hoechst 33258 e da cromomicina A3 foi captada utilizando filtros de passagem longa de 390 e 475 nm. Dois percursos ópticos do citômetro de fluxo foram calibrados antes da análise cromossômica utilizando contas de 3 μ m (partículas fluorescentes de arco-íris SpheroTM, BD Bioscience, Cat 556291, lote 73786, San Jose, CA) para ajustar CV (coeficientes de variância) <1,0.

Os cromossomos foram coletados em microtubos estéreis. Dispersão e dispersão lateral foram selecionados em uma escala de amplificação logarítmica. Os cariótipos de fluxo foram apresentados como histogramas de fluxo bivariado de Hoechst 33258 versus fluorescência de cromomicina A3. Cerca de 400 cópias de cada cromossomo foram coletadas de cada região do cariótipo de fluxo. Esses cromossomos foram amplificados por DOP-PCR e posteriormente marcados para sua caracterização e utilização em experimentos de hibridização *in situ*.

3.6- SONDAS CROMOSSOMO-ESPECÍFICAS E CLONES DE BACs

Foram utilizados três conjuntos de sondas para realização dos experimentos de FISH neste trabalho: sondas cromossomo-específicas de *Gallus gallus*; sondas de clones de BACs também de *Gallus*; e sondas cromossomo-específicas de *Spizaetus tyrannus*. Todas foram desenvolvidas no

Cambridge Resource Centre for Comparative Genomics (Cambridge, Reino Unido) através da técnica de citometria de fluxo fluorescente (*Fluorescent Activated Cell Sorting* ou FACS).

Foram utilizadas sondas cromossomo-específicas referentes aos 10 primeiros pares de *Gallus* (GGA1 – GGA10). Adicionalmente foram usadas 22 sondas de clones de BACs referente à 11 pares de microcromossomos de *G. gallus* (cada par é representado por dois BACs, um referente ao braço curto e outro referente ao braço longo). Quanto ao conjunto de sondas de *Spizaetus*, foram usadas 18 sondas cobrindo o genoma em sua totalidade, referentes aos picos gerados pela técnica de FACS (processo explicado no item 3.5).

Os clones da BACs usados neste trabalho (150.000 kb a 210.000 kb) foram selecionados a partir das extremidades de cada par cromossômico, um BAC da extremidade do braço curto e outro da extremidade do braço longo. A biblioteca usada foi a “*CHORI-261 Chicken BAC library*”, que recebe esse nome por ter sido produzida no *Children’s Hospital Oakland Research Institute*, em Oakland (Califórnia-Estados Unidos). Os clones foram produzidos seguindo o protocolo do kit mini prep (QIAGEN, Hilden, Alemanha) e marcados por diretamente por FTIC (marcados em verde - fluoresceína) ou Cy3/Texas Red (marcados em vermelho - biotina) através do processo de *Nick Translation* (ROCHE, Mannheim, Alemanha).

As informações dos clones de BACs como nome, qual marcação foi usada e qual par de microcromossomos de *Gallus* eles representam, estão organizadas no Quadro II.

Quadro II: Caracterização das sondas de BACs utilizadas no presente trabalho. As sondas marcadas com fluoresceína (FTIC) estão representadas na cor verde, enquanto as marcadas com biotina (TX) estão representadas na cor vermelha.

BAC ID	Cromossomo GGA	Marcação
CH261-113A7	17p	FTIC
CH261-42P16	17q	TX
CH261-60N6	18p	FTIC
CH261-72B18	18q	TX
CH261-10F1	19p	FTIC
CH261-50H12	19q	TX
CH261-83I20	21p	FTIC
CH261-122K8	21q	TX
CH261-40J9	22p	FTIC
CH261-18G17	22q	TX
CH261-191G17	23p	FTIC
CH261-90K11	23q	TX
CH261-103F4	24p	FTIC
CH261-65O4	24q	TX
CH261-59C21	25p	FTIC
CH261-127K7	25q	TX
CH261-186M13	26p	FTIC
CH261-170L23	26q	TX
CH261-66M16	27p	FTIC
CH261-28L10	27q	TX
CH261-64A15	28p	FTIC
CH261-72A10	28q	TX

3.6.1- Amplificação e Marcação de Sondas

As etapas de amplificação e marcação de sondas procedem a partir das matrizes primárias de sondas cromossomo-específicas e seguem padrões descritos na literatura (TELENIUS et al., 1992; GRIFFIN et al., 1999). Os parâmetros utilizados para a amplificação das matrizes de sondas foram os apresentados a seguir.

Em um tubo de microcentrifuga foram adicionados:

- 2,5 µl de tampão;
- 2,5 µl de primer degenerado 6MW (primer para DOP-PCR);
- 2,5 µl de dNTP;
- 1,25 µl de MgCl₂;
- 0,25 µl da enzima Taq polimerase;
- 1 µl da matriz primária da sonda de GGA;
- 15 µl de água Milli-Q.
- Volume final: 25 µl em cada tubo de microcentrifuga.

Foi utilizado um programa específico para DOP-PCR no termociclador Bioer (versão 1.06) da LifeTouch, com as seguintes condições:

94°C por 5' - 1 x		
94°C por 1'30"	}	28 ciclos
62°C por 1'30"		
72°C por 3'		
72°C por 8' - 1 x		
4°C ∞		

Após o término da reação de DOP-PCR, as amostras foram armazenadas em freezer à temperatura de 4°C.

Após a amplificação, as sondas passaram pelo processo de marcação com biotina e/ou fluoresceína também através da reação de DOP-PCR. Os parâmetros utilizados para a amplificação das sondas foram os apresentados a seguir.

Em um tubo de microcentrifuga foram adicionados:

- 2,5 µl de tampão;
- 2,5 µl de primer degenerado 6MW (primer para DOP-PCR);
- 1 µl de biotina ou fluoresceína;

- 2 µl de dNTP (L). (Nucleotídio alterado para marcação de sonda);
- 1,25 µl de MgCl₂;
- 0,25 µl da enzima Taq polimerase;
- 2 µl da matriz da sonda amplificada;
- 13,5 µl de água Milli-Q.
- Volume final: 25 µl em cada tubo de microcentrifuga.

Foi utilizado o mesmo programa específico para DOP-PCR para a etapa de amplificação. Ao final da reação as sondas foram testadas em *Gallus* e guardadas no refrigerador a -20°C até o momento do uso.

3.7- EXPERIMENTOS DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* COM FLUORESCÊNCIA (FISH)

Os experimentos de hibridização “*cross-species*” das sondas cromossomo-específicas e clones de BACs de *Gallus gallus* em *Spizaetus tyrannus*, ocorreram através da técnica de FISH, ou Hibridização *in situ* com fluorescência (Figura 17).

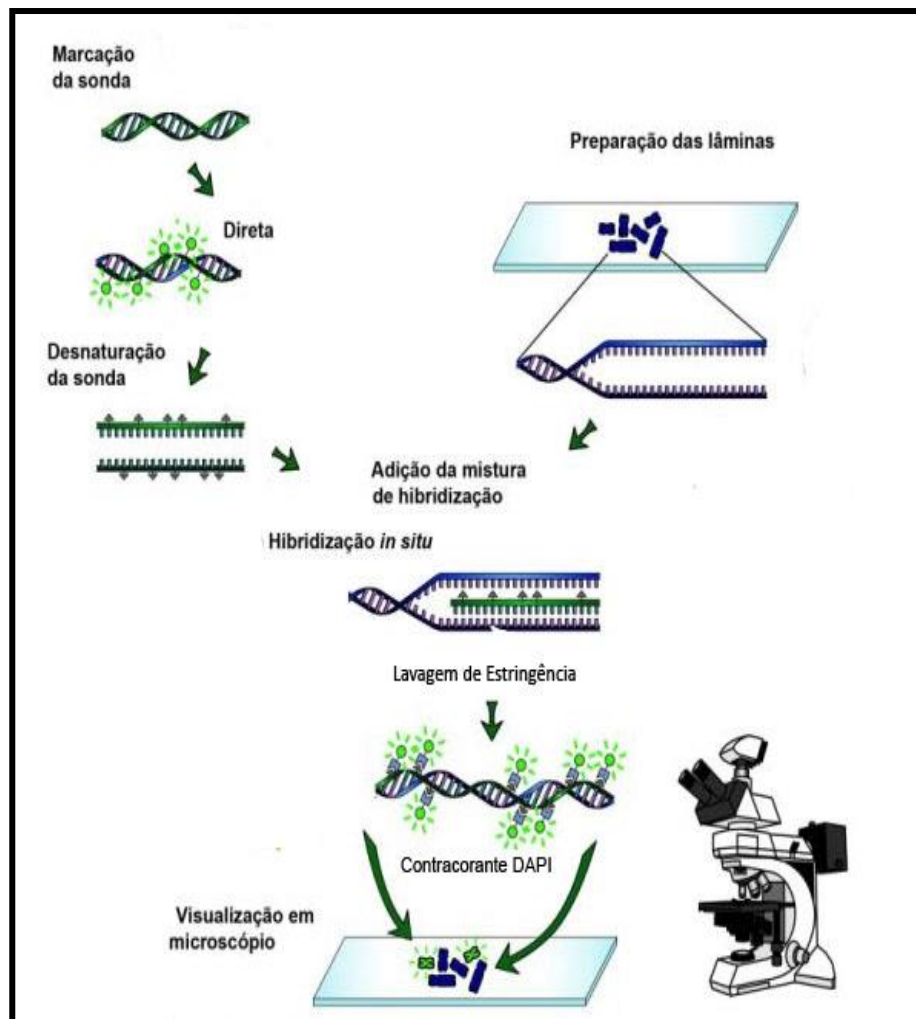


Figura 17: Esquema simplificado de um experimento de Hibridização in situ com Fluorescência (FISH). Mais detalhes no texto abaixo (Fonte: adaptado de BRAMMER et al., 2009).

Esse processo ocorre em três etapas. A primeira delas consiste na pepsinização do material, utilizada para limpeza e retirada de restos citoplasmáticos do mesmo:

- Após gotejado o material nas lâminas, as mesmas foram submetidas a uma lavagem em solução de 0,5 ml pepsina a 1% diluída em 50 ml de ácido clorídrico a 10 M entre 3 e 5 minutos, dependendo da qualidade do material cromossômico fixado.
- Em seguida as lâminas foram incubadas em 2xSSC por 5 minutos, por duas vezes.

- As lâminas foram então desidratadas em uma bateria de álcoois a 70%, 90% e 100%, por 2, 2 e 4 minutos respectivamente.
- Após secarem a temperatura ambiente, as lâminas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

Após essas 24 horas se iniciou a segunda etapa, que consiste na hibridização:

- Foram adicionados 2 µL de sonda marcada a 13 µL de tampão de hibridização em um tubo de microcentrifuga, totalizando 15 µL de solução de hibridização. Esse material sofreu desnaturação através de sua incubação em banho-maria entre 70°C a 72°C, por 10 minutos.
- Após esse tempo, as sondas foram incubadas em estufa a 37°C por 30 minutos para reanelamento das sequências repetitivas, melhorando a eficiência da hibridização.
- Durante esse período, as lâminas que estavam previamente incubadas *overnight* foram submetidas à incubação em formamida 70%, a 72°C, por 80 segundos para desnaturação do material cromossômico.
- Imediatamente após esse processo, as lâminas foram incubadas em etanol a 70%, gelado, por quatro minutos, para interromper a ação da formamida.
- Depois se iniciou o processo de desidratação em bateria de etanóis à 70%, 90% e 100% por 2, 2 e 4 minutos respectivamente.
- Após as lâminas secarem à temperatura ambiente, as sondas foram então despejadas sobre a mesmas, exatamente no mesmo local em que foram pingadas as preparações cromossômicas, e então cobertas com lamínula limpa.
- O material foi mantido em estufa a 37°C em câmara úmida por 72 horas.

Depois de completadas 72 horas de incubação em câmara úmida, a terceira e última etapa do processo teve início; a detecção:

- As lâminas seguiram para a lavagem de estringência (2x em formamida 50% e 2x em 2xSSC, à 40°C, por 5 minutos cada).
- A detecção do sinal foi feita com a adição de solução de hibridização contendo 0,4µL de Avidina-CY3, (anticorpo que se liga à biotina) ou de Anti-Fluoresceína (anticorpo que se liga à fluoresceína), diluídos em 200µL de 4xSSC/Tween para cada lâmina.
- As lâminas foram cobertas com lamínula e incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos.
- Após esse período as lâminas foram submetidas a três lavagens em 4xSSC/Tween, mantido previamente em 37°C, por cinco minutos cada, totalizando quinze minutos de lavagem.
- Uma gota de *Vectashield* contendo DAPI foi adicionada em cada lâmina, para atuar como contra-corante, que foi então coberta com lamínula limpa.
- Depois de seca, a lâmina precisa ser selada com esmalte incolor, para estar pronta para análise microscópica.

3.7.1- Captura e Análise de Imagens

O microscópio utilizado foi um *Zeiss-Image* acoplado a um sistema de fluorescência com uma lâmpada de mercúrio HBO 100. A detecção dos sinais produzidos pelas sondas, assim como do DAPI, foi feita usando diferentes filtros de acordo com o espectro de emissão de cada cor antilfluorescente. As imagens foram capturadas e processadas com ajuda do programa *Axiovision 4.8*, e transferidas para um computador, no qual os ajustes de contraste, observação das diferentes camadas e ajustes de cor foram feitos com uso do programa *Adobe Photoshop CS5*.

4- RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente trabalho foram subdivididos na forma de dois capítulos, que correspondem aos artigos científicos listados abaixo.

CARVALHO, C. A. L.; FURO, I. O.; O'BRIEN, P. C. M.; PEREIRA, J.; O'CONNOR, R. E.; GRIFFIN, D.; FERGUSON-SMITH, M. A. & DE OLIVEIRA, E. H. C. **Comparative Chromosome Painting in *Spizaetus tyrannus* and *Gallus gallus* with the use of Macro- and Microchromosome Probes.** Manuscrito publicado pela revista PLoS ONE (PONE-D-21-20639R2) em 18 de novembro de 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259905>.

CARVALHO, C. A. L.; FURO, I. O.; O'BRIEN, P. C. M.; PEREIRA, J.; O'CONNOR, R. E.; GRIFFIN, D.; FERGUSON-SMITH, M. A. & DE OLIVEIRA, E. H. C. **Chromosome-specific probes from Black-Hawk-Eagle (*Spizaetus tyrannus*): an alternate tool for avian genome evolution analysis.** Manuscrito em processo final de redação para submissão à revista Genetics and Molecular Biology.

4.1- CAPÍTULO 1

Comparative Chromosome Painting in *Spizaetus tyrannus* and *Gallus gallus* with the use of Macro- and Microchromosome Probes

Short Title: Chromosome Painting in *Spizaetus tyrannus* and *Gallus gallus*

Carlos Augusto L. Carvalho^{1, 2}, Ivanete de Oliveira Furo^{2, 3}, Patricia C. M. O'Brien⁴, Jorge Pereira J⁵, Rebeca E. O'Connor⁶, Darren Griffin⁶, Malcolm A. Ferguson-Smith MA⁴, Edivaldo Herculano C. de Oliveira^{2,7 *}

1 Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará 66075-110, Brazil

2 Laboratório de Citogenômica e Mutagênese Ambiental, SAMAM, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará 67030-000, Brazil

3 Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) Laboratório de Reprodução Animal (LABRAC), Parauapebas, Pará, 68515-000, Brazil

4 Cambridge Resource Centre for Comparative Genomics, Cambridge CB3 0ES, UK

5 Animal and Veterinary Research Center, Universidade de Trás-os-Montes e Alto dourado, Vila Real, Portugal

6 School of Biosciences, University of Kent, Canterbury CT2 7NJ, UK

7 Faculdade de Ciências Naturais, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará 66075-110, Brazil

Corresponding Author:

***Dr. Edivaldo Herculano C. de Oliveira**

ehco@ufpa.br, edivaldooliveira@iec.gov.br

Abstract

Although most birds show karyotypes with diploid number ($2n$) around 80, with few macrochromosomes and many microchromosomes pairs, some groups, such as the Accipitriformes, are characterized by a large karyotypic reorganization, which resulted in complements with low diploid numbers, and a smaller number of microchromosomal pairs when compared to other birds. Among Accipitriformes, the Accipitridae family is the most diverse and includes, among other subfamilies, the subfamily Aquilinae, composed of medium to large sized species. The Black-Hawk-Eagle (*Spizaetus tyrannus*-STY), found in South America, is a member of this subfamily. Available chromosome data for this species includes only conventional staining. Hence, in order to provide additional information on karyotype evolution process within this group, we performed comparative chromosome painting between *S. tyrannus* and *Gallus gallus* (GGA). Our results revealed that at least 29 fission-fusion events occurred in the STY karyotype, based on homology with GGA. Fissions occurred mainly in syntenic groups homologous to GGA1-GGA5. On the other hand, the majority of the microchromosomes were found fused to other chromosomal elements in STY, indicating these rearrangements played an important role in the reduction of the $2n$ to 68. Comparison with hybridization pattern of the Japanese-Mountain-Eagle (*Nisaetus nipalensis orientalis*), the only Aquilinae analyzed by comparative chromosome painting previously, did not reveal any synapomorphy that could represent a chromosome signature to this subfamily. Therefore, conclusions about karyotype evolution in Aquilinae require additional painting studies.

Key Words: Aquilinae, Chromosome painting, BACs, Microchromosomes

Introduction

Usually, bird genome is organized in karyotypes consisting of few macrochromosomes and many tiny microchromosomes [1]. However, there are some exceptions. For instance, excluding the New World vultures (Cathartidae), which show similar karyotypes to the putative avian ancestral karyotype (PAK) with diploid number around 80, including 10 pairs of macrochromosomes and 30 pairs of microchromosomes [1], species belonging to the Order Accipitriformes present an interesting chromosomal diversity. They have lower diploid numbers, $2n$, approximately = 54-68, and a reduction of microchromosomes to between 4 and 8 pairs, due mainly to fusions involving these small elements, occurred during their divergence [2-4].

In general, studies focusing on chromosome evolution in birds are based on comparative chromosome painting using chicken whole chromosome probes (*Gallus gallus* – GGA, $2n=78$), due to the similarity of the karyotype of this species with the PAK [5]. The use of this methodology in species of birds of prey has revealed that, despite the lower diploid numbers observed in this group, the large karyotype reorganization in Accipitriformes included multiple fissions in the macrochromosome pairs homologous to GGA1-GGA5. The reduction of the chromosome number would be due to the concomitant occurrence of several fusion events involving microchromosomes [6-11].

Microchromosomes are gene rich elements, and genome comparative analyses have shown their conservation as syntenic groups among distantly related bird groups [12-13]. In fact, rearrangements involving microchromosomes were detected in few orders: Accipitriformes, Caprimulgiformes, Cuculiformes, Psittaciformes, and the Suliformes [13-15]. Due to difficulties of the isolation of

individual microchromosome pairs by flow cytometry for specific probe production, most data concerning microchromosomes were obtained by the use of pools of microchromosomes, i.e., chromosome paints that recognize more than one pair. Therefore, improved identification of chromosome pairs involved in rearrangements is a priority if we are to achieve a more definitive analysis and identify synapomorphies based on chromosome characters [16-17].

Currently, the order Accipitriformes is composed of four families, of which Accipitridae is the most diverse, with approximately 230 species distributed in 14 subfamilies [18]. Among them, the subfamily Aquilinae includes medium and large species, distributed globally, usually known as booted eagle. Usually, ten genera are found within Aquilinae. Cytogenetically, the only information concerning Aquilinae is the definition of the diploid number of six species (four genera), ranging from $2n=66$ to 82 [19].

The Black-Hawk-Eagle (*Spizaetus tyrannus*-STY) is a representative of this subfamily, found in South and Central Americas, from southern Mexico down to Argentina [18]. Considering that the only chromosomal analysis of *S. tyrannus* to date was based on conventional staining, revealing a karyotype within the Aquilinae standard, with $2n=68$ [1], the aim of this study was to present the cytogenetic mapping of *S. tyrannus* by comparative painting. In addition to whole-chromosome paints of *Gallus gallus* (GGA), we used BAC probes from GGA clones that identified 11 individual pairs of microchromosomes. The results were compared to *Nisaetus nipalensis orientalis*-NNI ($2n=66$) [10], also from the subfamily Aquilinae, in order to identify chromosomal rearrangements related to karyotype evolution in this group.

Results

Karyotype description

The karyotype of *Spizaetus tyrannus* presented $2n=68$, consisting of 21 meta-submetacentric pairs (pairs 1-4, 6-7, 9-10, 12, 14, 16-17, 19-22, 24-29 and the sex chromosomes, Z and W), seven acrocentric (pairs 5, 8, 11, 13, 15, 18 and 23), and four pairs of microchromosomes (pairs 30-33). The Z chromosome is a large metacentric, with size between pairs 3 or 4, while the W chromosome is an average submetacentric, similar in size to pairs 8 or 9 (Figure 1). In table 1, we reported some differences in chromosome morphology of *S. tyrannus* described by Tagliarini et al., [1].

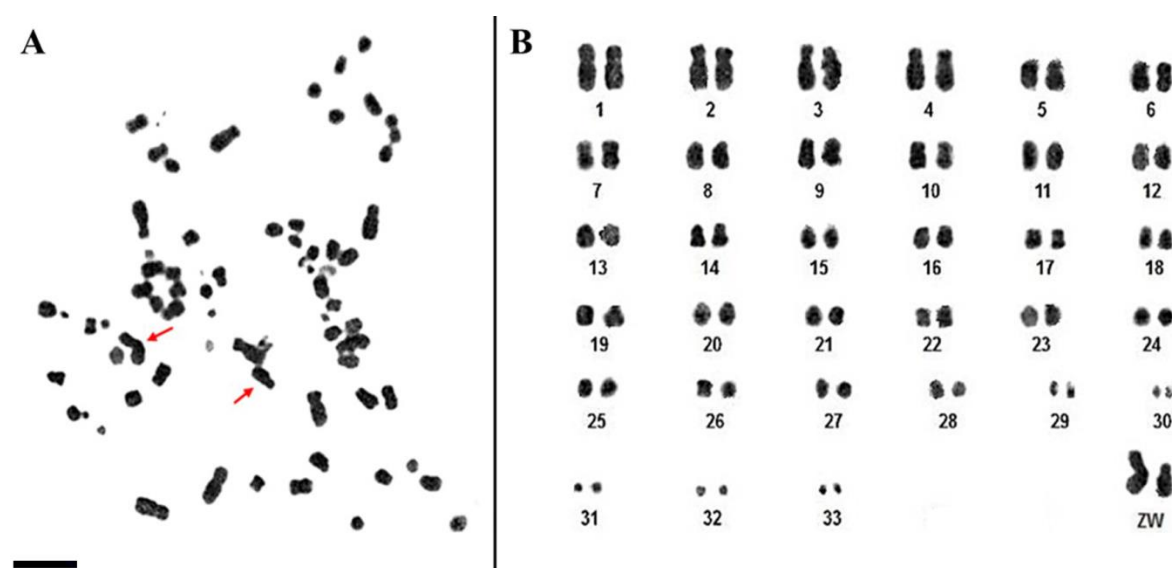


Figure 1- Metaphase (A) and karyotype (B) of *S. tyrannus* with $2n = 68$, obtained with Giemsa conventional staining. The red arrows in (A) indicate the sex chromosomes. Scale bar: 5 μ m

Table 1- Karyotype of *S. tyrannus* described by Tagliarini et al. [1] and at this study. (Metacentric: M; Submetacentric: SM; Subtelocentric: ST; Acrocentric: AC).

Pairs	This study	[1]	Pairs	This study	[1]
Chr 1.	SM	SM	Chr 18.	AC	AC
Chr 2.	SM	SM	Chr 19.	SM	SM

Chr 3.	SM	SM	Chr 20.	SM	SM
Chr 4.	SM	SM	Chr 21.	SM	SM
Chr 5.	AC	SM	Chr 22.	SM	SM
Chr 6.	SM	ST	Chr 23.	AC	AC
Chr 7.	SM	SM	Chr 24.	SM	AC
Chr 8.	AC	ST	Chr 25.	SM	AC
Chr 9.	SM	SM	Chr 26.	SM	AC
Chr 10.	SM	ST	Chr 27.	SM	SM
Chr 11.	AC	SM	Chr 28.	SM	AC
Chr 12.	SM	SM	Chr 29.	SM	SM
Chr 13.	AC	SM	Chr 30.	Micro	Micro
Chr 14.	SM	AC	Chr 31.	Micro	Micro
Chr 15.	AC	AC	Chr 32.	Micro	Micro
Chr 16.	SM	ST	Chr 33.	Micro	Micro
Chr 17.	SM	ST	Chr ZW.	M and SM	M and SM

Comparative Chromosome painting

Gallus gallus probes used in the fluorescent *in situ* hybridization (FISH) experiments produced reproducible results. Hybridizations with chromosome-specific probes for the first ten pairs of GGA produced 22 signals, with the first five pairs producing multiple signals, ranging from 2 to 6 numbers (Figure 2). For instance, GGA1 probe painted six distinct pairs in the *S. tyrannus* karyotype (pairs 5, 6, 12, 14, 18, and 25), while the probes GGA6-10 pairs showed only one signal each. Table 2 details the distribution of the signals produced by GGA whole specific probes in the karyotype of *S. tyrannus*.

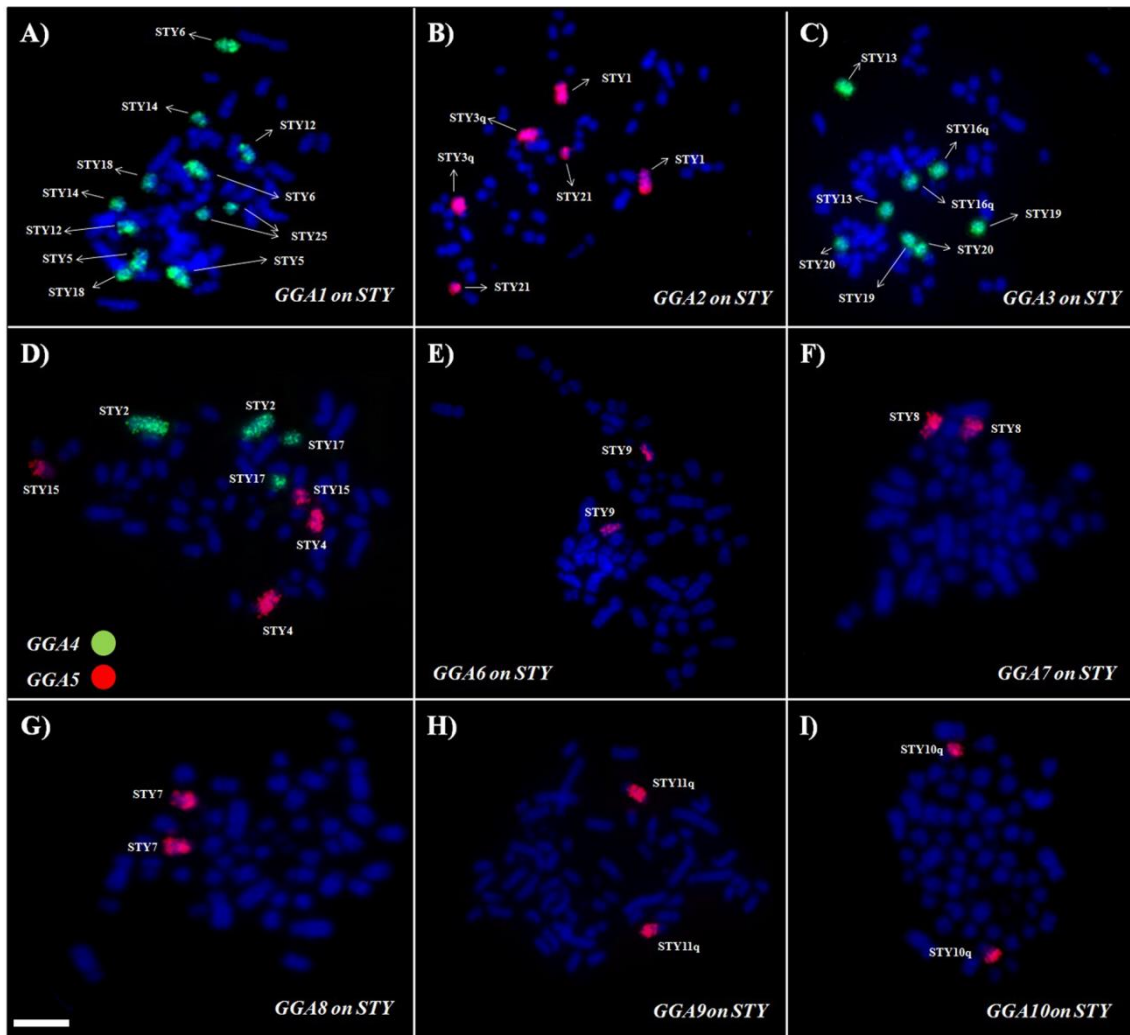


Figure 2- Representative results of FISH experiments using *G. gallus* chromosome-specific probes corresponding to pairs GGA1 to GGA5 in *S. tyrannus* karyotype. Red and green signals represent probes labelled with Cy3 or FITC, respectively. Scale bar: 5µm

Table 2- Results of hybridizations with *G. gallus* probes showing the homology between GGA probes in the karyotype of *S. tyrannus* (STY). (q = long arm).

Probes	STY Chromosomes	Probes	STY Chromosomes
GGA1	(5, 6, 12, 14, 18, 25)	GGA6	9
GGA2	(1, 3q, 21)	GGA7	8
GGA3	(13, 16q, 19, 20)	GGA8	7
GGA4	(2, 17)	GGA9	11q
GGA5	(4, 15q)	GGA10	10q

A total of 19 out of 22 *G. gallus* BAC clones produced results. Both BACs from the GGA22 chromosome did not produce any detectable signal, as well as one of the BACs from GGA21. Among the 19 probes that gave good quality results, both proximal (BACp) and distal (BACd) referring to 8 pairs, were found in the same segment in the STY karyotype. However, BACs corresponding to GGA17 hybridized to two different pairs - BAC17p marked STY 9q, while BAC17d marked STY 24q (Figure 3). All Chicken BACs and their respective homology in the karyotype of *S. tyrannus* are summarized in Table 3.

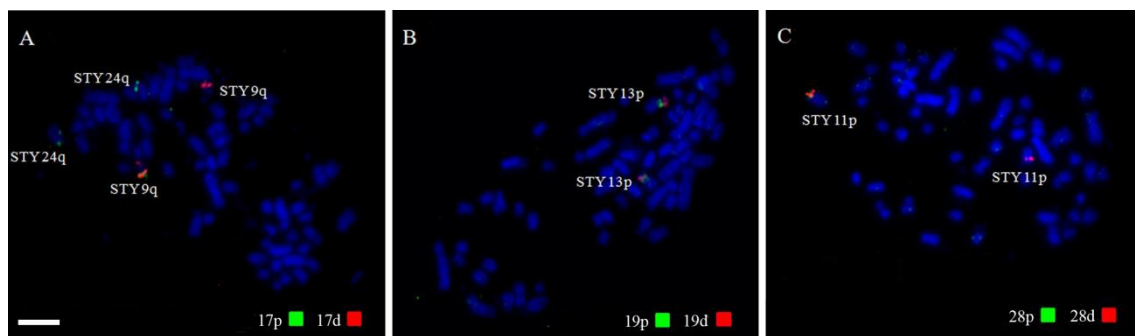


Figure 3- Representative results of hybridizations with some *G. gallus* BACs probes in the karyotype of *S. tyrannus*. (A1 and A1.1) Chicken BAC17 was the only one to hybridize to different chromosomes. Red signals represent probes labeled with Cy3, corresponding to the proximal region (p); Green signals represent probes labeled with FITC, corresponding to the distal region (d). Arrows indicate the signals. Scale bar: 5µm

Table 3- Summary of the results of experiments using GGA BACs on the karyotype of *S. tyrannus* (*=BACs marking the same segment in STY karyotype; px=proximal region; d=distal region; p= short arm; q = long arm).

GGA	BAC ID	STY	GGA	BAC ID	STY
17px	CH261-113A7	9q	23d	CH261-90K11	23p*
17d	CH261-42P16	24q	24px	CH261-103F4	15p*
18px	CH261-60N6	19p*	24d	CH261-65O4	15p*
18d	CH261-72B18	19p*	25px	CH261-59C21	20p*
19px	CH261-10F1	13p*	25d	CH261-127K7	20p*
19d	CH261-50H12	13p*	26px	CH261-186M13	27p*
21px	CH261-83I20	No signal	26d	CH261-170L23	27p*
21d	CH261-122K8	4p	27px	CH261-66M16	16p*
22px	CH261-40J9	No signal	27d	CH261-28L10	16p*
22d	CH261-18G17	No signal	28px	CH261-64A15	11p*
23px	CH261-191G17	23p*	28d	CH261-72A10	11p*

Homologies obtained both by whole chromosome painting and BAC probes are shown in figure 4.

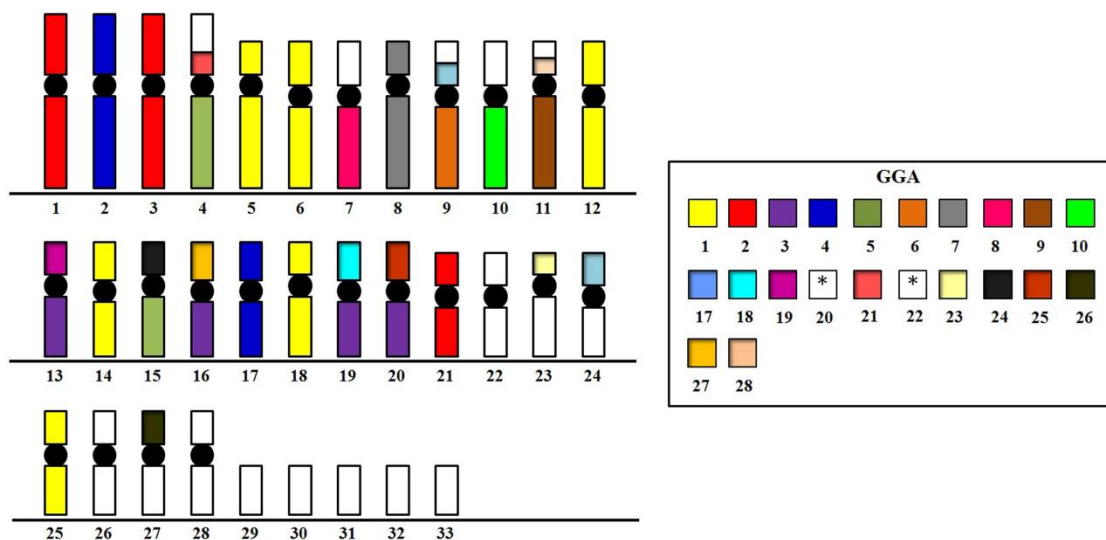


Figure 4- Idiogram representing the homology between the *S. tyrannus* chromosomes and the macrochromosome chromosome-specific probes and microchromosomes BAC clones from *G. gallus*. Empty boxes mean no signal detected in those chromosomes with the set of probes used. BACs corresponding to pairs 20 and 22 (*) was not used or did not produce any detectable signals, respectively.

Discussion

The karyotype of *S. tyrannus* obtained herein presented $2n=68$, confirming data from a previous report [1]. We report slight differences in chromosome morphology however, due to the higher number of biallelic pairs (Table 1).

The results of comparative chromosome painting with whole chromosome probes of *G. gallus* showed a similar pattern to other birds of prey in the family Accipitridae, with a large reorganization of the syntenic groups homologous to the first five pairs of *G. gallus*. That is, each probe (GGA1 - GGA5) corresponded to at least two distinct pairs (Figure 3). The most extreme examples are the fission of GGA1 into six pairs in STY, and GGA3 into four distinct pairs. These results are congruent with other birds of prey, considering that GGA1 can reveal syntenic segments in four pairs (*Gypaetus barbatus*, $2n=60$) to seven pairs (*Nisaetus nipalensis orientalis* - NNI), while GGA3 is hybridized to four pairs in all species analyzed in this family. The exception is NNI where it hybridizes to only 2 pairs [11]. On the other hand, GGA6 - GGA10 are conserved syntenies, with only one signal for each pair.

All associations observed in the karyotype of STY based in its homology with *G. gallus* are represented in Figure 4. In general, 16 fissions and 13 fusions were detected, totalizing 29 rearrangements in the karyotype of STY when compared to *G. gallus*, with fissions occurring mainly in relation to the first five pairs of macrochromosomes and fusions involving mainly the microchromosomes. In the microchromosomes, chicken BAC probes showed that their syntenies were not disrupted by fission events as probes for proximal and distal regions were found hybridizing to the same pair in STY, except for GGA17, which produced signals in STY9 and STY24. However, all the identified

BAC signals showed that each GGA microchromosome was fused to a STY segment homologous to either a GGA macro or microchromosome. This indicates that chromosomal fusions played an important role in reducing the diploid number in STY and other Accipitriformes. It is important to note that not all GGA microchromosomes are represented by chicken BACs, and hence other fusions must have occurred in this species to maintain $2n = 68$.

The closest subspecies to *Spizaetus tyrannus* with chromosome painting data is the NNI, with $2n=66$ [10]. Although geographically separated, they are morphologically similar, and until the last decade were classified as part of the same genus. Despite now being separated into distinct genera, molecular data support their close phylogenetic relationship [20]. Nevertheless, the comparative chromosome painting detects many differences. For instance, GGA1-9 probes produced signals in 21 pairs in STY, and 22 in NNI; the difference was due to an extra fission of GGA1 in NNI. Despite both species presenting three fusions involving the first nine pairs with microchromosomes (STY: pairs 4, 7 and 9; NNI: pairs 2, 4 and 9), none of them share the same GGA syntenic groups, and microchromosomes involved in NNI were not identified. Additionally, in both species GGA3 hybridizes to 4 pairs, however in STY all these segments are fused with microchromosomes (GGA: pairs 18, 19, 24 and 25), whereas in NNI only one segment of GGA3 is fused with a microchromosome (unidentified pair) [10].

Regarding the phylogenetic relationship of Aquilinae with other subfamilies within Accipitridae, although STY and NNI present some karyotypic similarities common to diurnal birds of prey, such as recurrent breakpoints mainly in relation to the GGA1-GGA5 pairs [10,11], we did not identify any synapomorphic associations which could represent ancestral characteristics for the Aquilinae [21-

22]. Hence, while other subfamilies, such as Buteoninae and Harpiinae present well-established chromosomal signatures that allow the elaboration of their putative ancestral karyotypes [7], the available chromosome data indicate the absence of chromosomal signatures between STY and NNI, which can be explained by their significant geographic isolation, inhabiting opposite regions in the globe.

Conclusion

The present work is the first comparative chromosome mapping of a species in the genus *Spizaetus*, *S. tyrannus*, and has revealed substantial karyotypic reorganization common to birds of prey of the family Accipitridae. Together with *G. gallus* chromosome-specific probes for the larger pairs, chicken BACs were able to provide a more comprehensive result with additional information on the organization of the *S. tyrannus* karyotype. There are many similarities with the *N. nipalensis orientalis*, including numerous fissions of the first five pairs homologous to GGA with only one less in STY (21 events against 22 in NNI), and three fusions involving homologues of GGA1-GGA9 chromosomes and microchromosomes, but with breakpoints that are not shared between these two species. For a broader analysis at the phylogenetic level, it would be necessary to have comparative mapping of other species of the genus *Spizaetus* so that an ancestral karyotype of this genus could be suggested.

Methods

Samples and Chromosome Preparations

The experiments followed the standards approved by the Ethics Committee for the Use of Animals in Research (CEPAE-UFPA under number 170-13). We performed fibroblast cell cultures from skin biopsies and feather pulp of *Spizaetus tyrannus* (STY) obtained from two female individuals maintained in Zoos (Criadouro Gavião Real, Capitão Poço, Brazil), following the protocol of Sasaki et al. [23] with modifications. After tissue cleavage in Petri dishes, the samples were incubated with 1% type 1 collagenase (GIBCO) for 1 hour at 37°C for tissue dissociation. Metaphase chromosomes were obtained after incubation for one hour with Colcemid (0.05 µg/mL), hypotonic solution (KCl at 0.075 M) for 20 minutes and fixation in methanol/acetic acid (3:1). Karyotype analysis was performed using conventional staining with 5% Giemsa in 0.07 M phosphate buffer (pH 6.8) for 5 minutes, slides were analyzed using a 100× objective (Leica, CO, USA) and GenASIs software (ADS Biotec, Omaha, NE, USA).

GGA Probes and FISH Experiments

Two types of *Gallus gallus* probes were used: whole-chromosome-specific probes of the first 10 pairs, and bacterial artificial chromosomes (BACs) probes from 11 microchromosome pairs. Whole chromosome paints were developed and provided by the Cambridge Resource Center for Comparative Genomics (Cambridge, UK) using the Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS) technique and labeled with biotin, fluorescein and/or digoxigenin (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), and detected with the addition of avidin-Cy3 (or Cy5) or anti-digoxigenin-rhodamin (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). BAC clones ranged from 150,000 kb to 210,000 kb in size were selected from the CHORI-261 Chicken BAC library (Children's Hospital Oakland Research Institute,

Oakland-USA), corresponding to sequences from the proximal and distal regions of the microchromosomes (each pair represented by two BACs, in a total of 22 BACs covering pairs 17 to 28, except for pair 20). Clones were produced following the protocol of the mini prep kit (Qiagen, Hilden, Germany) and labelled directly by fluorescein isothiocyanate (FITC) (green) or Texas Red (red) through Nick Translation (Roche, Mannheim, Germany).

Hybridization experiments followed standard procedures [7, 12]. Probes (1 μ L labelled probe in 14 μ L hybridization buffer) were denatured at 70°C for 10 min and preannealed for 30 min at 37°C. Hybridization mix was added on slides with chromosome preparations previously denatured at 70% formamide for 1 min and 20 s and dehydrated by serial ethanol dehydration (70%, 90% and 100%). Detection was performed using Avidin-Cy5 or anti-digoxigenin (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Slides were analyzed with an Olympus BX-61 epifluorescence microscope equipped with a cooled CCD camera and appropriate filters. Images were captured using SmartCapture3 (Digital Scientific UK).

Declarations

Ethics Approval: The experiments were carried out according to the ethical protocols approved by an ethics committee (CEUA—Federal University of Pará) under no. 170/2013 and SISBIO 68443-1.

Availability of Data and Materials: All data generated or analyzed during this study are included in this published article

Author Contributions: Conceptualization, C.C.A.L., I.O.F. and E.H.C.O.; Data curation and formal analysis, C.C.A.L., I.O.F., J.P. and E.H.C.O.; Investigation, C.C.A.L., I.O.F., Methodology, I.O.F., P.C.M.O., and J.P.; Project administration, E.H.C.O.; Funding acquisition, M.A.F.S., D.K.G. and E.H.C.O.; Validation, C.C.A.L., I.O.F. and E.H.C.O.; Writing (original draft), C.C.A.L., I.O.F. and E.H.C.O.; Writing (review and editing), D.K.G., P.C.M.O. and M.A.F.S.

Funding: This research was partially funded by a grant to EHCO from CNPq (307382/2019-2) and to MAFS from the Wellcome Trust in support of the Cambridge Resource Centre for Comparative Genomics and by the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BB/K008161/1) to the University of Kent, also by UIDB/CVT/00772/2020 funded by the Fundação para Ciência e Tecnologia (FCT). The authors also thank PROPESP/UFGA for financial support for the publication of this article.

Acknowledgements: We would like to thank all the staff of the Laboratório de Citogenômica e Mutagênese Ambiental (SAMAM, IEC) and Cambridge Resource Centre for Comparative Genomics for their technical support.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest

References

1. Tagliarini, M. M.; Nagamachi, C. Y.; Pieczarka, J. C. & de Oliveira, E. H. C. Description of two new karyotypes and cytotaxonomic considerations on Falconiformes. *Brazilian J Ornith*, 2007; 15(2): 167-172.
2. De Boer, L. E. M. The somatic chromosomes of 16 species of Falconiformes (Aves) and the karyological relationships of the order. *Genética*, 1990; 46: 77.
3. De Boer, L.E.M. The somatic chromosome complements of 16 species of Falconiformes (Aves) and the karyological relationships of the order. *Genetica*, 1976, 46: 77-113.
4. Santos, L. P. & Gunski, R. J. Revisão de dados citogenéticos sobre a avifauna brasileira. *Brazilian J Ornith*, 2006; 14: 35-45.
5. Kretschmer, R.; Ferguson-Smith, M.A.; de Oliveira, E.H.C. Karyotype Evolution in Birds: From Conventional Staining to Chromosome Painting. *Genes*, 2018; 9:181.
6. de Oliveira, E. H. C.; Habermann, F.; Lacerda, O.; Sbalqueiro, I. J.; Wienberg, J. & Muller, E. S. 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*, 2005; 114: 338-343.
7. de Oliveira, E. H. C.; Tagliarini M. M.; Rissino J. D.; Pieczarka, J. C.; Nagamachi, C. Y.; O'Brien, P. C. M. & Ferguson-Smith, M. A. Reciprocal chromosome painting between white hawk (*Leucopternis albicollis*) and chicken reveals extensive fusions and fissions during karyotype evolution of accipitridae (Aves, Falconiformes). *Chromosome Res*, 2010; 18: 349–355.

8. de Oliveira, E. H. C.; Tagliarini M. M.; Santos, M. S.; O'Brien, P. C. M. & Ferguson-Smith, M. A. Chromosome painting in three species of buteoninae: a cytogenetic signature reinforces the monophyly of south american species. *Plos One*, 2013; 8(7), 5–10.

9. Nanda I; Karl E; Volobouev V; Griffin DK; Scharl M; Schmid M. Extensive gross genomic rearrangements between chicken and Old World vultures (Falconiformes: Accipitridae). *Cytogenet Genome Res*, 2006; 112:286-295.
10. Nishida C, Ishijima J, Ishishita S, Yamada K, Griffin DK, Yamazaki T, et al. Karyotype reorganization with conserved genomic compartmentalization in dot-shaped microchromosomes in the Japanese mountain hawk-eagle (*Nisaetus nipalensis orientalis*, Accipitridae). *Cytogenet Genome Res*, 2013;141:284–94.

11. Nie, W.; O'Brien, P. C. M.; Fu, B.; Wang, J.; Su, W.; He, K.; Bed'Hom, B. et al. Multidirectional chromosome painting substantiates the occurrence of extensive genomic reshuffling within Accipitriformes. *BMC Evolutionary Biology*, 2015; 15:205.

12. O'Connor, R. E.; Kiazin, L.; Skinner, B.; Fonseka, G.; Joseph, S.; Jennings, R. et al. Patterns of microchromosome organization remain highly conserved throughout avian evolution. *Chromosoma*, 2018; 128: 21–29.

13. Waters, P. D.; Patel, H. R.; Ruíz-Herrera, A.; Álvarez-González, L.; Lister, N. C.; Simakov, O. et al. Microchromosomes are building blocks of bird, reptile and mammal chromosomes. *BioRxiv* [Preprint] 2021 bioRxiv [Posted 2021 July 07]. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.07.06.4513>.

14. Furo, I.O.; Kretschmer, R.; O'Brien, P.C.M.; Pereira, J.; Garnero, A.D.V.; Gunski, R. et al. Chromosomal evolution in the phylogenetic context in Neotropical Psittacidae with emphasis on a species with high karyotypic reorganization (*Myiopsitta monachus*). *Front. Genet.* 2020, 11: 721.

15. Kretschmer, R.; de Souza, M.S.; Furo, I.d.O.; Romanov, M.N.; Gunski, R.J.; Garnero, A.d.V.; de Freitas, T.R.O.; de Oliveira, E.H.C.; O'Connor, R.E.; Griffin, D.K. Interspecies Chromosome Mapping in Caprimulgiformes, Piciformes, Suliformes, and Trogoniformes (Aves): Cytogenomic Insight into Microchromosome Organization and Karyotype Evolution in Birds. *Cells*, 2021, 10: 826.
16. Crooijmans, R.; Vrebalov, J.; Dijkhof, R; Van Der Poel, J. & Groenen, M. Two-dimensional screening of the Wageningen chicken BAC library. *Mammalian Genome*, 2000; 11(5): 360-363.
17. Lithgow, P. E.; O'Connor, R.; Smith, D.; Fonseca, G.; Al Mutery, A.; Rathje, C.; Frodsham, R et al. Novel tools for characterising inter and intra chromosomal rearrangements in avian microchromosomes. *Chromosome Res*, 2014; 22:85–97.
18. Rangel, T.F.L.V.; Diniz-Filho, J.A.F. Worldwide patterns in species richness of Falconiformes: Analytical null models, geometric constraints, and the mid-domain effect. *Braz. J. Biol.*, 2004, 64: 299-308.
19. 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. *Cytogenet Genome Res* 2020. doi: 10.1159/000507768.
20. Haring, E.; Kvaloy, K.; Gjershaug, J.; Rov, N. & Gamauf, A. Convergent evolution and paraphyly of the hawk-eagles of the genus *Spizaetus* (Aves, Accipitridae) – phylogenetic analyses based on mitochondrial markers. *J Zool Syst Evol Res*, 2007; 45(4): 353–365.
21. Romanov, M. N.; Farré, M.; Lithgow, P. E.; Fowler, K. E.; Skinner, B. M.; O'connor, R.; Fonseca, G.; Backström, N.; Matsuda, Y.; Nishida, C et al. Reconstruction of gross avian genome structure, organization and evolution suggests that the chicken lineage most closely resembles the dinosaur avian ancestor. *BMC Genomics*, 2014; 15:1060.

22. Zhang, G.; Li, C.; Li, Q.; Li, B.; Larkin, D. M.; Lee, C.; Storz, J. F. et al. Comparative genomics reveals insights into avian genome evolution and adaptation. *Science*, 2014; 346: 1311-1319.

23. Sasaki, M. et al. A Feather Pulp Culture Technique for Avian Chromosomes, with Notes on the Chromosomes of the Peafowl and the Ostrich. *Experientia*, 1968; 24(12):1292-1293.

4.2- CAPÍTULO 2

Chromosome-specific probes from Black-Hawk-Eagle (*Spizaetus tyrannus*): an alternate tool for avian genome evolution analysis.

Carvalho CAL¹, Furo IO^{1, 2, 3}, O'Brien PCM³, Pereira J³, O'Connor RE⁴, Griffin
DK⁴, Ferguson-Smith MA³, de Oliveira EHC^{2,5 *}

1 Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará 66075-110, Brazil

2 Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética, SAMAM, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará 67030-000, Brazil

3 Cambridge Resource Centre for Comparative Genomics, Cambridge CB3 0ES, UK

4 School of Biosciences, University of Kent, Canterbury CT2 7NJ, UK

5 Faculdade de Ciências Naturais, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará 66075-110, Brazil

Corresponding Author:

***Dr. Edivaldo Herculano C. de Oliveira**

ehco@ufpa.br, edivaldooliveira@iec.gov.br

Abstract

Since its production, the chromosome-specific probes of *Gallus gallus* have become the basis for the beginning of chromosomal painting studies in the class Aves. Whether by pioneering or by the great similarity between the karyotype of the domestic rooster and the hypothetical ancestral karyotype of birds ($2n = 78$), these probes paved the way for sets of probes from other species to be produced and as a result we had a series of new observed rearrangements and new identified recurring breakpoints. Therefore, GGA probes by themselves are no longer able to answer and unravel all the mysteries surrounding the process of chromosomal evolution in birds. In this context, birds of prey (Accipitridae, Accipitriformes) stand out due to their peculiar karyotypes, especially because they are extremely reorganized with a smaller diploid number and fewer pairs of microchromosomes. In the present study we propose the production and characterization of a brand-new set of whole-chromosome-specific probes of Black-Hawk-Eagle (*Spizaetus tyrannus*), neotropical diurnal Bird of prey that occurs throughout the South American continent. Such probes proved to be able to serve as a new mechanism to assist and enrich analyzes of cytotaxonomy and chromosomal evolution in birds, joining to the other existing sets of probes to improve what we already know and collaborate in the discovery of new chromosomal signatures in the most diverse species of birds.

Key Words: *Spizaetus*, Whole-Chromosome Probes, Chromosome Painting.

Introduction

Unlike most birds whose karyotypes are bimodal - with macro and microchromosomes - and with diploid numbers close to 80 [1-2], birds of prey representing the family Accipitridae (Accipitriformes) present highly rearranged karyotypes with smaller diploid numbers ranging from 54 to 68 in most species. Most chromosomes are biarmed and medium-sized, with few pairs of microchromosomes, making these species an interesting target for analysis of chromosome evolution [3-4].

According to studies of comparative chromosome painting using whole chromosome paints of the chicken (*Gallus gallus* – GGA), this intense chromosomal reorganization included several fissions in the macrochromosome pairs homologous to GGA1-GGA5 [5-10], while microchromosomes were involved in fusions.

Although GGA probes are the most used for comparative painting studies in birds, as in previously cited works, four other species present a set of probes already established [11, 10], including the White-Hawk (*Pseudastor albicollis*), the only bird of prey in this list [6]. With these probes, it is possible to detect intrachromosomal rearrangements not detectable with *Gallus* probes in the most diverse orders [12-16].

The Black-Hawk-Eagle (*Spizaetus tyrannus*) is a neotropical diurnal bird of prey (Accipitriformes, Accipitridae) representing the Aquilinae subfamily, which occur along the American continent, from southern Mexico down to Argentina [17-18]. This specie has already been characterized by classic cytogenetics [19] and chromosomal painting studies [20], with the use of whole-chromosome probes and/or BAC clones from the chicken.

Thus, here we present a production and characterization of a new set of whole-chromosome-specific probes from *Spizaetus tyrannus* (STY) that can be used as a novel tool in order to detect new interactions and/or chromosomal events, that can explain rearrangements and recurring breaking points in the chromosomal evolutionary process of most diverse species of birds.

Material & Methods

Samples and Chromosome Preparations

The experiments followed the standards approved by the Ethics Committee for the Use of Animals in Research (CEPAE-UFPA under number 170-2013). We performed fibroblast cultures from skin biopsies and growing feathers of two specimens of *Spizaetus tyrannus* (STY), both females maintained in Zoos, following the protocol of Sasaki [21], with modifications. After tissue cleavage in Petri dishes, the samples were incubated with 1% type 1 collagenase (GIBCO) for 1 hour at 37°C for tissue dissociation. Metaphase chromosomes were obtained after incubation with Colcemid (0.05 µg/mL) for one hour, hypotonic solution (KCl at 0.075 M) for 30 minutes and fixation in methanol/acetic acid (3:1). Material quality and karyotypical characterization were performed using conventional staining with 5% Giemsa in 0.07 M phosphate buffer (pH 6.8) for 5 minutes, and slides were analyzed using a 100× objective (Leica, CO, USA) and GenASIs software (ADS Biotec, Omaha, NE, USA).

Flow-sorting and Flow karyotype

The chromosome sorting was carried out using a dual-laser cell sorter (MoFlo, DAKO, Glostrup, Denmark) in which about 400 chromosomes were sorted from each peak. Dispersion and lateral dispersion were selected on a logarithmic amplification scale. Flow karyotypes is presented as bivariate flow histograms of Hoechst 33258 versus chromomycin A3 fluorescence. The lasers UV 355 nm and 444 nm were used for the classification of chromosomes and the fluorescence was captured using 390 and 475 nm long pass filters. The flow-sorted probes were amplified and labeled with biotin or digoxigenin (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) by Degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction (*DOP-PCR*) using 6MW primer [6].

FISH Experiments

Whole-chromosome-specific probes of *S. tyrannus* generated by flow sorting were labeled with biotin, fluorescein and/or digoxigenin (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), and detected with the addition of avidin-Cy3 (or Cy5) or anti-digoxigenin-rhodamin (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Same-species hybridization experiments followed standard procedures [6, 22]. Slides were analyzed with an Olympus BX-61 epifluorescence microscope equipped with a cooled CCD camera and appropriate filters. Images were captured using SmartCapture3 (Digital scientific UK).

Results

Flow Karyotype

The chromosomes of *Spizaetus tyrannus* correspond to 18 peaks on flow karyotype (Figure 1). According to the flow-sorted karyotype, STY chromosomes 2, 15, 16 and 31 pairs formed a separate peak each. However, chromosomes 1+3 were found in the same peak as well as chromosomes 4+5, 8+11, 9+10, 12+W, 13+14, 18+19, 27+28, 29+30 and 32+33, also in some peaks we identified three or four chromosome together, such as 11+14+W, 9+10+12+W, 20+21+22, 23+24+26, this happened because of the similar size of these chromosomes. The relationship between the peaks and which chromosomes make them up are summarized in Table 1.

FISH Experiments and Chromosomal Correspondence

All the eighteen *S. tyrannus* peaks were identified on STY metaphases by same-species FISH with labeled peak-specific DNA (Figure 2), presenting good markings and eliminating any risk of doubt. Table 1 shows the correspondence between the newly produced STY whole-chromosome-specific probes and their respective synthetic groups in the *Gallus gallus* karyotype showing which segments of the STY probes correspond to the already established homologies with GGA.

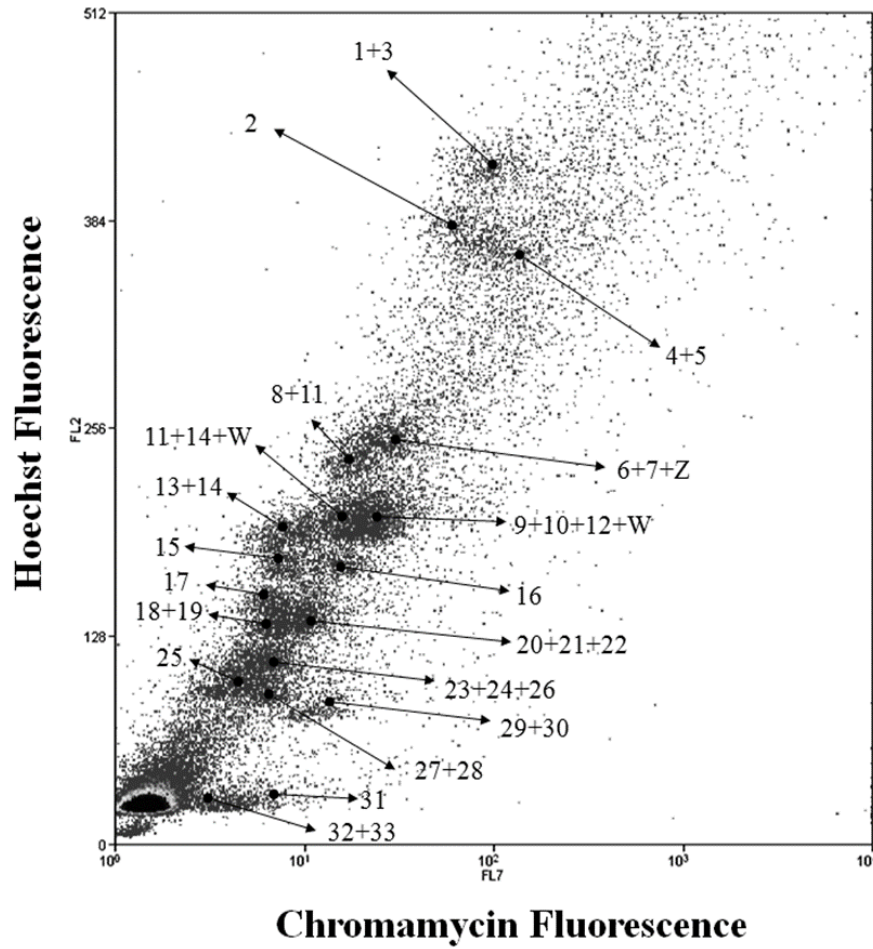


Figure 1- Flow karyotype of the *Spizaetus tyrannus*. Chromosomes were sorted for DNA content and AT to GC base pair ratios into 18 peaks after staining with Hoechst 22358 (vertical axis) and chromomycin-A (horizontal axis). Scale bar: 5 μ m

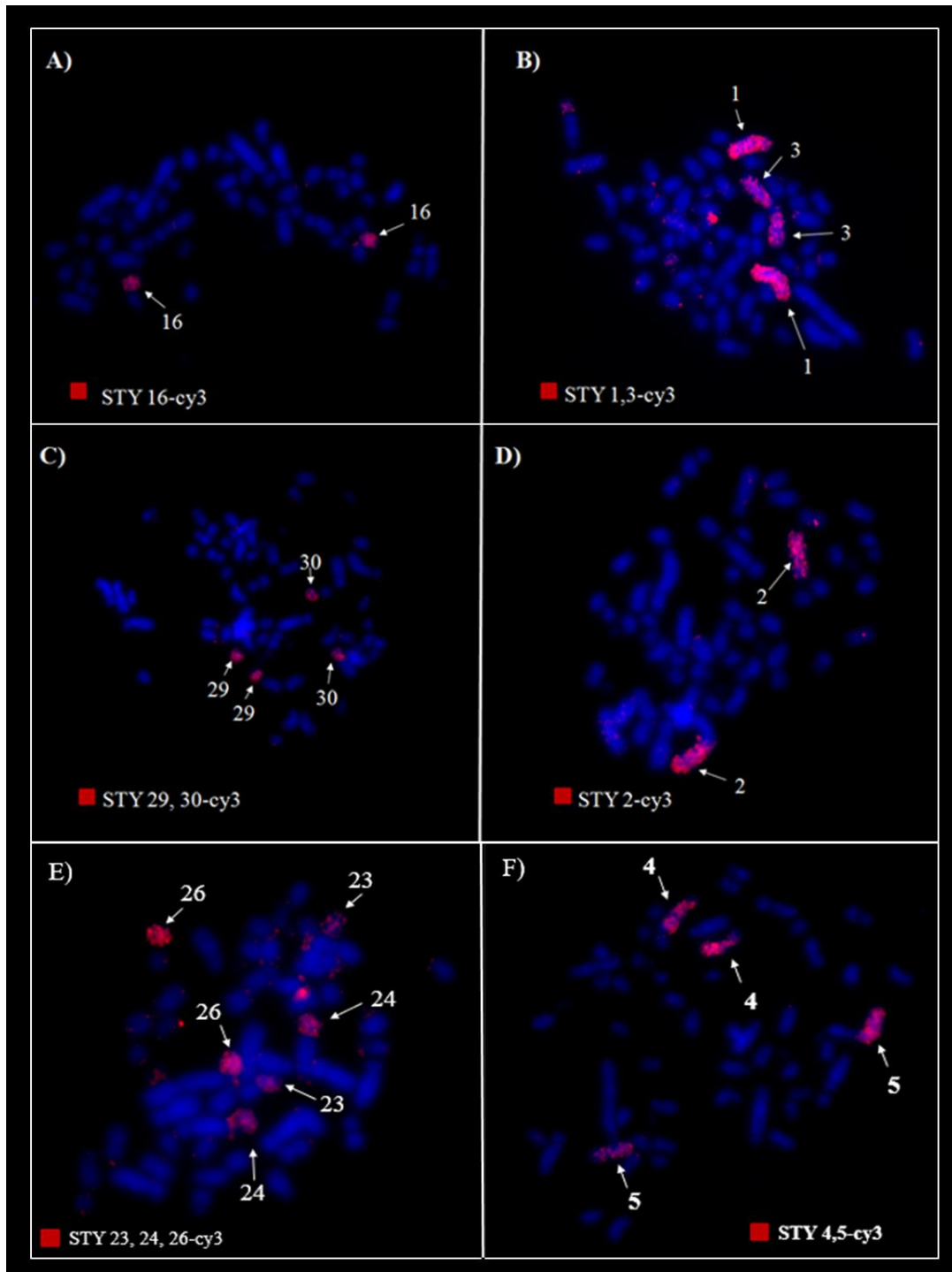


Figure 2- Some same-specie FISH experiments using whole-chromosome probes from *S. tyrannus* on STY metaphases, showing good quality results in both micro (A, C and E) and macrochromosomes (B, D and F). Scale bar: 5 μ m

Table 1: Chromosomal correspondence between *Spizaetus tyrannus* (STY) whole-chromosome probes and *Gallus gallus* (GGA) chromosomes (based on mapping by Carvalho et al., 2021).

Peak STY	Chr. STY	Chr. GGA	Peak STY	Chr. STY	Chr. GGA
1	1+3	2	10	17	4
2	2	1	11	18+19	1/3/18
3	4+5	1/5/21	12	20+21+22	2/3/25/micros
4	6+7+Z	1/8/micros	13	23+24+26	17/23/micros
5	8+11	7/8/micros	14	25	1
6	9+10+12+W	1/6/10/micros	15	27+28	26/micros
7	13+14	1/3/19	16	29+30	Micros
8	15	5/24	17	31	Micros
9	16	4/27	18	32+33	Micros

Discussion

Birds are characterized by an extremely conserved genome when compared to the mammalian genome, mainly in relation to the interchromosomal rearrangements [23]. Nevertheless, it does not mean that it is immune to any kind of chromosome variation. It is already known that the avian genome is full of regions susceptible to breaking points, with a third of these regions tending to be recurrent in different lineages [24-25].

As the first species to have its karyotype fully resolved and its genome sequenced [26-27], the domestic fowl (*Gallus gallus*) is considered the species with the most similar karyotype to the Hypothetical Ancestral Karyotype of Birds, having only a fission in the 4th pair as the only difference. Thus, *Gallus* (GGA) probes were the first used in comparative analysis studies by chromosome painting [28-29].

Due to the high level of karyotype reorganization of birds of prey, GGA probes alone are not able to answer all the questions imposed by the karyotype organization of accipitrids. In this context, chromosome-specific probes from other species with distinct karyotypes appear as an alternative to a more complete approach when talking about cytotaxonomy in birds, reviewed by [30]. Currently we have five species of birds with sets of whole-chromosome-specific probes characterized; they are *Burhinus oedicephalus*, *Leucopternis albicollis*, *Gyps fulvus*, *Zenaidura macroura* and *Myiopsitta monachus*, in chronological order.

Whole-chromosome probes of *Burhinus oedicephalus* (BOE), popularly known as eurasian stone-curlew (Burhinidae, Charadriiformes) was the first non-GGA specie to have a set of whole-chromosome-specific probes and have already been used in 8 species of 6 different orders [11]. Due to its high homology with *G. gallus*, its results did not attract much attention, highlighting only rearrangements involving microchromosomes [31].

The white-hawk (*Leucopternis albicollis* - LAL) was the first bird of prey to have chromosome-specific probes produced [6]. Such probes can identify intrachromosomal rearrangements regarding possible synapomorphies related to the regions of *Gallus gallus* macrochromosomes, which are unable to be detected by *G. gallus* and *B. oedicephalus* probes. LAL probes have already been used successfully in determining break points and identifying segments involved in rearrangements in species of the most varied Orders such as Psittaciformes, Gruiformes, Charadriiformes, Passeriformes (Turdidae, Thraupidae and Tyrannidae families), [12-16, 32].

Probes from the griffon vulture (*Gyps fulvus* - GFU), a large Old World vulture representative of the Cathartidae family, were analyzed in only three

species (*Gyps himalayensis*, *Buteo buteo* and *Burhinus oedicnemus*). Its most significant results to date refer to the phylogeny of birds of prey [10]. Despite being an accipitrid with $2n=66$, the few results with such probes prevent a broader approach to their behavior and distribution.

Probes from the eared dove (*Zenaida auriculata*), a field dove of the Order Columbiformes, show great homology with the GGA probes, but their markings were more intense not only in closer species such as *Gallus* itself, but in more distant species such as *Gyps fulvus*, the other species on which this set of probes was tested. Therefore, ZAU probes are indicated for use in species in which *gallus* probes present some difficulty in hybridization process [33-34].

Finally, probes from the monk parakeet (*Myiopsitta monachus* - Psittaciformes), identified a rearrangement that had not yet been described in the literature, largely due to its extremely low and unusual diploid number ($2n=48$), a fusion of its chromosome 10 with the region homologous to GGA5. However, these probes need to be more widespread in order to analyze whether this rearrangement is shared by other species of the Order. The MMO probes were only used in another species of macaw (*Ara macao*).

When compared to the three previously mentioned sets of probes, whole-chromosome-specific probes of *Spizaetus tyrannus* produced in the present work tend to have greater similarity to the LAL probes, and this is expected given the phylogenetic proximity of these birds of prey, both belonging to the same family (Accipitridae, Accipitriformes) and with very similar diploid numbers, $2n = 66$ in *L. albicollis* and $2n = 68$ in *S. tyrannus* [6, 19]. The BOE and GFU probes have results similar to the traditional GGA probes, due to the similarity in the karyotype

organization between these species and hypothetical ancestral karyotype of birds.

Such similarity between the LAL and STY probes can be confirmed by the chromosomal painting data with *Gallus* probes in the *S. tyrannus* karyotype [20], where it is possible to observe a high degree of conservation among the synthetic groups, with the absence of rearrangements involving the first five STY pairs. The only exceptions are the probes related to homologous regions of GGA1 (6 probes in STY against 5 probes in LAL) and GGA5 (2 probes in STY instead of only 1 in LAL), which represent synthetic groups that are fissioned and distributed in two chromosomal pairs in the STY karyotype, a fact that may be directly linked to the difference in the diploid number of these species.

Whole-chromosome-specific probes of *Spizaetus tyrannus* can provide a new option for cytotaxonomic studies in birds, preferably in species with karyotype organization closer to the pattern observed in birds in general, with diploid number around 80, so that your results can gain even more prominence, since the STY probes can detect rearrangements involving the first homologous pairs of *Gallus gallus* and/or the hypothetical ancestral karyotype of birds.

Conclusion

The present study proposed the production and characterization of the first complete set of whole-chromosome-specific probes from Black-Hawk-Eagle (*Spizaetus tyrannus*), becoming the fourth species to have such probes as a tool for cytotaxonomic analysis, in addition to the pioneer and traditional probes from the chicken (*Gallus gallus*). Their results showed results similar to the set of probes of *Leucopternis albicollis*, given the phylogenetic proximity of these species (Accipitridae, Accipitriformes) and the pattern of karyotype organization

of the diurnal birds of prey, with only two differences being observed when comparing the two sets of probes. For a more in-depth analysis, it is necessary to use these STY probes in chromosomal painting studies in species of the most varied orders, but it is likely that their results will show more prominence in species with karyotypes closer to the ancestral karyotype, species with a lesser degree karyotypical organization than birds of prey. In addition, STY probes emerge as a new tool and option for analyzing chromosomal evolution and phylogenetic relationships in Class Aves.

Declarations

Ethics Approval: The experiments were carried out according to the ethical protocols approved by an ethics committee (CEUA—Federal University of Pará) under no. 170/2013 and SISBIO 68443-1.

Availability of Data and Materials: All data generated or analyzed during this study are included in this published article

Author Contributions: Conceptualization, C.A.L.C and E.H.C.O.; Data curation and formal analysis, C.A.L.C., J.P. and E.H.C.O.; Investigation, C.A.L.C.; Methodology, E.H.C.O., P.C.M.O. and J.P.; Project administration, E.H.C.O.; Funding acquisition, M.A.F.S., G.D.K and E.H.C.O.; Validation, C.A.L.C, and E.H.C.O.; Writing (original draft), C.A.L.C., and E.H.C.O.; Writing (review and editing), P.C.M.O. and M.A.F.S.

Funding: This research was partially funded by a grant to EHCO from CNPq (307382/2019-2) and to MAFS from the Wellcome Trust in support of the Cambridge Resource Centre for Comparative Genomics and by the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BB/K008161/1) to the University of Kent.

Acknowledgements: We would like to thank all the staff of the Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética (SAMAM, IEC) and Cambridge Resource Centre for Comparative Genomics to the support for their technical support.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest

References

1. Tegelström, H.; Ebenhard, T. & Rytman, H. Rate of karyotype evolution and speciation in birds. *Hereditas*, 98: 235-239, 1983.
2. de Boer, L. E. M. The somatic chromosomes of 16 species of Falconiformes (Aves) and the karyological relationships of the order. *Genética*, 46: 77, 1990.
3. Amaral, K. F. & Jorge, W. The Chromosomes of the Order Falconiformes: a review. *Ararajuba*, 11: 65-73, 2003.
4. Santos, L. P. & Gunski, R. J. Revisão de dados citogenéticos sobre a avifauna brasileira. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 14: 35-45, 2006.
5. de Oliveira, E. H. C.; Habermann, F.; Lacerda, O.; Sbalqueiro, I. J.; Wienberg, J. & Muller, E. S. 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*, 114: 338-343, 2005.

6. de Oliveira, E. H. C.; Tagliarini M. M.; Rissino J. D.; Pieczarka, J. C.; Nagamachi, C. Y.; O'Brien, P. C. M, 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 Res*, 18: 349–355, 2010.

7. de Oliveira, E. H. C.; Tagliarini M. M.; Santos, M. S.; O'Brien, P. C. M. & Ferguson-Smith, M. A. Chromosome painting in three species of buteoninae: a cytogenetic signature reinforces the monophyly of south american species. *Plos One*, 8(7), 5–10, 2013.

8. Nanda, I.; Karl, E.; Volobouev, V.; Griffin, D. K.; Scharl, M. & Schmid, M. Extensive gross genomic rearrangements between chicken and Old World vultures (Falconiformes: Accipitridae). *Cytogenet Genome Res*, 112:286–295, 2006.

9. Nishida C, Ishijima J, Ishishita S, Yamada K, Griffin DK, Yamazaki T, et al. Karyotype reorganization with conserved genomic compartmentalization in dot-shaped microchromosomes in the Japanese mountain hawk-eagle (*Nisaetus nipalensis orientalis*, Accipitridae). *Cytogenet Genome Res.*; 141:284–94, 2013.

10. Nie, W.; O'Brien, P. C. M.; Fu, B.; Wang, J.; Su, W.; He, K., et al. Multidirectional chromosome painting substantiates the occurrence of extensive genomic reshuffling within Accipitriformes. *BMC Evolutionary Biology*, 15:205, 2015.

11. Nie, W.; O'brien, P. C. M.; Bee, L.; Fu, B.; Volobouev, V.; Carter, N. P., et al. Avian comparative genomics: reciprocal chromosome painting between domestic chicken (*Gallus gallus*) and the stone curlew (*Burhinus oedicephalus*, Charadriiformes) - An atypical species with low diploid number. *Chromosome Research*, 17:99–113, 2009.

12. Kretschmer, R.; De Oliveira, E. H. C.; Santos, M. S. D.; Furo, I. O.; O'Brien, P. C. M.; Ferguson-Smith, M. A., et al. Chromosome mapping of the large elaenia (*Elaenia spectabilis*): evidence for a cytogenetic signature for passeriform birds? Biological Journal of the Linnean Society, Volume 115, Issue 2, Pages 391–398, 2015a.

13. Kretschmer, R.; Gunski, R. J.; Garnero, A. D. V.; O'brien, P. C. M.; Ferguson-Smith, M. A.; Ochotorena De Freitas, T. R., et al. Chromosome Painting in *Vanellus chilensis*: Detection of a Fusion Common to Clade Charadrii (Charadriiformes). Cytogenet Genome Res, 146:58-63, 2015b.

14. Furo I. O.; Kretschmer, R.; O'brien, P. C.; Ferguson-Smith, M. A. & De Oliveira, E. H. C. Chromosomal Diversity and Karyotype Evolution in South American Macaws (Psittaciformes, Psittacidae). PLoS ONE, 10(6): 2015a.

15. Furo I. O.; Monte, A. A.; Dos Santos, M. S.; Tagliarini, M. M.; O'brien, P. C.; Ferguson-Smith, M. A. & De Oliveira, E. H. C. Cytotaxonomy of *Eurypyga helias* (Gruiformes, Eurypygidae): First Karyotypic Description and Phylogenetic Proximity with Rynchotidae. PLoS ONE, 10(12): 2015b.

16. Rodrigues, B. S.; Kretschmer, R.; Gunski, R. J.; Garnero, A. D. V.; O'brien, P. C. M.; Ferguson-Smith, M. A. & De Oliveira, E. H. C. Chromosome Painting in Tyrant Flycatchers Confirms a Set of Inversions Shared by Oscines and Suboscines (Aves, Passeriformes). Cytogenet Genome Res, 153: 205-212, 2017.

17. Sick, H. Ornitologia Brasileira. Ed Nova Fronteira, Rio de Janeiro, RJ, 1997.

18. Mikich, S. B., & Bérnils, R. S. Livro vermelho da fauna ameaçada no Estado do Paraná. Instituto ambiental do Paraná, 2014.

19. Tagliarini, M. M.; Nagamachi, C. Y.; Pieczarka, J. C. & De Oliveira, E. H. C. Description of two new karyotypes and cytotaxonomic considerations on Falconiformes. Revista Brasileira de Ornitologia, 15(2): 167-172, 2007.

20. Carvalho, C. A. L; Furo, I. O.; O'brien, P. C. M.; Pereira, J.; O'connor, R. E.; Griffin, D., et al. Comparative Chromosome Painting in *Spizaetus tyrannus* and *Gallus gallus* with the use of Macro- and Microchromosome Probes. PLoS ONE, 2021.

21. Sasaki, M. et al. 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.

22. O'Connor, R.E., Kiazin, L., Skinner, B., Fonseka, G., Joseph, S., Jennings, R., et al. Patterns of microchromosome organization remain highly conserved throughout avian evolution. Chromosoma. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0685-6>. 2018.

23. Ellegren, H. Evolutionary stasis: the stable chromosomes of birds. Trends in Ecology and Evolution, 25:283-291, 2010.

24. Volker, M.; Backstrom, N.; Skinner, B.; Langley, E.; Bunzey, S.; Ellegren, H. & Griffin, D. Copy number variation, chromosome rearrangement, and their association with recombination during avian evolution. Genome Research, 20:503-511, 2010.

25. Skinner, B. M. & Griffin, D. K. Intrachromosomal rearrangements in avian genome evolution: evidence for regions prone to breakpoints. Heredity, 108:37-41, 2012.

26. Masabanda, J. S.; Burt, D. W.; O'Brien, P. M. C.; Vignal, A.; Fillon, V.; Walsh, P. S., et al. Molecular Cytogenetic Definition of the Chicken Genome: The First Complete Avian Karyotype. Genetics, 166:1367-1373, 2004.

27. THE INTERNATIONAL CHICKEN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. Nature, 632:695-716, 2004.

28. 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. *Cytogenet Genome Res*, 117: 64–77, 2007.

29. Romanov, M. N.; Farré, M.; Lithgow, P. E.; Fowler, K. E.; Skinner, B. M.; O'Connor, R., et al. Reconstruction of gross avian genome structure, organization and evolution suggests that the chicken lineage most closely resembles the dinosaur avian ancestor. *BMC Genomics*, 15:1060, 2014.

30. Kretschmer, R.; Ferguson-smith, M. & de Oliveira, E. H. C. Karyotype Evolution in Birds: From Conventional Staining to Chromosome Painting. **Genes**, 9(4), 181, 2018.

31. Hansmann, T.; Nanda, I.; Volobouev, V.; Yang, F.; Scharl, M.; Haaf, T. & Schmid, M. Cross-species chromosome painting corroborates microchromosome fusion during karyotype evolution of birds. *Cytogenet. Genome Res*, 126, 281–304, 2009.

32. Santos, M. S.; Kretschmer, R.; Silva, F. A. O.; Ledesma, M. A.; O'Brien, P. C. M.; Ferguson-Smith, M. A., et al. Intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus *Saltator* (Thraupidae, Passeriformes) and the occurrence of heteromorphic Z chromosomes. *Genetica*, 143: 535-534, 2015.

33. Furo, I. O.; Kretschmer, R.; O'Brien, P. C.; Pereira, J. C.; Garnero, A. D. V.; Gunski, R. J., et al. Chromosomal Evolution in the Phylogenetic Context: A Remarkable Karyotype Reorganization in Neotropical Parrot *Myiopsitta monachus* (Psittacidae). **Front. Genet.**, v.11, 2020.

34. Kretschmer, R.; Furo, I. D. O.; Gomes, A. J. B.; Kiazim, L. G.; Gunski, R. J.; Garnero, A. D. V., et al. A Comprehensive Cytogenetic Analysis of Several Members of the Family Columbidae (Aves, Columbiformes). **Genes**, 11;632, 2020.

5- DISCUSSÃO GERAL

O cariótipo de *Spizaetus tyrannus* aqui obtido apresentou $2n = 68$, confirmando dados já publicados na literatura (TAGLIARINI et al., 2007). Relatamos pequenas diferenças em relação a morfologia dos cromossomos, relacionados a um maior número de pares cromossômicos de dois braços, passando de 16 para 21 pares de cromossomos classificados como metacêntrico ou submetacêntrico. Já os microcromossomos se mantiveram em apenas quatro pares.

Os resultados da pintura cromossômica comparativa com as sondas cromossômicas-específicas de *Gallus gallus* mostraram um padrão semelhante a outras aves de rapina da família Accipitridae, com uma grande reorganização dos grupos sintênicos homólogos aos primeiros cinco pares de *Gallus*. Ou seja, cada uma das primeiras cinco sondas (GGA1 - GGA5) correspondeu a pelo menos dois pares distintos no cariótipo de *Spizaetus*.

Os exemplos mais extremos são a fissão de GGA1 em seis pares em STY e GGA3 em três pares distintos. Esses resultados são congruentes com outras aves de rapina, visto que GGA1 pode revelar segmentos sintênicos em no mínimo quatro pares (*Gypaetus barbatus*) até sete pares (*Nisaetus nipalensis orientalis* - NNI), enquanto GGA3 é hibridizado com quatro pares em todas as espécies analisadas nesta família. A exceção é NNI onde ele hibridiza para apenas 2 pares (NISHIDA et al., 2013). A sonda GGA2 corresponde a três sinais em STY, enquanto as sondas GGA4 e GGA5 marcam apenas 2 segmentos. Por outro lado, o que observamos em relação as sondas GGA6 - GGA10 é um alto nível de conservação dos grupos sintênicos, com apenas um sinal observado para cada sonda utilizada.

De forma geral, foram detectadas 16 fissões e 13 fusões, totalizando 29 rearranjos no cariótipo de *Spizaetus* quando comparado ao de *Gallus*, com fissões ocorrendo principalmente em relação com os primeiros cinco pares de macrocromossomos e fusões envolvendo principalmente os microcromossomos, fato corriqueiro e comum na organização cariotípica das aves de rapina.

Em relação aos microcromossomos, as sondas de clones de BACs mostraram que as sintênias não foram interrompidas por eventos de fissão, pois tanto as sondas para as regiões proximal e distal foram encontradas hibridizando com o mesmo par em STY, com exceção do par GGA17, que hibridizou em dois pares distintos em STY. Ou seja, o conteúdo de DNA presente na maioria dos microcromossomos de GGA se manteve estável em STY.

Esses resultados reforçam a importância da utilização dos BACs de *Gallus* no mapeamento cromossômico, sem eles seria praticamente impossível identificar os pares e segmentos cromossômicos envolvidos nos rearranjos, tendo em vista que participaram de vários eventos de fusão. Essas sondas possibilitam um mapeamento mais completo e preciso do que usando somente as sondas cromossomo-específicas dos primeiros dez pares de GGA.

Em relação às fusões, todos os sinais das sondas de BAC utilizadas mostraram que cada microcromossomo GGA está fusionado a um segmento STY homólogo a um macro ou microcromossomo de GGA. Isso indica que eventos de fusão cromossômica ao longo do tempo podem ter levado a uma diminuição do número diplóide em *Spizaetus tyrannus* e na grande maioria das outras espécies da Ordem Accipitriformes, o que pode significar que tais eventos exercem um papel crítico no processo de evolução cromossômica nesse grupo de aves de rapina.

Apesar das numerosas fissões observadas, é importante ressaltar que nem todos os microcromossomos de GGA foram representados por clones de BACs nos experimentos realizados neste trabalho. Um par cromossômico inteiro (GGA22) e o braço curto do cromossomo 21 não apresentaram bons resultados em nossas hibridizações. Outros 11 pares (GGA11 a GGA16 e GGA29 a GGA33) e o par sexual não possuíam clones de BACs na biblioteca utilizada, o que é recorrente uma vez que é muito difícil que uma biblioteca de BACs cubra o genoma de uma espécie na sua totalidade. Portanto, é possível, e até mesmo provável que outros rearranjos cromossômicos tenham ocorrido nesta espécie para manter a $2n = 68$.

O uso de sondas de clones de BAC vem ganhando cada vez mais espaço nos estudos de pintura cromossômica comparativa em aves. KRETSCHMER et al. (2020) utilizou BACs de *Gallus* em 5 espécies da Ordem Columbiformes (*Columbina passerina*, *Columbina talpacoti*, *Patagioenas cayennensis*, *Geotrygon violacea* e *Geotrygon montana*), enquanto RIBAS et al. (2021) usou bibliotecas de BACs tanto de *Gallus* quanto de “zebra finch” na elucidação do mapeamento do rendadinnho-do-xingu (*Willisornis vidua*, Passeriformes). Ambos no intuito de aumentar a resolução do mapeamento e/ou desvendar rearranjos antes despercebidos com as sondas cromossomo-específicas. Até mesmo um novo rastreamento do hipotético cariótipo ancestral das aves, corrigindo possíveis erros e acrescentando novas descobertas, e a reconstrução de genomas completos já estão sendo analisadas com o uso de bibliotecas de sondas de BACs (KIAZIM et al., 2021).

A espécie mais próxima de *Spizaetus tyrannus* com dados de pintura cromossômica comparativa é a águia-japonesa (*Nisaetus nipalensis orientalis* - NNI) (NISHIDA et al., 2013). Embora separadas geograficamente, essas duas espécies são morfologicamente muito semelhantes, e até a penúltima década eram classificadas como parte do um mesmo gênero, no caso, o gênero *Spizaetus*. Apesar de agora pertencerem a gêneros distintos, os dados moleculares apoiam sua estreita relação filogenética (HARING et al., 2007).

Apesar da proximidade morfológica e filogenética, a pintura cromossômica comparativa dessas duas espécies em relação à *Gallus* detecta algumas diferenças significativas. Por exemplo, as sondas GGA1-9 produziram sinais em 21 pares em STY e 22 em NNI; a diferença se deu por conta de uma fissão extra na região homóloga a GGA1 em NNI. Apesar de ambas as espécies apresentarem três fusões envolvendo os primeiros nove pares com microcromossomos (pares 4, 7 e 9 em *Spizaetus*; pares 2, 4 e 9 em *Nisaetus*), nenhuma delas compartilha os mesmos grupos sintênicos de GGA, e os microcromossomos envolvidos em NNI não foram identificados, já em STY sabemos que esses microcromossomos envolvidos foram os pares GGA17, GGA21 e GGA28.

Além disso, em ambas as espécies GGA3 hibridiza em 4 pares, no entanto, em STY todos esses segmentos estão fusionados com microcromossomos (GGA18, 19, 24 e 25), enquanto em NNI apenas um segmento de GGA3 está fusionado com um microcromossomo (par não identificado) (NISHIDA et al., 2013).

Estudos mais recentes com técnicas de citogenética molecular confirmam a importância desses elementos cromossômicos dado o seu alto nível de conservação ao longo do processo evolutivo das aves em geral. Além das espécies de ordens já conhecidas por sua intensa reorganização cariotípica (Accipitriformes, Falconiformes e Psittaciformes), não existem evidências de rearranjos microcromossômicos na grande maioria das demais espécies, reforçando a ideia de estabilidade evolutiva no que diz respeito à organização genômica/cariotípica (O'CONNOR et al., 2018). De acordo com KRTESCHMER et al. (2021), a evolução convergente envolvendo rearranjos em microcromossomos é um evento raro em aves e pode ser apropriado em inferências citotaxonômicas nas Ordens em que esses rearranjos ocorreram.

Outro ponto diz respeito à diferença no número diplóide de *S. tyrannus* e *N. nipalensis* ($2n = 66$ no NNI e $2n = 68$ no STY). Isso pode ser explicado por uma fusão cêntrica de dois pares de microcromossomos (pares não identificados) no cromossomo NNI7 resultando em um par de microcromossomos a menos no cariótipo de *N. nipalensis* (NISHIDA et al., 2013). Esses resultados mostram que de fato, são espécies morfologicamente semelhantes, que até a penúltima década faziam parte do mesmo gênero. Nas primeiras publicações de cariótipos de diversas espécies de aves, a águia-japonesa (atualmente denominada *Nisaetus nipalensis orientalis*) era conhecida por *Spizaetus orientalis* (TAGAKI & SASAKI, 1974). Apenas após os trabalhos filogenéticos de HARING et al. (2007) que as espécies passaram a compor gêneros diferentes, *Spizaetus* e *Nisaetus*.

Além disso, apesar de *Spizaetus tyrannus* e *Nisaetus nipalensis* apresentarem algumas semelhanças cariotípicas comuns a aves de rapina de habitat diurno, como pontos de quebra recorrentes principalmente em relação aos pares GGA1-GGA5 (NISHIDA et al., 2013; NIE et al., 2015; revisado por

KRETSCHMER, 2018b), não identificamos quaisquer associações sinapomórficas que pudessem representar características ancestrais das espécies da subfamília Aquilinae (ROMANOV et al., 2014; ZHANG et al., 2013). Assim, enquanto outras subfamílias, como Buteoninae e Harpiinae apresentam assinaturas cromossômicas bem estabelecidas que permitem a elaboração de seus hipotéticos cariótipos ancestrais (DE OLIVEIRA et al., 2010), os dados cromossômicos disponíveis indicam uma ausência de assinaturas cromossômicas entre STY e NNI, que pode ser explicado por seu significativo isolamento geográfico, habitando regiões opostas do globo (WINGER & BATES, 2015).

As aves de um modo geral são caracterizadas por um genoma extremamente conservado quando comparado ao genoma dos mamíferos, principalmente em relação aos rearranjos intercromossômicos (ELLEGEN, 2010). No entanto, isso não significa que seja imune a qualquer tipo de variação cromossômica. Já se sabe que o genoma aviário está repleto de regiões suscetíveis a pontos de quebra, com um terço dessas regiões tendendo a ser recorrentes em diferentes linhagens (VOLKER et al., 2010; SKINNER & GRIFFIN, 2012).

Por ter sido a primeira espécie de ave a ter seu cariótipo totalmente desvendado e seu genoma sequenciado (MASABANDA et al., 2004; The International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004), *Gallus gallus* é considerada a espécie com o cariótipo mais semelhante ao Hipotético Cariótipo Ancestral de Aves, tendo apenas uma fissão no 4º par como diferença. Assim, as sondas cromossomo-específicas de *Gallus* (GGA) foram as primeiras utilizadas em estudos de análise comparativa por pintura cromossômica (GRIFFIN et al., 2007; ROMANOV et al., 2014).

Quando comparadas às sondas cromossomo-específicas mencionadas anteriormente, quais sejam: *Burhinus oedicephalus* (BOE), *Gyps fulvus* (GFU) e *Leucopternis albicollis* (LAL); as sondas de *Spizaetus tyrannus* produzidas no presente trabalho tendem a ter maior similaridade com as sondas LAL, o que é esperado dada a proximidade filogenética dessas aves de rapina, ambas pertencentes ao mesma família (Accipitridae, Accipitriformes) e com números diplóides muito semelhantes, $2n = 66$ em *L. albicollis* e $2n = 68$ em *S. tyrannus*.

(DE OLIVEIRA et al., 2010; TAGLIARINI et al., 2007). As sondas BOE e GFU têm resultados semelhantes aos das sondas GGA tradicionais, uma vez que apresentam um cariótipo muito próximo do padrão observados nas aves em geral, o que consequentemente tornam suas sondas bastante semelhantes às de *Gallus* (NIE et al., 2015)

Tal similaridade entre as sondas LAL e STY pode ser confirmada pelos dados de pintura cromossômica com sondas LAL no cariótipo de *S. tyrannus* (CARVALHO et al., 2021), onde é possível observar um alto grau de conservação entre os grupos sintenicos, com a ausência de rearranjos envolvendo os cinco primeiros pares STY. As únicas exceções são as sondas relacionadas às regiões homólogas de GGA1 (6 sondas em STY contra 5 sondas em LAL) e GGA5 (2 sondas em STY contra apenas 1 em LAL), que representam grupos sintenicos que estão fissionados e distribuídos em dois pares cromossômicos no cariótipo *Spizaetus*, fato que pode estar diretamente relacionado à diferença no número diplóide dessas espécies.

Vale ressaltar que para um cenário ideal nas análises citogenéticas das sondas de *Spizaetus*, seria importante estabelecer uma homologia cromossômica recíproca entre STYxGGA, no intuito de estabelecer uma relação entre as sondas, tal qual observada nos demais tres conjuntos de sondas cromossomo-específicas alternativas à *Gallus*. No entanto a realização desses experimentos foi prejudicada pelas barreiras impostas pela pandemia que ainda nos assola. Assim como testes das sondas STY em outras espécies das mais variadas espécies para ver de que forma elas se comportam nos mais variados padrões cromossômicos.

De qualquer forma, os resultados obtidos nos levam a acreditar que as sondas cromossomo-específicas de *Spizaetus tyrannus* podem fornecer uma nova opção para estudos citotaxonômicos na classe Aves, preferencialmente em espécies com organização cariotípica mais próxima do padrão observado em aves em geral, com número diplóide em torno de $2n = 78-80$. para que seus resultados possam ganhar ainda mais relevância, uma vez que as sondas STY podem detectar rearranjos envolvendo os primeiros pares homólogos de *Gallus gallus* e/ou o hipotético cariótipo ancestral das aves.

6- CONCLUSÃO

O presente trabalho é o primeiro a propor o mapeamento cromossômico comparativo de uma espécie do gênero *Spizaetus*, o Gavião-pega-macaco (*Spizaetus tyrannus* - STY). Os resultados revelaram uma reorganização cariotípica que é comum em aves de rapina da família Accipitridae. Juntamente com as sondas cromossomo-específicas de *Gallus gallus* - GGA (padrão para estudos citotaxômicos em aves) para os pares maiores pares cromossômicos, as sondas de clones de BACs de GGA foram capazes de fornecer um resultado ainda mais abrangente com informações adicionais mais precisas sobre a organização do cariótipo de *S. tyrannus*, sobretudo referentes aos pares de microcromossomos, que apenas as sondas cromossomo-específicas não seriam capazes de oferecer.

Existem muitas semelhanças entre *Spizaetus tyrannus* e *Nisaetus nipalensis orientalis*, espécie mais próxima com dados de pintura cromossômica já publicados na literatura, incluindo numerosas fissões envolvendo os primeiros cinco pares homólogos à GGA, e poucas fusões envolvendo segmentos homólogos de GGA1 à GGA9 e microcromossomos. No entanto, tais rearranjos se apresentam de forma em que os pontos de quebra não são compartilhados entre as duas espécies, sugerindo que a sub-família Aquilinae não possua uma assinatura citotxonômica bem estabelecida. Para uma análise mais ampla em nível filogenético, seria necessário o mapeamento comparativo de outras espécies do gênero *Spizaetus* para que um cariótipo ancestral desse gênero pudesse ser traçado.

Outro ponto a ser destacado no trabalho é a produção e caracterização do primeiro conjunto completo de sondas cromossomo-específicas de *Spizaetus tyrannus*, tornando-se assim, a quarta espécie a possuir tal conjunto de sondas como ferramenta de análise citotaxonômica, além das pioneiras e tradicionais sondas cromossomo-específicas de *Gallus gallus*. Seus resultados mostraram resultados semelhantes ao conjunto de sondas de *Leucopternis albicollis*, dada a proximidade filogenética dessas espécies, ambas pertencendo à família Accipitridae (Accipitriformes) e o padrão de organização cariotípica das aves de

rapina diurnas, sendo observadas apenas duas diferenças na comparação dos dois conjuntos. de sondas, nas regiões homólogas à GGA1 e GGA5, com uma sonda a mais em *Spizaetus* do que em *Leucopternis*.

Para uma análise mais aprofundada, é necessário o uso dessas sondas STY em estudos de pintura cromossômica em espécies das mais variadas ordens, mas é provável que seus resultados apresentem maior destaque em espécies com cariótipos mais próximos do cariótipo ancestral, espécie com um menor grau de organização cariotípica do que as aves de rapina. Além disso, as sondas STY surgem como uma nova ferramenta e opção para analisar a evolução cromossômica e as relações filogenéticas na classe Aves.

Importante ressaltar que, apesar das dificuldades impostas pela pandemia de covid-19, todos os objetivos do presente trabalho foram alcançados, com exceção dos experimentos de pintura cromossômica recíproca entre STY e GGA que forneceriam um mapa de homologia mais completa referente ao conjunto de sondas cromossomo-específicas de *Spizaetus*. Apesar disso, podemos concluir que o trabalho gerou o mapeamento cromossômico de uma nova espécie na literatura, com sondas cromossomo-específicas de clones de BACs de *Gallus*. Além de um também inédito conjunto completo de sondas cromossomo-específicas de uma nova espécie no intuito de fornecer mais uma ferramenta para auxiliar nas análises citotaxonômicas nas espécies que já tiveram, e nas que ainda terão seus cariótipos desvendados, seja corroborando ou corrigindo algum dado já publicado, ou desvendando novos rearranjos e traçando cariótipos ancestrais.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, K. F. & JORGE, W. The Chromosomes of the Order Falconiformes: a review. **Ararajuba**, 11: 65-73, 2003.
- AMARAL, F. C.; MILLER, M. J.; SILVEIRA, L. F.; BERMINGHAM, E. & WANTJAL, A. Polyphyly of the hawk genera *Leucopternis* and *Buteogallus* (Aves, Accipitridae): multiple habitat shifts during the Neotropical buteonine diversification. **BMC Evolutionary Biology**, 6(10): 1-10, 2006.
- Australian Museum. **Archaeopteryx, fossil cast**. Disponível em: <<https://australianmuseum.net.au/image/archaeopteryx-fossil-cast>>. Acesso em: 06 de abril de 2017.
- BARROWCLOUGH, G. F., CRACRAFT, J., KLINKA, J., & ZINK, R. M. How many kinds of birds are there and why does it matter? **PLoS ONE**, 11(11), 1–15. 2016.
- BED'HOM, B. **Etude des caryotypes atypiques des Accipitridae (Aves, Falconiformes) par cytogenetique classique et molecular, et modelisation de leur evolution**. Tese de Doutorado, Museu de História Natural. Paris, França, 1999.
- BirdLife International 2016. **Spizaetus tyrannus**. **The IUCN Red List of Threatened**. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22696193A952223063.en> >. Downloaded on 06 March 2019.
- BRAMMER, S. P.; POERSCH, L. B.; OLIVEIRA, A. R. de; VASCONCELOS, S.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C. Hibridização genômica in situ em Triticeae: um enfoque metodológico. **Passo Fundo: Embrapa Trigo**. 15 p. html. (Embrapa Trigo. Comunicado Técnico online, 270), 2009.
- BROWN, J. W. & MINDELL, D. P. Diurnal birds of prey (Falconiformes). (In: **The timetree of life**, S. Hedges, S. Kumar ed.): 436-439, Oxford: Oxford University Press, 2009.
- BROWN, L. & AMADON, D. **Eagles, hawks and falcon of the world**. Editora: McGraw-Hill. New York. 1968.

- BURT, D. W. Origin and evolution of avian microchromosomes. **Cytogenet Genome Res**, 96:97-112, 2002.
- CANUTO, M.; ZORZIN, G.; CARVALHO-FILHO, E. P. M.; CARVALHO, C. E. A.; CARVALHO, G. D. M. & BENFICA, C. E. R. T. Conservation, management and expansion of protected and non-protected tropical forest remnants through population density estimation, ecology, and natural history of top predators; case studies in birds of prey (*Spizaetus* taxon). (In: **Tropical Forests**, P. Sudarshana ed.): 359-388, 2012.
- CARVALHO, C. A. L. **Análise da evolução cariotípica das espécies neotropicais de harpiinae (accipitriformes, accipitridae) por meio de pintura cromossômica**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Belém/PA, Brasil, 2017.
- CARVALHO, C. A.; FURO, I. O.; O'BRIEN, P. C. M.; PEREIRA, J.; O'CONNOR, R. E.; GRIFFIN, D., et al. Comparative chromosome painting in *Spizaetus tyrannus* and *Gallus gallus* with the use of macro and microchromosome probes. **PLoS ONE** 16 (11), 2021.
- CHIAPPE, L. M. The first 85 million years of avian evolution. **Nature**, 378: 349-355, 1995.
- CHRISTIDIS, L. Karyotypic Analyses in Bird. (In: **Cytogenetics of Animals**, C. Halmaun ed.): 125-132, 1989.
- CHRISTIDIS, L. **Animal Cytogenetics 4: Chordata 3 B: Aves** (Gebrüder Borntraeger, Berlin), 1990.
- Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos - CRBO. **Listas das aves do brasil**, (11), 1–38. 2014.
- CRACRAFT, T. 9. The major clades of birds. (In: **The Phylogeny and Classification of the Tetrapods: Amphibians, reptiles, birds.**) Vol 1, p339-361, 1988.

- CROOIJMANS, R.; VREBALOV, J.; DIJKHOF, R; VAN DER POEL, J. & GROENEN, M. Two-dimensional screening of the Wageningen chicken BAC library. **Mammalian Genome**, 11(5): 360-363, 2000.
- DE ABREU, R. L. **Localização de Capitão Poço no Pará**, 2006. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Capit%C3%A3o_Po%C3%A7o#/media/Ficheiro:Para_Municip_CapitaoPoco.svg>. Acessado em 27 de março de 2021.
- DE BOER, L. E. M. The somatic chromosomes of 16 species of Falconiformes (Aves) and the karyological relationships of the order. **Genetica**, 46: 77, 1990.
- 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. **Cytogenet Genome Res**, 160:199-205, 2020.
- DE OLIVEIRA, E. H. C & JORGE, W. Análise cromossômica em Aves. **Melopsittacus**, 3:72-80, 2000.
- DE OLIVEIRA, E. H. C.; HABERMANN, F.; LACERDA, O.; SBALQUEIRO, I. J.; WIENBERG, J. & MULLER, E. S. 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**, 114: 338-343, 2005.
- DE OLIVEIRA, E. H. C.; TAGLIARINI M. M.; RISSINO J. D.; PIECZARKA, J. C.; NAGAMACHI, C. Y.; O'BRIEN, P. C. M. & FERGUSON-SMITH, M. A. Reciprocal chromosome painting between white hawk (*Leucopternis albicollis*) and chicken reveals extensive fusions and fissions during karyotype evolution of Accipitridae (Aves, Falconiformes). **Chromosome Res**, 18: 349–355, 2010.
- DE OLIVEIRA, E. H. C.; TAGLIARINI M. M.; SANTOS, M. S.; O'BRIEN, P. C. M. & FERGUSON-SMITH, M. A. Chromosome painting in three species of buteoninae: a cytogenetic signature reinforces the monophyly of south american species. **Plos One**, 8(7), 5–10, 2013.

- DICKINSON, E. C. & REMSEN, J. V. **The Howard and Moore Complete Checklist of the Birds of the World**. Vol. 1. 4th Edition. Aves Press, Eastbourne, U.K., 512 pp, 2013.
- Dinosaur World. *Archaeopteryx lithographica*. Disponível em: <http://www.dinosaur-world.com/feathered_dinosaurs/archaeopteryx_lithographica.htm>. Acesso em 07 de abril de 2017.
- DOS SANTOS, L. P. & GUNSKI, R. J. Revisão de dados citogenéticos sobre a avifauna brasileira. **Revista Brasileira de Ornitologia**, 14: 35-45, 2006.
- ELLEGREN, H. The avian genome uncovered. **Trends in Ecology and Evolution**, 20:180-186, 2005.
- ELLEGREN, H. Evolutionary stasis: the stable chromosomes of birds. **Trends in Ecology and Evolution**, 25:283-291, 2010.
- ERICSON, P. G.; ANDERSON, C. L.; BRITON, T.; ELZANOWSKI, A. *et al.* Diversification of Neoaves: integration of molecular sequence data and fóssil. **Biology Letters**, 2: 543-547, 2006.
- FEDUCCIA A. **The Origin and Evolution of Birds**. Yale Univ. Press. 2nd ed. New Haven, CT, 1999.
- FENG, S.; STILLER, J.; DENG, Y.; ARMSTRONG, J.; FANG, Q.; REEVE, A. H.; XIE, D.; CHEN, G. *et al.* Dense sampling of bird diversity increases power of comparative genomics. **Nature**, 587:252–257, 2020.
- FUNES, S.H.; J. LOPEZ A. & G. LOPEZ A. 1992. Reproductive biology, food habits, and behavior of the Black Hawk-eagle in Tikal National Park. Pp. (In: **Maya Project progress report V. The Peregrinbe Fund, Inc., Boise, ID**). p173-178, 1992.
- FURO, I. O.; KRETSCHMER, R.; O'BRIEN, P. C.; FERGUSON-SMITH, M. A. & DE OLIVEIRA, E. H. C. Chromosomal Diversity and Karyotype Evolution in South American Macaws (Psittaciformes, Psittacidae). **PLoS ONE**, 10(6): 2015a.

- FURO, I. O.; MONTE, A. A.; DOS SANTOS, M. S.; TAGLIARINI, M. M.; O'BRIEN, P. C.; FERGUSON-SMITH, M. A. & DE OLIVEIRA, E. H. C. Cytotaxonomy of *Eurypyga helias* (Gruiformes, Eurypygidae): First Karyotypic Description and Phylogenetic Proximity with Rynochetidae. **PLoS ONE**, 10(12): 2015b.
- FURO, I. O.; KRETSCHMER, R.; O'BRIEN, P. C.; PEREIRA, J. C.; GARNERO, A. D. V.; GUNSKI, R. J.; O'CONNOR, R.; GRIFFIN, D. K.; GOMES, A. J. B.; FERGUSON-SMITH, M. A. & DE OLIVEIRA, E. H. C. Chromosomal Evolution in the Phylogenetic Context: A Remarkable Karyotype Reorganization in Neotropical Parrot *Myiopsitta monachus* (Psittacidae). **Front. Genet.**, v.11, 2020.
- GAMAUF, A. & HARING, E. Molecular phylogeny and biogeography of Honey-buzzards (genera *Pernis* and *Henicopernis*). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, 42: 145-153, 2004.
- GREEN, E. D. **Bacterial Artificial Chromosome (BAC)**. National Human Genome Research Institute. Disponível em: <
<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Bacterial-Artificial-Chromosome>>. Acessado em: 14 de fevereiro de 2021.
- GRIFFIN, D. K.; HABERMAN, F.; MASABANDA, J.; O'BRIEN, P.; BAGGA, M *et al.* Micro and macrochromosome paints generated by flow cytometry and microdissection: tools for mapping the chicken genome. **Cytogenet Cell Genet**, 87:278–281, 1999.
- 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. **Cytogenet Genome Res**, 117: 64–77, 2007.
- GRIFFIN, D. K.; ROBERTSON, L.; TEMPEST, H.; VIGNAL, A.; FILLON, V.; CROOIJMANS, R *et al.* Whole genome comparative studies between chicken and turkey and their implications for avian genome evolution. **BMC Genomics**, 9:168, 2008.
- GRIFFITHS, C. S.; BARROWCLOUGH, G. F.; GROTH, J. G. & MERTZ, L. A. MERTZ. Phylogeny, diversity, and classification of the Accipitridae based

- on DNA sequences of the RAG-1 exon. **Journal of Avian Biology**, 38: 587-602, 2007.
- GROENEN, M. A. M.; CHENG, H. H.; BUMSTEAD, N.; BENKEL, B. F.; BRILES, W. E.; BURKE, T.; BURT, D. W.; CRITTENDEN, L. B *et al.* A Consensus Linkage Map of the Chicken Genome. **Genome Research**, 137-147, 2000.
- GUERRA, M. S. Short Communication: Reviewing the Chromosome Nomenclature. **Revista Brasileira De Genética**, vol. IX, 4: 741-743, 1986.
- HACKETT, S. J.; KIMBALL, R. T.; REDDY, S.; BOWIE, R. C. K.; BRAUN, E. L.; BRAUN, M. J.; CHOJNOWSKI, J. L.; COX, W. A.; HAN, A *et al.* A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. **Science**, 320: 1763-1768, 2008.
- HANSMANN, T.; NANDA, I.; VOLOBOUEV, V.; YANG, F.; SCHARTL, M.; HAAF, T. & SCHMID, M. Cross-species chromosome painting corroborates microchromosome fusion during karyotype evolution of birds. **Cytogenet. Genome Res**, 126, 281–304, 2009.
- HARING, E.; KVALOY, K.; GJERSHAUG, J.; ROV, N. & GAMAUF, A. Convergent evolution and paraphyly of the hawk-eagles of the genus *Spizaetus* (Aves, Accipitridae) – phylogenetic analyses based on mitochondrial markers. **J Zool Syst Evol Res**, 45(4): 353–365, 2007.
- HELBIG, A. J.; KOCUM, A.; SEIBOLD, I. & BRAUN, M. J. A multi-gene phylogeny of aquiline birds (Aves: Accipitriformes) reveals extensive paraphyly at the genus level. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 35: 147-164, 2004.
- HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L. S. & LARSON, A. **Princípios integrados de zoologia**. 11. ed. Editora: Guanabara. Rio de Janeiro, 2004.
- HOFFMANN, R.; FAUST, R.; WEINAND, U. & HOFFMANN, G. Chromosomenuntersuchungen an fünf Spezies der Ordnung Falconiformes. **Zool Gart (Jena)**, 46:99-107. 1976.
- HOWARD, R. & MOORE, A. **A complete checklist of the birds of the world**. No.Ed. 2, 622p. London, UK. 1991.

- JARVIS, E. D.; MIRARAB, S.; ABERER, A. J.; LI, B.; HOUDE, P.; LI, C. *et al.* Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. **Science**, 346(6215), 1126-1138, 2014.
- JOHNSON, J. A.; LERNER, H. R. L.; RASMUSSEN, P. C. & MINDELL, D. P. Systematics within *Gyps* vulture: a clade at risk. **BMC Evolutionary Biology**, 6(65): 1-12, 2006.
- KASAI, F.; O'BRIEN, P. C. M.; MARTIN, S. & FERGUSON-SMITH, M. A. Extensive Homology of Chicken Macrochromosomes in the Karyotypes of *Trachemys scripta elegans* and *Crocodylus niloticus* Revealed by Chromosome Painting despite Long Divergence Times. **Cytogenet Genome Res**, 136:303–307, 2012.
- KIAZIM, L. G.; O'CONNOR, R. E.; LARKIN, D. M.; ROMANOV, M. N.; NARUSHIN, V. G.; BRAZHNİK, E. A.; GRIFFIN, D. K. Comparative Mapping of the Macrochromosomes of Eight Avian Species Provides Further Insight into Their Phylogenetic Relationships and Avian Karyotype Evolution. **Cells**, 10:362, 2021.
- KRETSCHMER, R.; GUNSKI, R. J.; GARNERO, A. D. V.; FURO I. O.; O'BRIEN, P. C. M.; FERGUSON-SMITH, M. A. & DE OLIVEIRA, E. H. C. Molecular Cytogenetic Characterization of Multiple Intrachromosomal Rearrangements in Two Representatives of the Genus *Turdus* (Turdidae, Passeriformes). **PLoS ONE**, 9(7): 2014.
- KRETSCHMER, R.; GUNSKI, R. J.; GARNERO, A. D. V.; O'BRIEN, P. C. M.; FERGUSON-SMITH, M. A.; OCHOTORENA DE FREITAS, T. R. & DE OLIVEIRA, E. H. C. Chromosome Painting in *Vanellus chilensis*: Detection of a Fusion Common to Clade Charadrii (Charadriiformes). **Cytogenet Genome Res**, 146:58-63, 2015.
- KRETSCHMER, R.; FURO I. O.; GUNSKI, R. J.; GARNERO, A. D. V.; PEREIRA, J. C.; O'BRIEN, P. C. M.; FERGUSON-SMITH, M. & DE OLIVEIRA, E. H. C. Comparative chromosome painting in Columbidae (Columbiformes)

reinforces divergence in Passerea and Columbea. **Chromosome Res**, 26:211-223, 2018a.

KRETSCHMER, R.; FERGUSON-SMITH, M. & DE OLIVEIRA, E. H. C. Karyotype Evolution in Birds: From Conventional Staining to Chromosome Painting. **Genes**, 9(4), 181, 2018b.

KRETSCHMER, R.; FURO, I. D. O.; GOMES, A. J. B.; KIAZIM, L. G.; GUNSKI, R. J.; GARNERO, A. D. V.; PEREIRA, J. C.; FERGUSON-SMITH, M. A.; DE OLIVEIRA, E. H. C.; GRIFFIN, D. K.; DE FREITAS, T. R. O. & O'CONNOR, R. E. A Comprehensive Cytogenetic Analysis of Several Members of the Family Columbidae (Aves, Columbiformes). **Genes**, 11;632, 2020.

KRETSCHMER, R.; DE SOUZA, M. S.; FURO, I. D. O.; ROMANOV, M. N.; GUNSKI, R. J.; GARNERO, A. D. V.; DE FREITAS, T. R. O.; DE OLIVEIRA, E. H. C.; O'CONNOR, R. E.; GRIFFIN, D. K. Interspecies Chromosome Mapping in Caprimulgiformes, Piciformes, Suliformes, and Trogoniformes (Aves): Cytogenomic Insight into Microchromosome Organization and Karyotype Evolution in Birds. **Cells**, 10:826, 2021.

LERNER, H. R. L. & MINDELL, D. P. Phylogeny of eagles, Old World vultures, and other Accipitridae based on nuclear and mitochondrial DNA. **Molecular phylogenetics and evolution**, 37:327-346, 2005.

LERNER, H. R. L.; KLAVER, M. C. & MINDELL, D. P. Molecular phylogenetics of the buteonine birds of prey (Accipitridae). **Auk**, 304(2): 304-315, 2008.

LINNAEUS, C. Systema naturae per regna tria nature, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. **Regnum animale**, 10: 81-86, Stockholm. 1758.

LITHGOW, P. E.; O'CONNOR, R.; SMITH, D.; FONSEKA, G.; AL MUTERY, A.; RATHJE, C.; FRODSHAM, R *et al.* Novel tools for characterising inter and

intra chromosomal rearrangements in avian microchromosomes. **Chromosome Res**, 22:85–97, 2014.

LUO, M.; YU, Y.; KIM, H.; KUDRNA, D.; ITOH, Y.; AGATE, R *et al.* Utilization of a zebra finch BAC library to determine the structure of an avian androgen receptor genomic region. **Genomics**, 87: 181-190, 2006.

MASABANDA, J. S.; BURT, D. W.; O'BRIEN, P. M. C.; VIGNAL, A.; FILLON, V.; WALSH, P. S *et al.* Molecular Cytogenetic Definition of the Chicken Genome: The First Complete Avian Karyotype. **Genetics**, 166:1367-1373, 2004.

MATSUDA, Y.; NISHIDA-UMEHARA, C.; TARUI, H.; KUROYWA, A.; YAMADA, K. *et al.* Highly conserved linkage homology between birds and turtles: Bird and turtle chromosomes are precise counterparts of each other. **Chromosome Research**, 13:601–615, 2005.

MENQ, W. **Gavião-pegamacaco (*Spizaetus tyrannus*)** - Aves de Rapina Brasil, 2018. Disponível em: <http://www.avesderapinabrasil.com/spizaetus_tyrannus.htm>. Acesso em: 6 de março de 2019.

McQUENN, H. A.; FANTES, J.; CROSS, S. H.; CLARK, V. H.; ARCHIBALD, A. L. & BIRD, A. P. CpG islands of chicken are concentrated on microchromosomes. **Nature Genetics**, 12: 321-324, 1996.

McQUENN, H. A.; SIRIACO, G. & BIRD, A. P. Chicken microchromosomes are hyperacetylated, early replicating and gene rich. **Genome Research**, 8:621-630, 1998.

MIGOTTO, R. **Filogenia de Accipitridae (Aves: Accipitriformes) com base em caracteres osteológicos**. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil, 2013.

NANDA, I.; KARL, E.; VOLOBOUEV, V.; GRIFFIN, D. K.; SCHARTL, M. & SCHMID, M. Extensive gross genomic rearrangements between chicken

- and Old-World vultures (Falconiformes: Accipitridae). **Cytogenet Genome Res**, 112:286–295, 2006.
- NIE, W.; O'BRIEN, P. C. M.; BEE, 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 oedicephalus*, Charadriiformes) - An atypical species with low diploid number. **Chromosome Research**, 17:99–113, 2009.
- NIE, W.; O'BRIEN, P. C. M.; FU, B.; WANG, J.; SU, W.; HE, K.; BED'HOM, B. *et al.* Multidirectional chromosome painting substantiates the occurrence of extensive genomic reshuffling within Accipitriformes. **BMC Evolutionary Biology**, 15:205, 2015.
- NISHIDA, C.; ISHIJIMA, J.; ISHISHITA, S.; YAMADA, K.; GRIFFIN, D. K.; YAMAZAKI, T. & MATSUDA, Y. Karyotype Reorganization with Conserved Genomic Compartmentalization in Dot-Shaped Microchromosomes in the Japanese Mountain Hawk-Eagle (*Nisaetus nipalensis orientalis*, Accipitridae). **Cytogenet Genome Res**, 141:284-294, 2013.
- O'CONNOR, R. E.; KIAZIM, L.; SKINNER, B.; FONSEKA, G.; JOSEPH, S.; JENNINGS, R.; LARKIN, D. M. & GRIFFIN, D. K. Patterns of microchromosome organization remain highly conserved throughout avian evolution. **Chromosoma** 128, 21–29, 2018.
- PETERS, J. L. **Check-list of birds of the world**, 1931.
- PIACENTINI, V.; ALEIXO, A.; AGNE, C. E.; MAURÍCIO, G. N. *et al.* Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee / Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Revista Brasileira de Ornitologia**, 23(2): 91–298, 2015.
- RANGEL, T. F. L. V. & DINIZ-FILHO, J. A. F. Worldwide patterns in species richness of falconiformes: analytical null models, geometric constraints, and the mid-domain effect. **Braz. J. Biol**, v. 64. São Carlos. 2004.

- RENS, W.; FU, B.; O'BRIEN, P. C. M. & FERGUSON-SMITH, F. Cross-species chromosome painting. **Nature Protocols**, 1:783-790, 2006.
- RIBAS, T. F. A.; PIECZARKA, J. C.; GRIFFIN, D. K.; KIAZIM, L. G. *et al.* Analysis of multiple chromosomal rearrangements in the genome of *Willisornis vidua* using BAC-FISH and chromosome painting on a supposed conserved karyotype. **BMC Ecol Evo** 21:34, 2021.
- ROBINSON, S. K. Habitat Selection and Foraging Ecology of Raptors in Amazonian Peru. **Biotropica**, v. 26; n. 4: 443-458, 1994.
- RODIONOV, A. V. Micro versus macro: a review of structure and functions of avian micro- and macrochromosomes. **Russian Journal of Genetics**, 32:517-527, 1996.
- RODRIGUES, B. S.; KRETSCHMER, R.; GUNSKI, R. J.; GARNERO, A. D. V.; O'BRIEN, P. C. M.; FERGUSON-SMITH, M. A. & DE OLIVEIRA, E. H. C. Chromosome Painting in Tyrant Flycatchers Confirms a Set of Inversions Shared by Oscines and Suboscines (Aves, Passeriformes). **Cytogenet Genome Res**, 153: 205-212, 2017.
- ROMANOV, M. N.; KORIABINE, M.; NEFEDOV, M.; DE JONG, P. & RYDER, O. A. Construction of a California condor BAC library and first-generation chicken–condor comparative physical map as an endangered species conservation genomics resource. **Genomics**, 88: 711-718, 2006.
- ROMANOV, M. N.; FARRÉ, M.; LITHGOW, P. E.; FOWLER, K. E.; SKINNER, B. M.; O'CONNOR, R.; FONSEKA, G.; BACKSTRÖM, N.; MATSUDA, Y.; NISHIDA, C *et al.* Reconstruction of gross avian genome structure, organization and evolution suggests that the chicken lineage most closely resembles the dinosaur avian ancestor. **BMC Genomics**, 15:1060, 2014.
- SANTOS, L. P. & GUNSKI, R. J. Revisão de dados citogenéticos sobre a avifauna brasileira. **Revista Brasileira de Ornitologia**, 14: 35-45, 2006.
- SANTOS, M. S.; KRETSCHMER, R.; SILVA, F. A. O.; LEDESMA, M. A.; O'BRIEN, P. C. M.; FERGUSON-SMITH, M. A.; GARNERO, A. D. V.; DE OLIVEIRA, E. H. C. & GUNSKI, R. J. Intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus *Saltator* (Thraupidae, Passeriformes) and

the occurrence of heteromorphic Z chromosomes. **Genetica**, 143: 535-534, 2015.

SASAKI, M.; IKECHI, T. & MAKINO, S. A feather pulp culture technique for avian chromosomes, with notes on the chromosomes of the peafowl and the ostrich. **Experientia**, 24: 1923-1929, 1968.

SCHMUTZ, S. M.; MOKER, J. S. & THUE, T. D. Chromosomes of five north American Buteoninae Hawks. **J Raptor Res**, 27(4), 196–202, 1993.

SCHWEITZER, M. H. 2003. Reviews and Previews: The Future of Molecular Biology. **Palaeontologia Electronica**, 5:2, editorial 2: 11p, 2003.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Ed Nova Fronteira, Rio de Janeiro, RJ, 1997.

SKINNER, B. M.; ROBERTSON, L. B. W.; TEMPEST, H. G. *et al.* Comparative genomics in chicken and Pekin duck using FISH mapping and microarray analysis. **BMC Genomics**, 10(357), 2009.

SKINNER, B. M. & GRIFFIN, D. K. Intrachromosomal rearrangements in avian genome evolution: evidence for regions prone to breakpoints. **Heredity**, 108:37-41, 2012.

SMITH, J.; BRULEY C K.; PATON, I. R.; DUNN, I.; JONES, C. T.; WINDSOR, D.; MORRICE, D. R.; LAW, A. S.; MASABANDA, J. *et al.* Differences in gene density on chicken macrochromosomes and microchromosomes. **Animal Genetics**, 31:96-103, 2000.

TAKAGI, N. & SASAKI, M. A phylogenetic study of bird karyotypes. **Chromosoma**, 46, 91–120, 1974.

TAGLIARINI, M. M.; NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C. & DE OLIVEIRA, E. H. C. Description of two new karyotypes and cytotaxonomic considerations on Falconiformes. **Revista Brasileira de Ornitologia**, 15(2): 167-172, 2007.

TEGELSTRÖM, H.; EBENHARD, T. & RYTTMAN, H. Rate of karyotype evolution and speciation in birds. **Hereditas**, 98: 235-239, 1983.

- TELENIUS, H.; CARTER, N; BEBB, C. *et al.* Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. **Genomics**, 13(3): 718-725, 1992.
- THE INTERNATIONAL CHICKEN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature**, 632:695-716, 2004.
- THIOLLAY, J. M. Family Accipitridae (hawks and eagles). **Handbook of the birds of the world**, v.2, p. 52-205, 1994.
- VOLKER, M.; BACKSTROM, N.; SKINNER, B.; LANGLEY, E.; BUNZEY, S.; ELLEGREN, H. & GRIFFIN, D. Copy number variation, chromosome rearrangement, and their association with recombination during avian evolution. **Genome Research**, 20:503-511, 2010.
- WILLIAMS, R. M. & BENIRSCHKE, R. J. The chromosomes of four species of Falconiformes. **Experientia**, 32: 310-311. 1976.
- WETMORE, A. **A classification for the birds of the world**. Smithsonian Miscellaneous Collection, 139: 1-37. 1960.
- WINGER, B. M. & BATES, J. M. The tempo of trait divergence in geographic isolation: Avian speciation across the Marañon Valley of Peru. **Evolution**, 69: 772-787, 2015.
- WOLFF, D. J. & SCHWARTZ, S. Fluorescence *In Situ* Hybridization. (In: **The Principles of Clinical Cytogenetics**, S. L. Gersen & M. B. Keagle ed.) Second Edition; Totowa, New Jersey. 2005.
- ZHANG, G.; LI, C.; LI, Q.; LI, B.; LARKIN, D. M.; LEE, C.; STORZ, J. F. *et al.* Comparative genomics reveals insights into avian genome evolution and adaptation. **Science**, 346: 1311-1319, 2014.
- XU, X.; ZHOU, Z.; DUDLEY, R.; MACKEM, S.; CHUONG, C. M.; ERICKSON, G. M. & VARRICCHIO, D. J. An integrative approach to understanding bird origins. **Science**, 346(6215), 1341-1353, 2014.