

Comparação genômica em aves através de sondas cromossomo-específicas

Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira^{1,3}, Marcella Mergulhão Tagliarini², Cleusa Yoshiko Nagamachi¹ e Julio César Pieczarka¹

¹ Laboratório de Citogenética, Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Campus Universitário do Guamá, 66075-990, Rua Augusto Correa, n.º 01, Belém, PA, Brasil. E-mail: ehco@ufpa.br

² Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

³ Autor para Correspondência

Recebido em 26 de agosto de 2005; aceito em 05 de janeiro de 2006

ABSTRACT. Genomic comparison in birds using chromosome-specific probes. Advances in molecular cytogenetics with fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and flow sorting of chromosomes provided a breakthrough for comparative chromosome studies in avian species. The chicken provides a “default map” for various birds. Recent chromosome painting studies in birds with chicken chromosome-specific DNA probes have demonstrated chromosome homeologies and interchromosomal rearrangements between chicken and various species belonging to different orders. The most dramatic changes in the genomic reorganization was observed in the comparison between chicken, which presents a typical bird karyotype, and the harpy eagle, with a derived karyotype like other birds of prey. The data showed how the organization into micro- and macrochromosomes has been lost in the harpy eagle, seemingly without any preference or constraints. In face of this important new technology, we discuss the results already published, and the use of chromosomal data in phylogenetic analysis as a powerful tool.

KEY WORDS: FISH, chromosomal rearrangements, phylogenomics, karyotype variation.

RESUMO. Os avanços na citogenética molecular com a hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) e separação de cromossomos por citometria de fluxo trouxeram um grande avanço em estudos cromossômicos comparativos entre espécies de Aves. Desde então, o galo doméstico é considerado um “mapa padrão” para várias aves. Estudos recentes de pintura cromossômica demonstraram homeologias cromossômicas e rearranjos intercromossômicos entre o galo e várias espécies pertencentes a diferentes ordens. As mudanças mais dramáticas na reorganização genômica foram observadas entre o galo, que apresenta o cariótipo padrão das aves, e a harpia, que apresenta um cariótipo derivado, como outras aves de rapina. Os dados mostraram como a organização em micro e macrocromossomos foi perdida na harpia, aparentemente sem uma direção definida. Em face da importância dessa nova tecnologia, o presente trabalho discute os resultados já publicados e o uso dos dados cromossômicos em análises filogenéticas como uma poderosa ferramenta.

PALAVRAS-CHAVE: FISH, rearranjos cromossômicos, filogenômica, variação cariotípica.

CONSIDERAÇÕES GERAIS: CITOGENÉTICA CLÁSSICA EM AVES

A cariotipagem de uma espécie é fundamental para qualquer metodologia de mapeamento gênico, já que tanto mapas gênicos como físicos são feitos com referência à posição cromossômica. Um cariótipo traz muitas informações sobre características genéticas de um animal ou linhagem celular. Esses aspectos podem ser relacionados a doenças, infertilidade ou gênese de tumores (Masabanda *et al.* 2004). Além disso, a detecção de rearranjos cromossômicos fornece importantes dados que podem ser utilizados em análises filogenéticas (Pieczarka e Nagamachi 2004).

A citogenética comparativa iniciou-se nos anos 60, com a aplicação da coloração convencional, método no qual os cromossomos são corados uniformemente. Os cariótipos eram comparados baseando-se no número total de cromossomos e na posição do centrômero, que distingue os cromossomos morfológicamente. Nessa época, já foi observado que o complemento cromossômico das espécies de Aves analisadas era bastante peculiar, diferindo do cariótipo dos mamíferos por apresentar-se bimodal, ou seja, formado por dois grupos distintos de cromossomos – macrocromossomos, de maior tamanho, com cerca de oito a dez pares, e microcromossomos, puntiformes e muito numerosos, em torno de 25-35 pares (Figura 1). Em contraste, os mamíferos apresentam cariótipos caracterizados por uma diminuição gradual do tamanho dos

cromossomos, com poucos cromossomos tão pequenos como os microcromossomos das aves.

Apesar das Aves apresentarem um número de espécies estimado em 9,7 mil no mundo e mais de 1500 só no Brasil (Silva 1998), há uma defasagem em estudos citogenéticos nesse grupo quando comparado a outros vertebrados, como mamíferos e peixes. Segundo de Oliveira e Jorge (2000), isto se deve não só às características peculiares do cariótipo das aves e às dificuldades técnicas delas decorrentes, mas também ao pouco investimento pessoal e financeiro nesta área de estudo. Estima-se que apenas 10% das espécies de aves brasileiras tenham seus cariótipos conhecidos (de Lucca e Rocha 1992). Infelizmente, este percentual ainda não sofreu alteração significativa, e reflete também a realidade quando consideramos o total de espécies de Aves existentes.

A aplicação de técnicas de coloração diferencial, como os bandeamentos cromossômicos, trouxe uma caracterização mais detalhada do cariótipo, com identificação individual dos pares cromossômicos, distribuição de segmentos heterocromáticos, localização dos genes para RNA ribossômico e uma melhor compreensão da estrutura cromossômica. Os bandeamentos cromossômicos permitem a detecção e interpretação de rearranjos cromossômicos, auxiliando no estabelecimento de relações cariotípicas e filogenéticas entre as espécies. Entretanto, poucas das espécies de Aves analisadas apresentam dados de bandeamentos, tais como bandeamentos G, C e NOR. Um maior número de dados citogenéticos permitiria

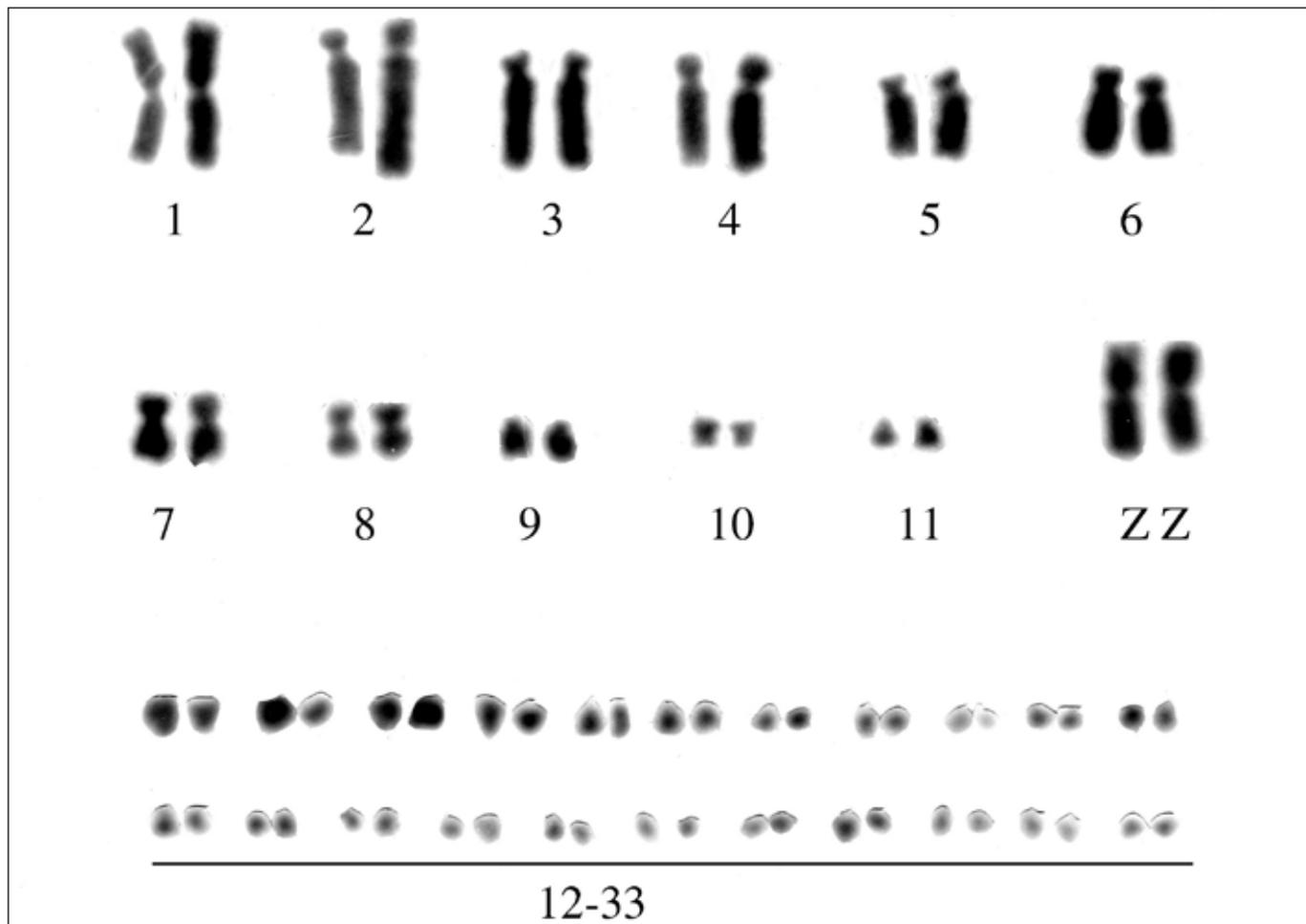


Figura 1. Cariótipo de arara-vermelha-grande (*Ara chloroptera*) em coloração convencional, exemplificando o cariótipo típico observado na maioria das aves já analisadas citogeneticamente. Esse cariótipo é bimodal, com dois grupos distintos de cromossomos: macrocromossomos (1-11 e o par sexual) e microcromossomos. Essa metáfase apresentou 68 cromossomos, porém o número diplóide dessa espécie ainda apresenta controvérsias. Devido ao pequeno tamanho dos microcromossomos, alguns deles podem se perder durante a preparação da lâmina.

Figure 1. Karyotype of *Ara chloroptera* obtained with conventional Giemsa staining, depicting a typical bird karyotype. This karyotype is bimodal, presenting two distinct groups of chromosomes: the macrochromosomes (1-11 and the sexual pair) and the microchromosomes. The metaphase here presented showed 68 chromosomes, however, the diploid number of this species is still controversial. Because of the small size of the microchromosomes, some of them can be lost during the preparation of the slides.

a análise mais pormenorizada dos mecanismos envolvidos na diferenciação cromossômica nesse grupo. Além disso, já se observou que, mesmo com o baixo número de espécies analisadas, certos grupos têm mostrado uma razoável variação cromossômica, o que poderia encorajar a aplicação de estudos citogenéticos mais refinados. A detecção de rearranjos cromossômicos é importante não só para o entendimento da reorganização genômica dos diferentes grupos a partir de um cariótipo ancestral, mas também em análises filogenéticas, já que representam caracteres muitas vezes exclusivos de um determinado grupo, agindo assim como sinapomorfias em análises cladísticas.

Um exemplo da aplicação de dados cromossômicos no entendimento da evolução cariotípica e filogenia de Aves foi apresentado por Bed'Hom (1999). Esse autor analisou o cariótipo de diversas aves de rapina, através de técnicas de citogenética clássica e molecular, e propôs teorias interessantes sobre o índice de rearranjos cromossômicos, além de apresentar o padrão de bandejamento G, distribuição de blocos

heterocromáticos e localização das regiões organizadoras de nucléolo. É importante ressaltar que as aves de rapina, especialmente os Accipitridae, vêm sendo objeto de diferentes estudos citogenéticos, principalmente devido às peculiaridades de seus cariótipos, que apresentam números cromossômicos relativamente mais baixos que outras aves, além da presença de poucos pares de microcromossomos. O autor constatou que a diminuição média do número diplóide de Accipitridae ($2n$ médio = 66) e outras aves ($2n$ médio = 80) é de 14 pares, enquanto o número fundamental, ou seja, o número de braços cromossômicos, é em média $NF = 105$ e $NF = 92$, respectivamente, e sugeriu não só a ocorrência de diversas translocações, como também de inversões pericêntricas.

CITOGENÉTICA MOLECULAR

O desenvolvimento de novas metodologias em seqüenciamento de DNA, mapeamento gênico e análise cromossômica permitiram um grande avanço na compreensão da organiza-

ção, estrutura e evolução do complemento cromossômico. As técnicas de hibridização *in situ* permitiram uma ligação entre os dados moleculares de seqüências de DNA e a citogenética, podendo ser utilizadas no mapeamento físico dessas seqüências e na identificação e caracterização de cromossomos ou segmentos cromossômicos (Schwarzacher e Heslop-Harrison 2000). Pela comparação da ordem e seqüência de genes em diferentes genomas, é possível traçar os caminhos evolutivos tomados pelo ancestral desses grupos. O potencial dessas metodologias é bem ilustrado em trabalhos publicados principalmente em mamíferos (revisão em Chowdhary e Raudsepp 2001, Alkalaeva *et al.* 2002), dentre os quais podemos destacar as análises em primatas, que já incluem um grande número de espécies analisadas (revisão em Pieczarka e Nagamachi 2004).

Uma das técnicas mais importantes é a pintura cromossômica comparativa (ZOO-FISH). Essa técnica consiste na separação individual de cromossomos por citometria de fluxo e posterior produção de sondas marcadas por fluorocromos. As sondas são utilizadas em experimentos de hibridização *in situ* em cromossomos metafásicos de outras espécies, permitindo a identificação exata de cromossomos ou segmentos cromossômicos entre espécies filogeneticamente distantes. Os expe-

rimentos podem utilizar uma única sonda, ou diversas sondas marcadas com fluorocromos diferentes, e que serão distinguidas pelas suas cores.

A PINTURA CROMOSSÔMICA EM AVES

A pintura cromossômica comparativa em Aves poderá superar as limitações impostas pelas características do seu cariótipo, pois, devido ao seu pequeno tamanho, um grande número de microcromossomos não apresenta padrões de bandeamento que permitam a comparação e análise de homeologias. Poucos artigos com aplicação de sondas cromossomo-específicas em aves foram publicados nos últimos anos, explorando diferentes abordagens evolutivas, tais como mecanismos de diversificação cromossômica (Shetty *et al.* 1999, de Oliveira *et al.* 2005), filogenia (Shibusawa *et al.* 2004a, b), diferenciação dos cromossomos sexuais (Graves e Shetty 2001), e mapeamento cromossômico (Masabanda *et al.* 2004), entre outros.

Até o momento, foram utilizadas sondas de uma única espécie (*Gallus gallus*) nas comparações cromossômicas entre aves. Essa espécie apresenta o mapeamento gênico bem desenvolvido. A aplicação de sondas cromossomo-específicas dos macrocromossomos de *Gallus* em emu (*Dromaius nova-*

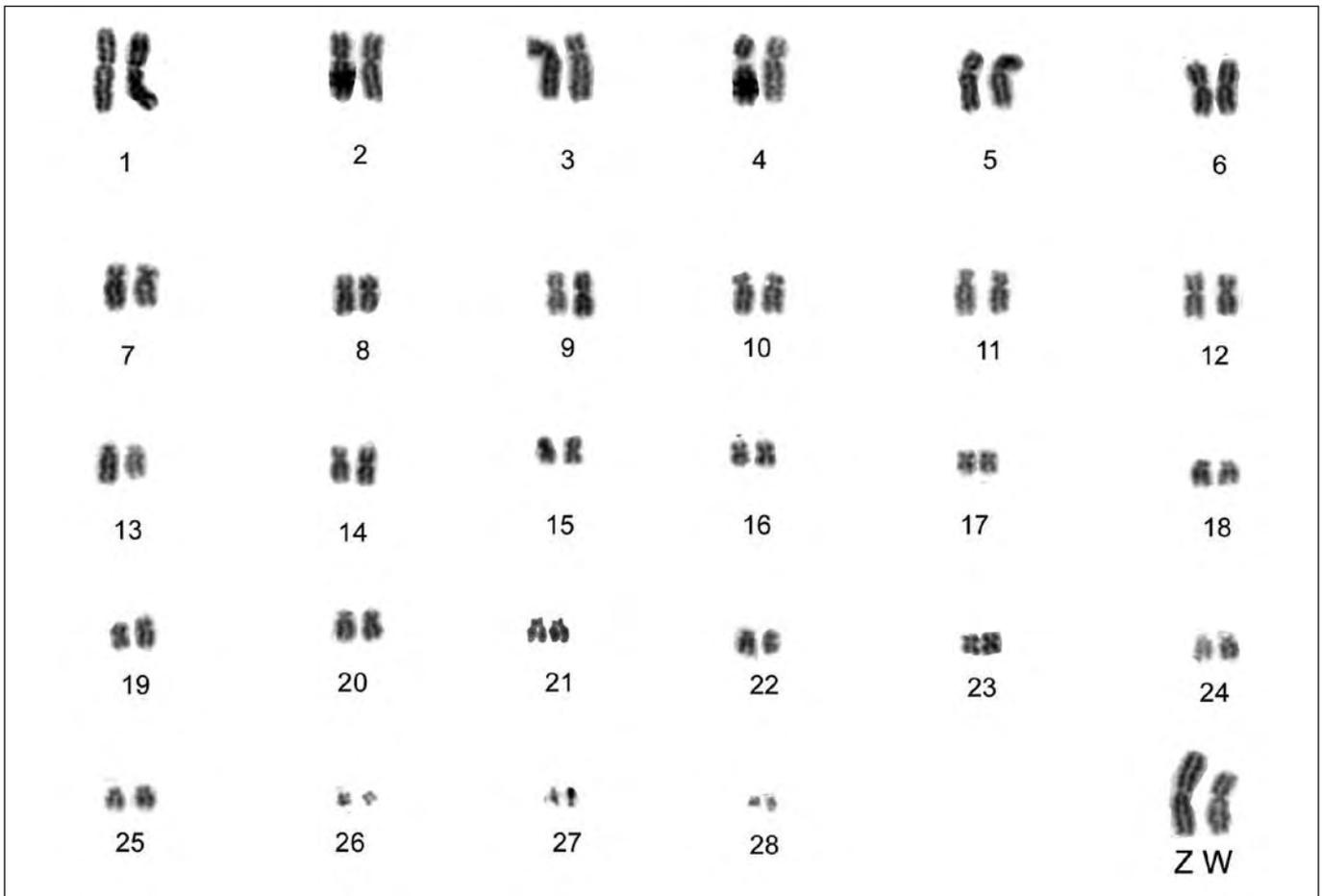


Figura 2. Cariótipo de harpia (*Harpia harpyja*). Como em outras aves de rapina, essa espécie apresenta um número diplóide relativamente baixo ($2n = 58$) e um cariótipo gradual, já que não apresenta uma divisão nítida entre macro e microcromossomos.
 Figure 2. Karyotype of *Harpia harpyja*. Like other Falconiformes, this species present a relatively small diploid number ($2n = 58$), and its karyotype does not present a well defined subdivision between macro and microchromosomes.

ehollandiae), duas espécies separadas por 80 milhões de anos, revelou apenas um rearranjo cromossômico, já que o cromossomo GGA 4 marcou um macrocromossomo e um microcromossomo em *Dromaius* (Shetty *et al.* 1999). Posteriormente, a sonda GGA 4 apresentou resultados semelhantes no condor da Califórnia (*Gymnogyps californianus*), pombo (*Columba livia*), tentilhão (*Fringilla coelebs*), tordo (*Turdus iliacus*) e três espécies de faisão, entre outras (Raudsepp *et al.* 2002, Guttenbach *et al.* 2003, Derjusheva *et al.* 2004): apesar de apresentarem diferentes números cromossômicos, todas essas espécies apresentaram um par de macrocromossomos e um de microcromossomos marcados com a sonda GGA 4. Aparentemente, essa seria a condição plesiomórfica, enquanto a forma observada em *Gallus*, resultante da fusão desses dois pares, representaria um estado apomórfico.

Espécies que apresentam o cariótipo formado por um grupo de macrocromossomos (aproximadamente 8-10 pares) e muitos pares de microcromossomos mostram uma grande constância cariotípica, com a maioria dos grupos sintênicos mantendo-se inalterada. Esse cariótipo básico deve ser semelhante ao cariótipo ancestral das Aves, já que alguns répteis apresentam o cariótipo bimodal e as análises de mapeamento gênico identificaram uma ordem semelhante àquela observada em *Gallus* (Rodionov 1997, Derjusheva *et al.* 2004). Dessa forma, os dados de pintura cromossômica sugerem que o cariótipo ancestral hipotético das Aves teria $2n = 80$, com um par a mais do que *Gallus gallus*, já que o cromossomo GGA 4 corresponde a dois cromossomos distintos em espécies pertencentes a grupos taxonômicos diferentes (Raudsepp *et al.* 2002, Shibusawa *et al.* 2004a).

Uma grande expectativa foi criada em relação aos resultados de pintura cromossômica em Accipitridae: as hipóteses sobre a evolução cromossômica nesse grupo sempre evocaram a ocorrência de translocações e fusões envolvendo principalmente os microcromossomos (De Boer 1976, Bed'Hom 1999). Recentemente, foram publicados os primeiros resultados utilizando sondas cromossomo-específicas de *Gallus* em experimentos de hibridização *in situ* no cariótipo da harpia (*Harpia harpyja*) (de Oliveira *et al.* 2005). Como outras aves de rapina, a harpia apresenta um número diplóide relativamente baixo, $2n = 58$, e poucos pares de microcromossomos (Figura 2). O trabalho foi realizado com a utilização de dois *pools* diferentes de sondas. No primeiro *pool*, três grupos cromossômicos foram marcados com cores distintas: os cinco primeiros pares mais o Z em azul, os pares 6 a 10 em verde, e 19 pares distintos de microcromossomos em vermelho. O experimento revelou uma completa reorganização genômica na harpia, com a ocorrência de fusões, translocações e fissionamentos (Figura 3). A aplicação do segundo *pool*, formado pelos cromossomos GGA 1-6 e Z, cada um marcado com uma cor distinta, mostrou que os maiores pares cromossômicos de *Gallus* apresentam-se fissionados no cariótipo da harpia, originando de 2 a 5 cromossomos distintos. O cromossomo GGA 4 marcou dois pares distintos, como o observado em outras espécies de Aves. O cromossomo GGA 1 foi o par que sofreu o maior

número de rearranjos, participando da formação de 5 pares distintos na harpia. Além disso, a sonda cromossomo específica GGA Z marcou não só o cromossomo Z da harpia, mas também quase a totalidade do cromossomo W, que se apresenta normalmente de grande tamanho em algumas aves de rapina. Esses dados mostram a ocorrência de uma drástica reorganização genômica na harpia, que pode ser estendida para outras aves de rapina com cariótipos similares.

A aplicação da pintura cromossômica em outros grupos de aves que também apresentam cariótipos altamente derivados, como os Charadriiformes (o gênero *Burhinus* apresenta espécies com $2n = 44$), deverá trazer resultados tão surpreendentes como os observados na harpia. Como apenas poucas espécies de aves apresentam seus cariótipos analisados, mesmo em coloração convencional, há a possibilidade de que a variabilidade cromossômica dessa classe encontre-se subestimada.

PERSPECTIVAS: USO DA PINTURA CROMOSSÔMICA EM ESTUDOS FILOGENÉTICOS

O uso da pintura cromossômica recíproca permite a detecção de grupos sintênicos conservados e rearranjos cromossômicos que ocorreram durante a divergência cariotípica entre as espécies analisadas. O poder dessa metodologia ficou bem ilustrado nos resultados da comparação entre *Gallus* e harpia (de Oliveira *et al.* 2005). Um número maior de espécies analisadas por essa técnica permitiria a identificação de rearranjos cromossômicos comuns a diferentes grupos de espécies, que em uma análise filogenética funcionariam como sinapomorfias na resolução de filogenias ainda controversas. É importante observar que os rearranjos cromossômicos são altamente específicos. Em primatas do Novo Mundo, de Oliveira (2001) observou a ocorrência de apenas duas reversões em 184 rearranjos diferentes. No caso de Falconiformes, cuja filogenia ainda não foi inteiramente resolvida, a aplicação de sondas cromossomo-específicas poderia trazer informações importantes a respeito das relações filogenéticas entre as espécies analisadas. O grande número de rearranjos cromossômicos observados em harpia sugere a existência de grupos de rearranjos que podem ser exclusivos de ramificações dentro do clado das aves de rapina, que poderiam ser explorados em análises filogenéticas minuciosas.

Mesmo em aves com aparente conservação cromossômica, dados interessantes podem ser obtidos com técnicas variantes da pintura cromossômica. Sondas construídas a partir de segmentos de DNA, como os clones de cDNA permitem também a análise do mapeamento gênico dessas espécies, o que pode revelar rearranjos intracromossômicos não detectados pela aplicação de sondas cromossomo-específicas. Um exemplo interessante é a comparação entre oito espécies pertencentes à ordem Galiformes (Shibusawa *et al.* 2004a). Esses autores detectaram vários rearranjos intracromossômicos não revelados pelo uso de sondas cromossomo-específicas: várias inversões ocorreram nos diferentes macrocromossomos, e as relações filogenéticas entre essas espécies, propostas a partir

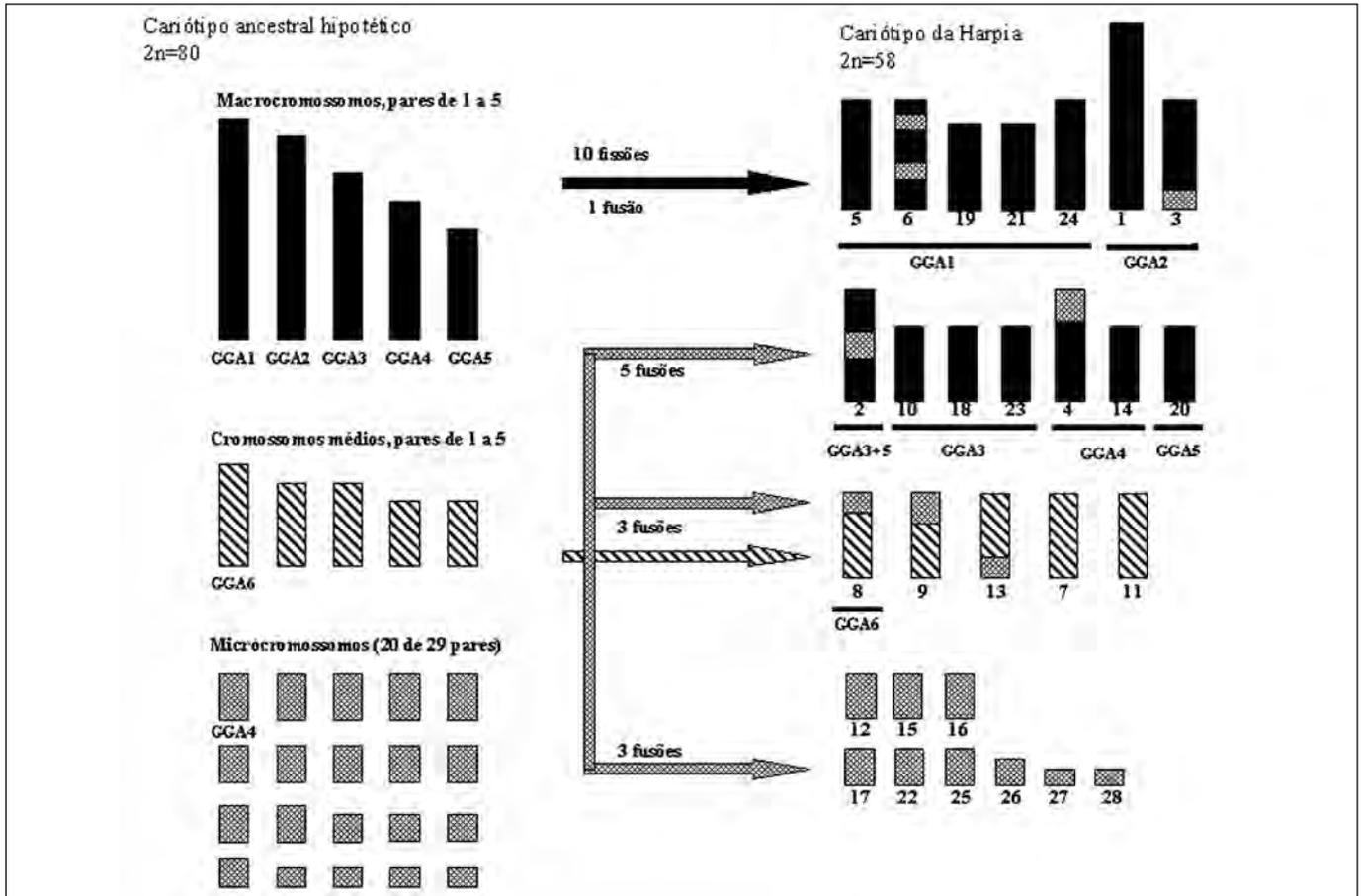


Figura 3. Rearranjos cromossômicos no cariótipo da harpia (*Harpia harpyja*). Comparado com o cariótipo ancestral hipotético das aves ($2n = 80$), o cariótipo da harpia passou por uma grande reorganização, com a ocorrência de fusões e fissões cromossômicas envolvendo tanto os macrocromossomos como os microcromossomos. Entre os autossomos, as sondas cromossomo-específicas de *Gallus gallus* utilizadas na comparação corresponderiam a 10 pares de macrocromossomos e 20 pares de microcromossomos no cariótipo ancestral. Os pares GGA1-6 foram identificados individualmente. O par sexual não se encontra representado no esquema.

Figure 3. Chromosomal rearrangements in the karyotype of *Harpia harpyja*. Compared to the hypothetical ancestral birds karyotype ($2n = 80$), the karyotype of *H. harpyja* experienced a significant reorganization, with fusions and fissions, involving both macro and microchromosomes. The chromosome-specific probes of *Gallus gallus* used in the comparison, would correspond to 10 pairs of macrochromosomes and 20 pairs of microchromosomes in the ancestral karyotype. The pairs GGA1 - 6 were individually identified. The sexual pair is not showed.

do uso dos dados cromossômicos, tiveram uma grande semelhança com propostas anteriores construídas a partir de dados moleculares.

Os exemplos citados anteriormente indicam que a filogenômica a partir do uso de sondas cromossomo-específicas ou segmento-específicas é uma poderosa ferramenta filogenética, e sua aplicação poderá trazer não só o esclarecimento nas relações de parentesco entre diferentes grupos de aves, mas também sobre os mecanismos de reorganização genômica que ocorreram nessa classe.

Entretanto, deve-se considerar que há a necessidade também da caracterização do cariótipo das espécies de aves através de técnicas de bandeamento cromossômico. A pintura cromossômica traz resultados mais satisfatórios quando aplicadas em espécies com cariótipos devidamente analisados. Assim, deve-se incentivar a análise de cariótipos de um maior número de espécies, através de técnicas de bandeamento cromossômico. Essa etapa, além de imprescindível para a caracterização básica do cariótipo, tem a vantagem de se ajustar melhor à realidade dos laboratórios brasileiros, visto que a metodologia

de citogenética molecular é relativamente dispendiosa.

A equipe do Laboratório de Citogenética da Universidade Federal do Pará vem analisando o complemento cromossômico de Aves há aproximadamente três anos. Nesse período, várias espécies pertencentes a diferentes ordens, em especial Falconiformes, tiveram seus cariótipos caracterizados por bandeamento G, C e NOR. Um dos pontos que influenciaram o sucesso que vem sendo alcançado foi a melhoria nas técnicas de obtenção de cromossomos metafásicos. O grupo vem utilizando não só a cultura de leucócitos de sangue periférico, mas também técnicas de cultura de tecido a partir de polpa dérmica ou biópsias. Recentemente, em um convênio com a Universidade de Cambridge, foram produzidas oito sondas cromossomo-específicas da harpia, a partir de culturas de fibroblastos. Essas sondas vêm sendo caracterizadas, e o próximo objetivo é a conclusão da obtenção de sondas dessa espécie e sua aplicação em estudos filogenéticos envolvendo diferentes espécies de aves de rapina e, posteriormente, de outros grupos de aves. Em um futuro próximo, é provável que haja um grande aumento no número de estudos cariotípicos em Aves, e com

isso um melhor esclarecimento não só dos processos ocorridos durante a diversificação cromossômica do grupo, mas também das relações filogenéticas entre os diferentes ramos dessa classe, que, com exceção dos peixes, apresenta o maior número de espécies entre os vertebrados.

REFERÊNCIAS

- Alkalaeva, E. Z., V. A. Trifonov, P. L. Perelman e A. S. Graphodatsky (2002) Comparative chromosome painting. *Rus. J. Genet.* 38:869–876.
- Bed'Hom, B. (1999) *Etude des caryotypes atypiques des Accipitridae (Aves, Falconiformes) par cytogenetique classique et moleculaire, et modelisation de leur evolution.* Tese de Doutorado. Paris, França: Museu Nacional de História Natural.
- Chowdhary, B. P. e T. Raudsepp (2001) Chromosome painting in farm, pet and wild animal species. *Methods Cell Sci.* 23:37–55.
- De Boer, L. E. M. (1976) The somatic chromosome complements of 16 species of Falconiformes (Aves) and the karyological relationships of the order. *Genetica* 46:77–113.
- De Lucca, E. J. e G. T. Rocha (1992) Citogenética de Aves. *Bol. Mus. Para. Emilio Goeldi, série Zool.* 8:33–68.
- De Oliveira, E. H. C. (2001) *Filogenia da subfamília Atelinae (Primates, Atelidae): análise comparativa por pintura cromossômica multicolor.* Tese de doutorado. Curitiba: Universidade Federal do Paraná.
- De Oliveira, E. H. C., F. Habermann, O. Lacerda, I. J. Sbalqueiro, J. Wienberg e S. Muller (2005) Chromosome reshuffling in birds of prey: the karyotypes of the world's largest eagle (Harpy eagle, *Harpia harpyja*) compared to that of the chicken (*Gallus gallus*). *Chromosoma* 114:338–343.
- De Oliveira, M. D. V. e W. Jorge (2000) Análise cromossômica em Aves. *Melopsittacus* 3:72–80.
- Derjusheva, S., A. Kurganova, F. Haberman e E. Gaginskaia (2004) High chromosome conservation detected by comparative chromosome painting in chicken, pigeon and passerine birds. *Chromosome Res.* 12:715–723.
- Graves, J. A. M. e S. Shetty (2001) Sex from W to Z: Evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. *J. Exp. Zool.* 290:449–462.
- Guttenbach, M., I. Nanda, W. Feichtinger, J. S. Masabanda, D. K. Griffin e M. Schmid (2003) Comparative chromosome painting of chicken autosomal paints 1–9 in nine different bird species. *Cytogenet. Genome Res.* 103:173–184.
- Masabanda, J. S., D. W. Burt e P. C. M. O'Brien (2004) Molecular cytogenetic definition of the chicken genome: the 1st complete avian karyotype. *Genetics* 166:1367–1373.
- Pieczarka, J. C. e C. Y. Nagamachi (2004) Pintura cromossômica como instrumento para estudos filogenéticos em primatas, p. 115–132. Em: M. Guerra (ed.). *FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética.* Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética.
- Rodionov, A. V. (1997) Evolution of avian chromosomes and linkage groups. *Rus. J. Genet.* 33:605–617.
- Raudsepp, T., M. L. Houck, C. O. Brien, M. A. Ferguson-Smith, O. A. Ryder e B. P. Chowdhary (2002) Cytogenetic analysis of California condor (*Gymnogyps californianus*) chromosomes: comparison with chicken (*Gallus gallus*) macrochromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 98:54–60.
- Shetty, S., D. K. Griffin e J. A. M. Graves (1999) Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. *Chromosome Res.* 7:289–295.
- Schwarzacher, T. e P. Heslop-Harrison (2000) *Practical in situ hybridization.* Oxford: BIOS Scientific Publisher Ltd..
- Shibusawa, M., M. Nishibori, C. Nishida-Umehara, M. Tsudzuki, J. Masabanda, D. K. Griffin e Y. Matsuda (2004a) Karyotypic evolution in the Galliformes: an examination of the process of karyotypic evolution by comparison of the molecular cytogenetic findings with the molecular phylogeny. *Cytogenet. Genome Res.* 106:111–119.
- Shibusawa, M., C. Nishida-Umehara, M. Tsudzuki, J. Masabanda, D. K. Griffin e Y. Matsuda (2004b) A comparative karyological study of the blue-breasted quail (*Coturnix chinensis*, Phasianidae) and California quail (*Callipepla californica*, Odontophoridae). *Cytogenet. Genome Res.* 106:82–90.
- Silva, J. M. C. (1998) As Aves, p. 211–219. Em: P. L. B. Lisboa (ed.) *Caxianã: ambiente físico e diversidade biológica.* Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi.