

Alta homeologia cariotípica na família Tinamidae (Aves: Tinamiformes)

Analia del Valle Garnero^{1,3}, Mario Angel Ledesma² e Ricardo José Gunski¹

¹ Ciências. Biológicas, Laboratório de Genética, Universidade Federal do Tocantins, Rua 03, Q17, CEP 77 500-000, Jardim dos Ipês, Porto Nacional, TO, Brazil. E-mail: analiagarnero@uft.edu.br

² Departamento de Genética, Felix de Azara, 1552, CP 3300, Posadas, Misiones, Argentina. E-mail: mledesma@fceqyn.unam.edu.ar

³ Autor para correspondência

Recebido em 26 de agosto de 2005; aceito em 06 de março de 2006

ABSTRACT. High karyotypic homology in the family Tinamidae (Aves: Tinamiformes). Bird karyotypes are in general poorly known. About 20% of the species belonging to the order Tinamiformes had their karyotypes described, and only three of them were analyzed using differential staining techniques. Then, the objective of this work was to provide further cytotoxic information on this group of birds by describing C and NOR banding patterns for *Crypturellus tataupa* and *Tinamus solitarius*. Four individuals of *C. tataupa* (2 ♀ and 2 ♂) and two *T. solitarius* (2 ♂) were sampled in northeast Argentina. Mitotic chromosomes were obtained from direct cultures of bone marrow and peripheral blood lymphocytes, for *C. tataupa* and *T. solitarius*, respectively. *C. tataupa* presented $2n = \pm 78$, being the 1st pair a large acrocentric, the 2nd and 3rd pairs medium telocentrics and the subsequent pairs small telocentrics. The Z chromosome was C banding negative, corresponding in size to the 4th pair. The W was C banding positive, being similar in size to the 6th pair. *T. solitarius* presented $2n = \pm 80$, with the first two pairs submetacentrics, the 3rd pair acrocentric and the following pairs telocentrics. The Z chromosome was similar in size to the 4th - 5th pairs. The C banding showed marks in the centromeric region of the macrochromosomes, except for the Z chromosome. In both species, the NORs were located in a pair of microchromosomes. Within the Tinamidae family, a high chromosomal homology was observed. Their representatives could be subdivided into two different groups: *Rynchotus*, *Nothura*, *Eudromia* and *Tinamus*, that are characterized by the 2nd pair submetacentric, and *Crypturellus*, in which this chromosome is telocentric. The species from the first group are possibly closer to the ratites, despite the higher degree of differentiation among the sexual chromosomes.

KEY WORDS: C and NORs banding, cytogenetic, *Crypturellus tataupa*, *Tinamus solitarius*

RESUMO. A classe Aves é uma das menos estudadas citogeneticamente. Somente 20% das espécies de Tinamiformes foram cariotipadas, e destas, somente três foram analisadas com técnicas de coloração diferencial. Os objetivos deste trabalho foram obter padrões de bandeamento C e NORs de *Crypturellus tataupa* e *Tinamus solitarius* amostrados no nordeste da Argentina, assim como, acrescentar informações citogenéticas à ordem. Foram analisados quatro exemplares de *C. tataupa* (2 ♀ e 2 ♂), e dois machos de *T. solitarius*, utilizando-se as técnicas de cultura direta de medula óssea e de linfócitos de sangue periférico, respectivamente. *C. tataupa* apresentou $2n = 78$, sendo o primeiro par submetacêntrico grande, o 2^o e 3^o pares telocêntricos medianos e os pares seguintes telocêntricos pequenos. O cromossomo Z é acrocêntrico, banda C negativo, corresponde em tamanho ao 4^o par. O W é também acrocêntrico, porém banda C positivo e tem tamanho equivalente ao 6^o par. Já *T. solitarius* apresentou $2n = 80$, com os dois primeiros pares submetacêntricos, o 3^o acrocêntrico e os demais telocêntricos. O cromossomo Z foi acrocêntrico e equivalente em tamanho ao 4-5^o pares. Os padrões de bandeamento C para *T. solitarius* apresentaram marcações definidas na região centromérica dos macrocromossomos, exceto no cromossomo Z. As regiões organizadoras de nucléolo localizaram-se em um par de microcromossomos em ambas as espécies. Observou-se uma alta homeologia cromossômica entre as espécies pertencentes à família Tinamidae, sendo possível reuni-las em dois grupos: *Rynchotus*, *Nothura*, *Eudromia* e *Tinamus*, caracterizados pelo 2^o par submetacêntrico, e *Crypturellus*, que difere destas pela morfologia telocêntrica deste par cromossômico. As espécies do primeiro grupo estariam mais próximas das ratitas, porém com um maior grau de diferenciação entre os cromossomos sexuais.

PALAVRAS-CHAVE: bandeamento C, NORs, citogenética, *Crypturellus tataupa*, *Tinamus solitarius*

Entre as Aves Carinatae, os Tinamiformes (codornas, macucos, inhambus e perdizes) são considerados o grupo mais antigo e mais próximo das Ratitae, como indicam os dados referentes à disposição dos ossos da abóbada palatina (Cracraft 1974) e informações obtidas por hibridação de DNA (Sibley e Ahlquist 1981).

As aves da ordem Tinamiformes são endêmicas da região neotropical, sendo distribuídas do sul da Argentina ao México. O valor cinegético da carne destas aves tem provocado uma forte pressão predatória resultante da caça intensiva. Além disso, a diminuição do hábitat natural devido ao avanço da fronteira agrícola, tem tornado algumas espécies ameaçadas de extinção.

Das 47 espécies de Tinamiformes (Sibley 1996), somente sete foram analisadas citogeneticamente, a maioria delas apenas com coloração convencional: *Crypturellus parvirostris* (Lucca 1974, 1985), *Crypturellus tataupa* (Lucca 1985, Rocha 1987), *Nothura maculosa* (Lucca e Chamma 1977, Lucca

1985, Garnero e Gunski 2000, Pigozzi e Solari 2005), *N. minor* (Lucca 1985, Rocha 1987), *Rynchotus rufescens* (Moro et al. 1994, Garnero e Gunski 2000), *Tinamus solitarius* (Beltermam e De Boer 1990) e *Eudromia elegans* (Sasaki et al. 1980).

Técnicas de bandeamento foram utilizadas apenas em *E. elegans* (Banda C) (Sasaki et al. 1980), *R. rufescens* (bandas C e NOR) (Moro et al. 1994, Pigozzi e Solari 1999, Garnero e Gunski 2000) e *N. maculosa* (bandas C e NOR) (Garnero e Gunski 2000, Pigozzi e Solari 2005).

Diante disso, os objetivos deste trabalho foram obter padrões de bandeamento C e NORs para *C. tataupa* e *T. solitarius* amostrados no nordeste da Argentina, acrescentando informações sobre os mecanismos de evolução cariotípica do grupo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados quatro exemplares de *C. tataupa* (2 ♀ e 2 ♂), capturados com armadilhas artesanais (“arapucas”) no Município de Santa Ana, Departamento Candelária, Misiones,

Tabela 1. Razão entre braços (r), longo (l) e curto (c) e índice centromérico (ic) dos primeiros macrocromossomos e dos cromossomos sexuais (Z e W) de *Crypturellus tataupa* e *Tinamus solitarius*.

Table 1. Arms ratio (r), ratios of the long (l) and short (c) arms, and centromeric index (ic) of the first macrochromosomes and of the sexual chromosomes (Z and W) of *Crypturellus tataupa* and *Tinamus solitarius*.

Cromossomo n°	<i>C. tataupa</i>					<i>T. solitarius</i>				
	l	c	r	ic	Tipo ^a	l	c	r	ic	Tipo ^a
1	0,98	0,59	1,65	37,77	SM	1,12	0,67	1,67	37,38	SM
2	1,18	-	∞	0	T	0,93	0,47	2,05	33,33	SM
3	0,94	-	∞	0	T	1,05	0,10	9,50	9,52	A
4	0,64	-	∞	0	T	0,80	-	∞	0	T
5	0,55	-	∞	0	T	0,65	-	∞	0	T
Z	0,63	-	∞	0	T	0,72	-	∞	0	T
W	0,33	-	∞	0	T	-	-	-	-	-

^a A: acrocêntrico, SM: submetacêntrico, T: telocêntrico.

Argentina (27°22'S, 55°34'W). A identificação taxonômica dos exemplares de *C. tataupa* foi realizada pelo curador da Coleção Félix de Azara (CFA), Prof. J. Contreras, e as peles foram depositadas no Museu Bernardino Rivadavia. Foram também colhidas amostras sanguíneas de dois machos de *T. solitarius* mantidos em cativeiro no Museu de Ciencias Naturales e Historia "Antonio Ruiz de Montoya", Misiones, Argentina.

Para obtenção das metáfases de *C. tataupa* empregou-se a técnica de cultura direta de medula óssea (Garnero e Gunski

2000) e em *T. solitarius* a cultura de linfócitos de sangue periférico coletado das artérias umerais (Moorhead et al. 1960). A coloração convencional foi realizada com solução de Giemsa, em tampão fosfato 0,01M, pH 6,8, por 15 minutos. As técnicas de coloração diferencial de Banda C e de NOR foram realizadas segundo os protocolos de Sumner (1972) e Howell e Black (1980), respectivamente, com modificações.

A análise biométrica dos cromossomos foi realizada escolhendo-se e fotografando-se as 10 melhores metáfases de cada espécie, isto é, as que apresentaram ótima coloração e morfologia, com contornos bem definidos. Os pares de cromossomos foram recortados e ordenados do maior para o menor e foram mensurados mediante a utilização de uma régua milimetrada. Foi estimada a razão entre braços (r) e o índice centromérico (ic), segundo Guerra (1986). No primeiro caso, a posição do centrômero é definida pelo valor obtido da razão entre o braço longo (l) e o curto (c): $r = l/c$. No segundo, divide-se o tamanho do braço curto multiplicado por 100 pelo comprimento total do cromossomo: $ic = c \times 100 / c + l$. Os cariótipos foram classificados segundo a nomenclatura proposta por Guerra (1986).

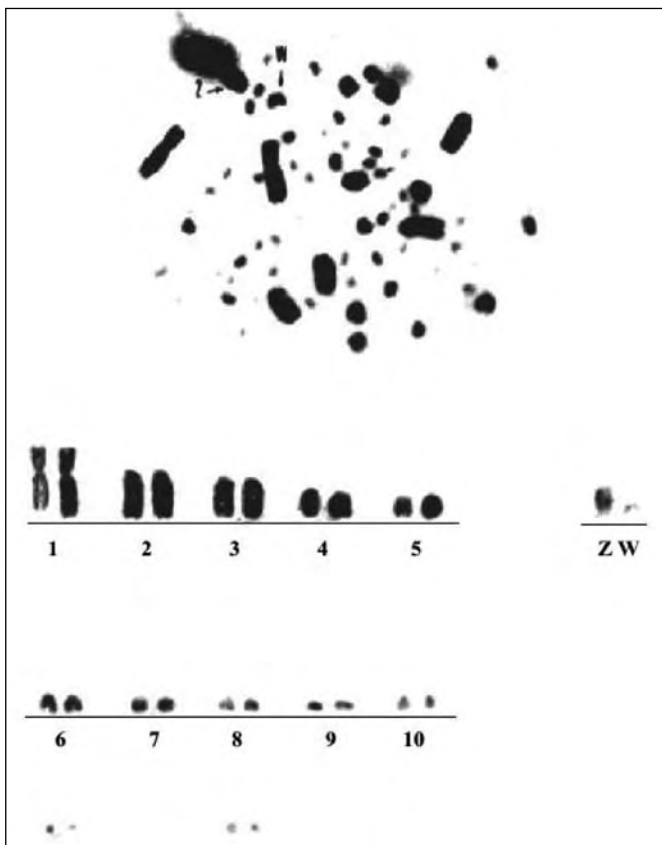


Figura 1. Metáfase e cariótipo parcial de um exemplar fêmea de *Crypturellus tataupa*, $2n = 78$.

Figure 1. Metaphase and partial karyotype of a female *Crypturellus tataupa*, $2n = 78$.

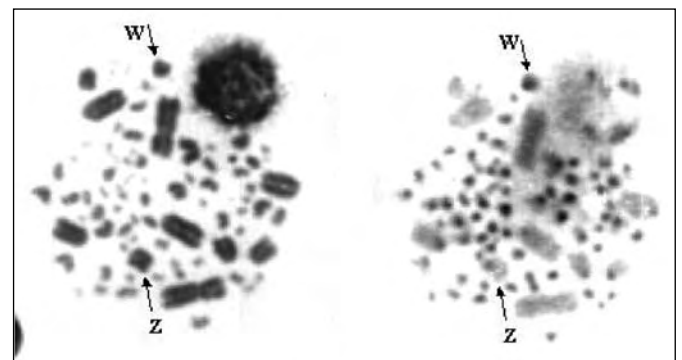


Figura 2. Análise sequencial Giemsa (esquerda) e bandeamento C (direita) de um exemplar fêmea de *Crypturellus tataupa*. As setas indicam os cromossomos sexuais.

Figure 2. Sequential analysis, Giemsa (left) and C banding (right), of a female *Crypturellus tataupa*. The arrows indicate the sexual chromosomes.

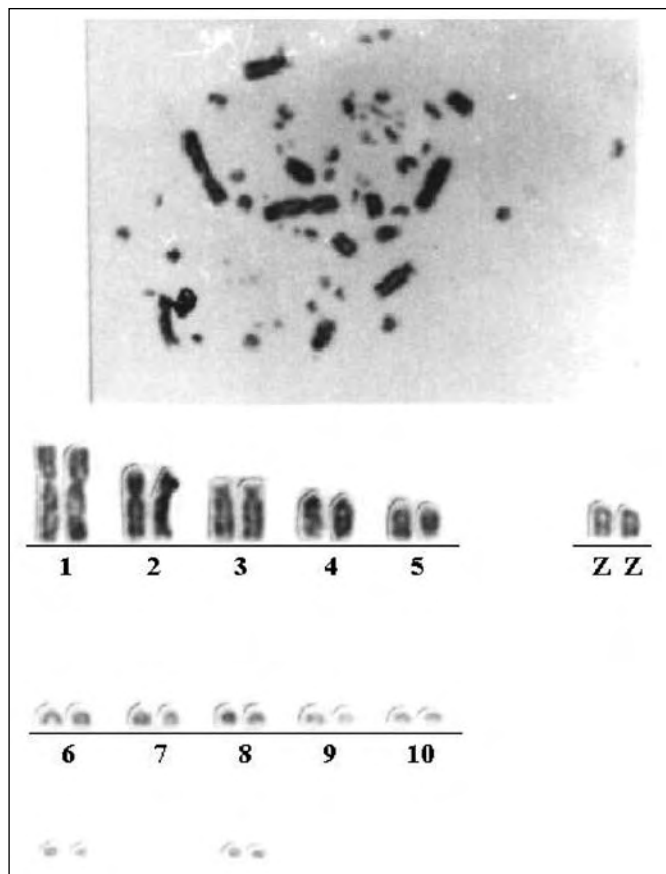


Figura 3. Metáfase e cariótipo parcial de um exemplar macho de *Tinamus solitarius*, $2n = 80$.

Figure 3. Metaphase and partial karyotype of a male *Tinamus solitarius*, $2n = 80$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie *C. tataupa* possui um cariótipo com $2n = \pm 78$ cromossomos (Figura 1), sendo o primeiro par submetacêntrico grande, o 2° e 3° pares telocêntricos medianos e os pares seguintes telocêntricos pequenos (Tabela 1). Os dados aqui apresentados corroboram com o número diplóide apresentado por Lucca (1985) e Rocha (1987). Os cariótipos foram equiva-

lentes também em morfologia, no entanto, estes autores utilizaram outro sistema de nomenclatura, considerando o primeiro par como sendo metacêntrico e os restantes acrocêntricos. O número diplóide desta espécie coincide com o descrito para *C. parvirostris* (Lucca 1974, 1985, Duarte e Giannoni, 1985).

A morfologia telocêntrica do 2° par diferencia o cariótipo de *C. tataupa* do apresentado pelas demais espécies da família, nas quais é submetacêntrico (Belterman e De Boer 1990, Moro *et al.* 1994, Rocha *et al.* 1996, Garnero e Gunski 2000). Também o diferencia das Ratites *Apteryx australis*, *Dromaius novaehollandiae*, *Casuarius casuarius*, *Pterocnemia pennata*, *Rhea americana* e *Struthio camelus*, nas quais este par é metacêntrico (Takagi *et al.* 1972, Benirschke *et al.* 1976, De Boer 1980, Ansari *et al.* 1988, Liotta e Gunski 1998, Gunski e Giannoni 1998).

O cromossomo Z é acrocêntrico, banda C negativo, e corresponde em tamanho ao 4° par autossômico. O W é também acrocêntrico, porém banda C positivo, e tem tamanho equivalente ao 6° par. Nos outros cromossomos do complemento observam-se marcações definidas na região centromérica, com exceção dos dois primeiros pares (Figura 2).

O complemento cromossômico de *T. solitarius* é de $2n = \pm 80$ (Figura 3), com os dois primeiros pares submetacêntricos, o 3° par acrocêntrico e os pares seguintes telocêntricos (Tabela 1), estando de acordo com a descrição prévia de Belterman e De Boer (1990). A presença do 3° par bibráquial é uma característica que distingue o cariótipo desta espécie dos cariótipos de *N. maculosa* e *R. rufescens*, e a aproxima do cariótipo das ratites: *D. novaehollandiae*, *C. casuarius* e *R. americana*.

Os padrões de bandeamento C (Figura 4) apresentam marcações definidas nas regiões centroméricas dos macrocromossomos, exceto no cromossomo Z, este último acrocêntrico e equivalente em tamanho ao 4-5° par. Igual reação ao tratamento salino do cromossomo Z observa-se nas outras espécies da família, como *N. maculosa* e *R. rufescens* (Moro *et al.* 1994, Garnero e Gunski 2000, Pigozzi e Solari 2005), além dos Rheiformes, como *D. novaehollandiae*, *P. pennata*, *R. americana* e *S. camelus* (Ansari *et al.* 1988, Liotta e Gunski 1998, Gunski e

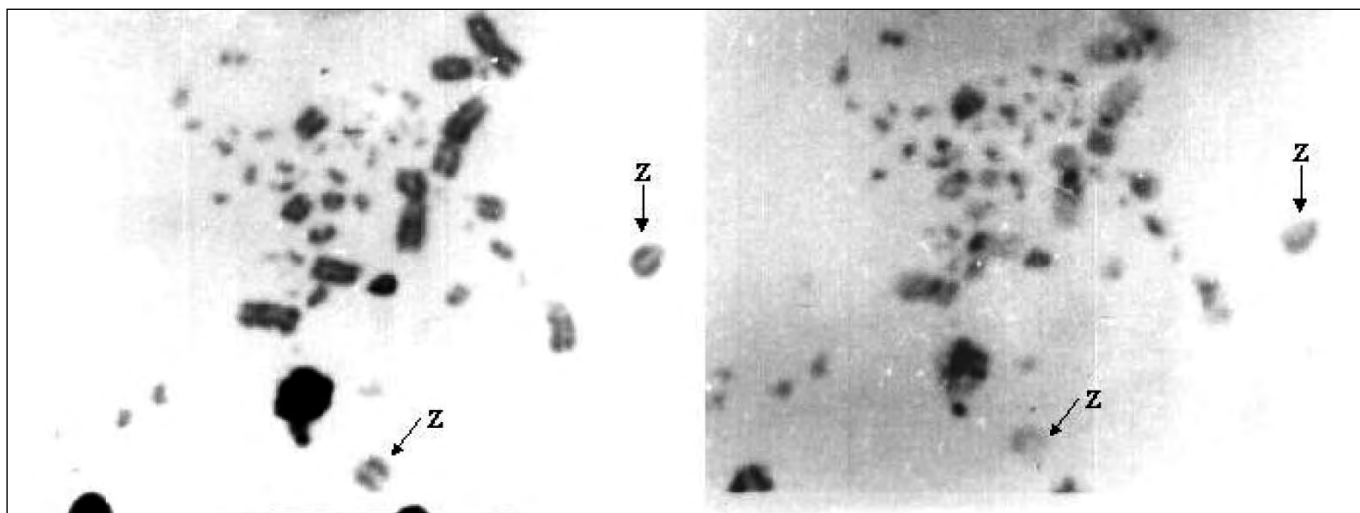


Figura 4. Análise seqüencial Giemsa (esquerda) bandeamento C (direita) de um exemplar macho de *Tinamus solitarius*. As setas indicam os cromossomos sexuais.

Figure 4. Sequential analysis, Giemsa (left) and C banding (right) of a male *Tinamus solitarius*. The arrows indicate the sexual chromosomes.

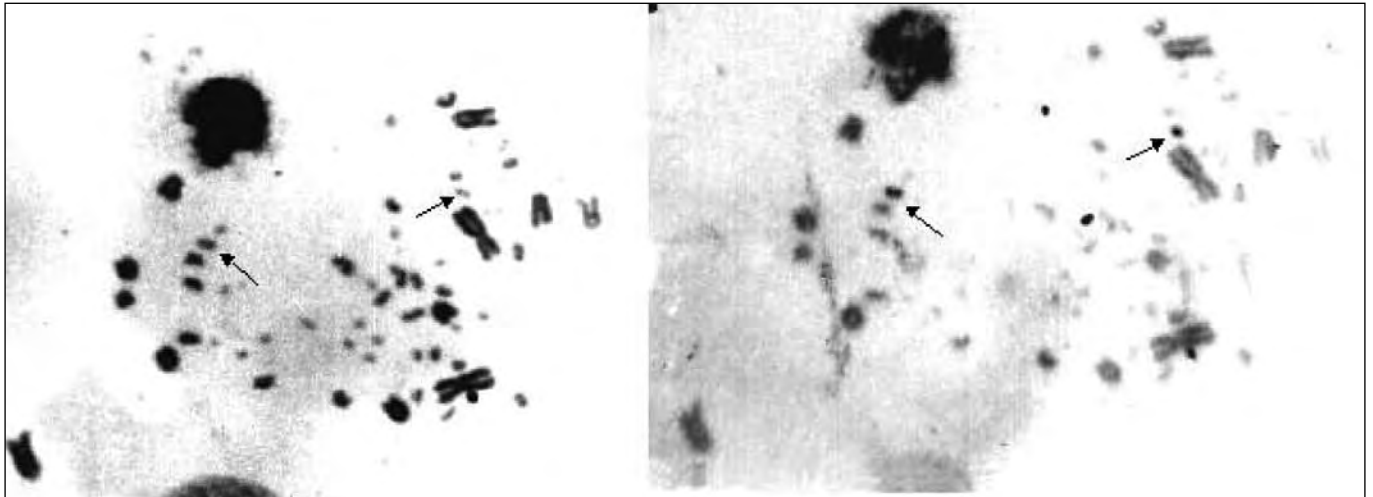


Figura 5. Análise seqüencial Giemsa (esquerda) e bandeamento NOR (direita) de um exemplar fêmea de *Crypturellus tataupa*. As setas indicam os organizadores nucleolares.

Figure 5. Sequential analysis, Giemsa (left) and NOR (right) of a female *Crypturellus tataupa*. The arrows indicate the sexual chromosomes

Giannoni 1998). Não foi possível a amostragem de indivíduos fêmeas de *T. solitarius*, permanecendo duvidosa a correta identificação do cromossomo W, o qual não havia sido identificado também na publicação de Belterman e De Boer (1990).

Em ambas as espécies aqui estudadas as regiões organizadoras de nucléolo localizaram-se num par de microcromossomos, como demonstrado pela análise seqüencial Giemsa-NOR (Figuras 5 e 6). Este padrão é similar ao apresentado por outras espécies da família já analisadas (Moro *et al.* 1994, Garnero e Gunski 2000).

As aves da família Tinamidae apresentam uma alta homeologia cromossômica, o que é evidenciado pela predominância de cromossomos telocêntricos de médio e pequeno porte e pela uniformidade dos padrões de bandeamentos C e NOR. É possível reuni-las em dois grupos de acordo com o padrão dos macrocromossomos grandes (Figura 7): *Rynchotus*, *Nothura*, *Eudromia* e *Tinamus*, caracterizados pelo 2° par submetacêntrico, e *Crypturellus*, no qual este par cromossômico é acrocêntrico. Os cariótipos das espécies do primeiro grupo são mais similares em relação aos cariótipos das Ratites, principalmente pela presença do segundo cromossomo

bibraquial, porém com um grau maior de diferenciação entre os cromossomos sexuais. Ainda, *T. solitarius* teria o cariótipo mais ancestral deste grupo, devido à bibraquialidade do 3° par e ao número diplóide de cromossomos ($2n = 80$), coincidentes com os de *A. australis*, *D. novaehollandiae*, *C. casuarius* e *R. americana* (Figura 7). Deve-se ressaltar que *R. americana* apresenta também bibraquialidade no 5° par cromossômico do complemento, assim como *P. pennata* e *S. camelus*.

O cromossomo W dos tinamídeos apresenta uma conformação intermediária entre o padrão encontrado nos Neognathas (altamente condensado e muito menor em tamanho do que o cromossomo Z) e nas Ratitae (altamente eucromático e igual ou ligeiramente menor em tamanho em relação ao cromossomo Z) (Takagi *et al.* 1972, Benirschke *et al.* 1976, De Boer 1980, Ansari *et al.* 1988, Liotta e Gunski 1998, Gunski e Giannoni 1998, Pigozzi 1999, Pigozzi e Solari 1999, 2005). Assim, as Ratites comportam-se como tendo quase livre a recombinação em seus cromossomos sexuais, no entanto, as espécies Neognathas apresentam uma limitada região de recombinação (Pigozzi e Solari 1997, Pigozzi e Solari 2005).

Nos Tinamiformes verifica-se uma diminuição do número

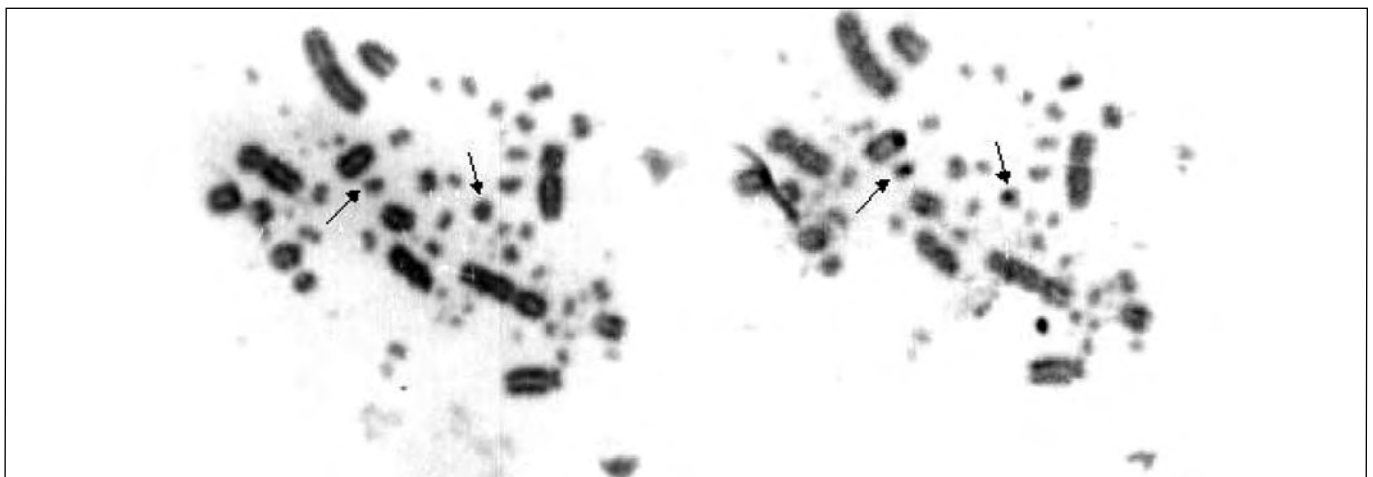


Figura 6. Análise seqüencial Giemsa (esquerda) e bandeamento NOR (direita) de um exemplar macho de *Tinamus solitarius*. As setas indicam os organizadores de nucléolo.

Figure 6. Sequential analysis, Giemsa (left) and NOR (right) of a male *Tinamus solitarius*. The arrows indicate the sexual chromosomes

cromossômico, de 80, como em *T. solitarius* e *E. elegans*, para 78, nas outras espécies da família. No entanto, não existe um aumento da bibraquialidade dos mesmos, como seria de se esperar se a diminuição fosse originária de fusões cêntricas ou translocações (Figura 7). Assim, pode-se sugerir que a redução do número diplóide se deve a perdas completas de microcromossomos.

Os Tinamiformes estão estreitamente relacionados com

as Ratites por possuírem palato primitivo, capacidade de vôo limitada e, como apresentado neste estudo, características cromossômicas similares (Figura 7), a ponto de ser praticamente impossível distinguir os cariótipos de *Tinamus*, *Apteryx*, *Casuarius* e *Dromaius*, entre outros. A homeologia cromossômica encontrada entre os Tinamidae reforça o monofiletismo das espécies do grupo.

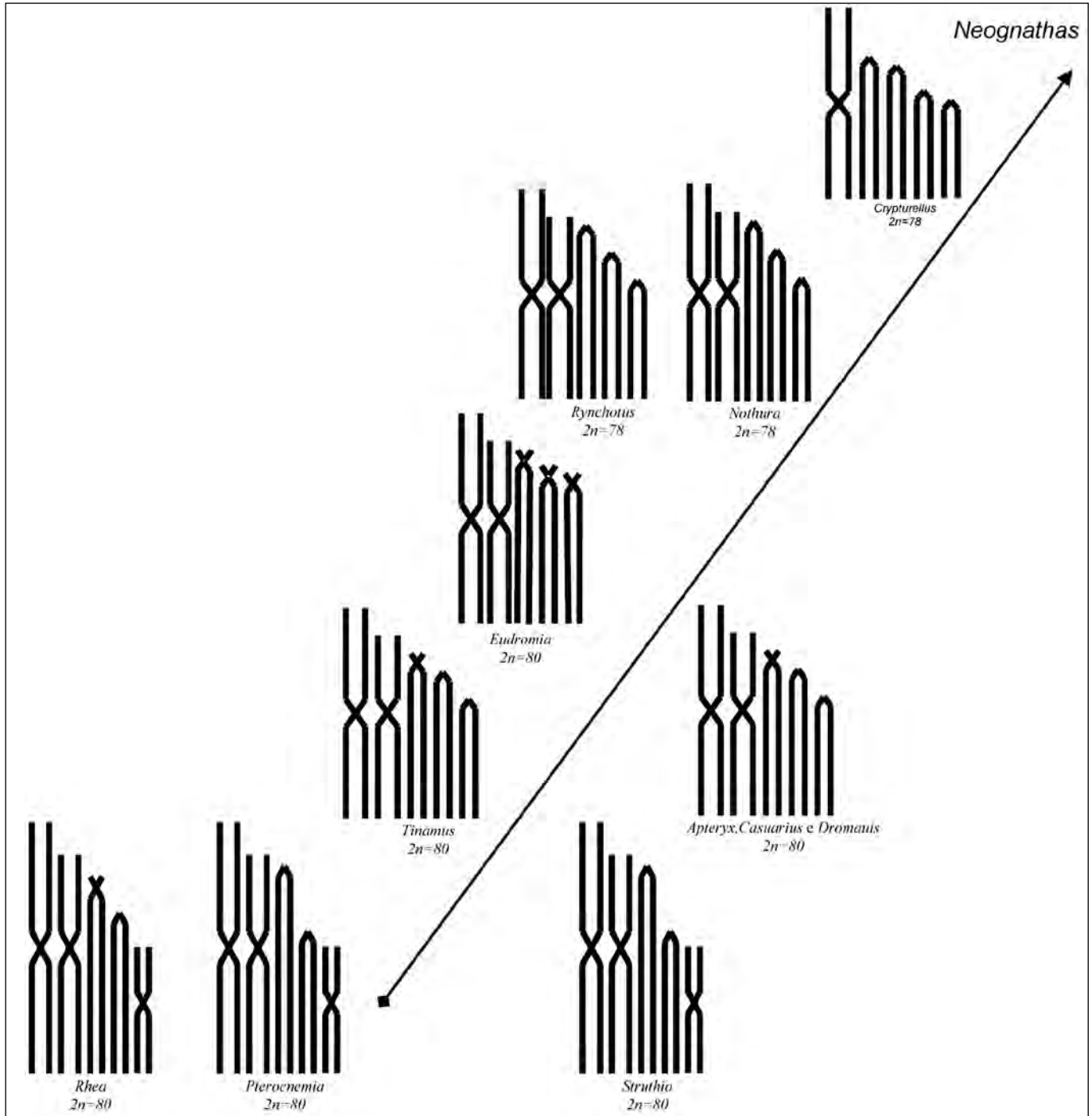


Figura 7. Esquema representativo da possível evolução cariotípica da família *Tinamidae* em relação às Ratites. Os cariótipos de *Rynchotus*, *Nothura*, *Eudromia* e *Tinamus*, caracterizados pelo 2º par submetacêntrico são mais similares aos observados nas ratites, principalmente pela presença do segundo par cromossômico bibraquial. *T. solitarius* teria o cariótipo mais ancestral deste grupo, devido à bibraquialidade do 3º par e ao número diplóide de cromossomos ($2n=80$), coincidentes com os de *Apteryx*, *Dromanius*, *Casuarius* e *Rhea*.

Figure 7. Possible cytotoxic relationship between the family *Tinamidae* and the Ratites. The karyotypes of *Rynchotus*, *Nothura*, *Eudromia* and *Tinamus*, that are characterized by the second pair submetacentric, seem to be more closely related to the karyotypes observed in the Ratites. *T. solitarius* would have the more ancestral karyotype among the *Tinamidae* species, which is demonstrated by 3rd pair biarmed and the diploid number ($2n=80$), which coincides with *Apteryx*, *Dromanius*, *Casuarius* and *Rhea*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Sebastián Cabanne e Ernesto Krauzuk pela assistência técnica.

REFERÊNCIAS

- Ansari, H. A., N. Takagi e M. Sasaki (1988) Morphological differentiation of sex chromosomes in three species of ratite birds. *Cytogenet. Cell Genet.* 47:185-188.
- Beltermam, R. H. R. e L. E. M. De Boer (1990) A miscellaneous collection of bird karyotypes. *Genetica* 83:17-29.
- Benirschke, R. J., R. E. Sekulovich e A. C. Risser (1976) The chromosomes of Darwin's rhea (*Pterocnemia p. pennata* - Aves). *Chromosome Inf.* 21:13-14.
- Cracraft, J. (1974) Phylogeny and evolution of the ratite birds. *The Ibis* 116 (4): 494-527.
- De Boer, L. E. M. (1980) Do the chromosomes of the kiwi provide evidence for a monophyletic origin of the ratites? *Nature* 287:84-85.
- Duarte, J. M. B. e M. A. Giannoni (1985) Análise citogenética de algumas espécies da ordem Tinamiformes (Aves). Jaboticabal: Encontro de Pesquisas Veterinárias.
- Garnero A. del V. e R. J. Gunski (2000) Comparative analysis of the karyotypes of *Nothura maculosa* and *Rynchotus rufescens* (Aves: Tinamidae). A case of chromosomal polymorphism. *The nucleus* 43:64-70.
- Guerra, M. (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* *Rev. Bras. Genet.* 9:741-743.
- Gunski, J. R. e M. L. Giannoni (1998) Nucleolar organizer regions and a new chromosome number for *Rhea americana* (Aves, Rheiformes). *Gen. and Mol. Biol.* 21:207-210.
- Howell, W. M. e D. A. Black (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015.
- Liotta, D. J. e R. J. Gunski (1998) Análisis citogenético de la especie *Pterocnemia pennata* (Aves, Rheidae). *Bol. Soc. Biol. Concepcion, Chile* 69:147-153.
- Lucca, E. J. de (1974) Cariótipo de 14 espécies de aves das ordens Cuculiformes, Galliformes, Passeriformes e Tinamiformes. *Rev. Bras. Pesq. Méd. Biol.* 7:253-263.
- _____ (1985) Análise comparativa do cariótipo de 4 espécies de aves da ordem Tinamiformes e as relações cariotípicas com Ratitae. *Naturalia* 10:57-63.
- _____ e L. Chamma (1977) Estudo do complemento cromossômico de 11 espécies de aves das ordens Columbiformes, Passeriformes e Tinamiformes. *Rev. Bras. Pesq. Méd. Biol.* 10:97-105.
- Moorhead, R. S., P. C. Howell, W. J. Mellman, D. M. Battips e D. A. Hundgerford (1960) Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20:613-616.
- Moro, M. E. G., M. L. Giannoni, J. A. Boer e P. A. Tosta (1994) Estudos da *Rynchotus rufescens* - perdiz (Aves: Tinamiformes) em cativeiro II. Citogenética. *Ars. Veterinaria* 10:41-49.
- Pigozzi, M. I. e A. J. Solari (1997) Extreme axial equalization and wide distribution of recombination nodules in the primitive ZW pair of *Rhea americana* (Aves, Ratitae). *Chromosome Res.* 5:421-428.
- _____ (1999) Origin and Evolution of the Sex Chromosomes in Birds. *Biocell* 23:79-95.
- _____ e A. J. Solari (1999) The ZW pairs of two paleognath birds from two orders show transitional stages of sex chromosome differentiation. *Chromosome Res.* 7:541-551.
- _____ e _____ (2005) Meiotic recombination in the ZW pair of a tinamid bird shows a differential pattern compared with neognaths. *Genome* 48:286-290.
- Rocha, G.T. (1987) *Estudo do complemento cromossômico e da região organizadora do nucléolo em algumas espécies de aves.* Dissertação de mestrado. Botucatu: UNESP.
- _____, M. S. dos Santos e E. J. De Lucca (1996) Cytogenetics of the family Tinamidae (Tinamiformes-Aves). *Rev. Bras. Genét.* 19(Suppl.):110.
- Sasaki, N., C. Nishida, N. Takagi e H. Hori (1980) Sex chromosomes of the elegant crested Tinamou, *Eudromia elegans*. *Chrom. Inf. Serv.* 29:19-21.
- Sibley, C. G. e J. Ahlquist (1981). The phylogeny and relationships of the ratites birds as indicated by DNA-DNA hybridization. *Proc. End. Int. Congr. Sys. and Evol. Biol.* 301-335.
- _____ (1996) Birds of the world 2.0. Thayer Birding Software.
- Sumner, A. T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell Res.* 75:304-306.
- Takagi, N., M. Itoh e M. Sasaki (1972) Chromosome studies in four species of *Ratitae* (Aves). *Chromosoma* 36:281-291.