

**RELATÓRIO FINAL**  
**Programa de Bolsa de Produtividade em Pesquisa**

Chamada de Projetos 02/2008	Protocolo 12938 (conv. 137/08)	Período do Relatório 08/08/2008 a 07/08/2009
Nome do bolsista Marcelo Ricardo Vicari		
Endereço completo R. Otávio Ferreira da Silva, 31. Uvaranas, Ponta Grossa-PR. CEP 84031-340		
Email <a href="mailto:vicarimr@pq.cnpq.br">vicarimr@pq.cnpq.br</a> ou <a href="mailto:vicarimr@yahoo.com.br">vicarimr@yahoo.com.br</a>		Telefone [ 42] 3220-3739 ou (42) 99662771
Área de conhecimento Genética Animal		
Título do Projeto de Pesquisa desenvolvido durante a vigência da bolsa  Citogenética molecular em cromossomos relacionados ao sexo em peixes da família Parodontidae		
Instituição co-responsável  Universidade Estadual de Ponta Grossa		
Descrição das atividades gerais desenvolvidas <i>[expandir o espaço o quanto necessário]</i> [Separar o relato pelas atividades / sub-projetos em que esteve envolvido]  <b>DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES</b>  <b>Meta 1 (Coletas)</b> 1. Coletas de peixes da família Parodontidae na região de Ponta Grossa Foram realizadas expedições de coleta bi-mensais para a captura de exemplares de Parodontidae que foram utilizados no estudo. Os mesmos foram também catalogados e depositados no Museu de Zoologia de Maringá e Museu Nacional do Rio de Janeiro, onde foram identificados. 2. Coletas de peixes da família Parodontidae nos estados de Minas Gerais e São Paulo Com auxílio dos pesquisadores da Universidade Federal de São Carlos, foram realizadas expedições de coleta de Parodontidae nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso. As diferentes espécies da família coletadas foram processadas, utilizadas em estudos citogenéticos, catalogadas e depositadas no Museu de Zoologia de Maringá e Museu Nacional do Rio de Janeiro, onde foram identificados.  <b>Meta 2 (preparações citogenéticas)</b>  1. Preparações mitóticas e meióticas Todos os exemplares coletados foram processados e utilizados nos procedimentos de obtenção de cromossomos mitóticos e meióticos. As preparações de qualidade foram utilizadas para os estudos citogenéticos comparativos.  <b>Meta 3 (extração de DNA, RNA e síntese de cDNA)</b>  1. Extração de DNA		

Foram extraídos DNAs de diferentes espécies da família Parodontidae. Estes DNAs estão sendo utilizados na busca de novas famílias de DNAs repetitivos para as análises de marcadores cromossômicos. Além deste enfoque, estes DNAs serão utilizados em experimentos de southern blotting para a confirmação das sequências de DNAs repetitivos obtidos por clonagem do produto da microdissecção do cromossomo W de *Apareiodon* sp.

#### 2. Extração de RNA e síntese de cDNA

Também foram extraídos RNAs a partir das gônadas de *Apareiodon* sp. e utilizados na síntese de cDNA. A PCR primer específico para amplificação de genes relacionados ao desenvolvimento do sexo ainda não foram testados.

Toda a meta está iniciando, testes de padronização ainda estão sendo realizados com auxílio de alunos de graduação, pois não houveram alunos selecionados para este projeto no Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da UEPG.

### **Meta 4 (Localização *in situ* de sequências repetitivas e cromossômicas)**

#### 1. Localização de sondas cromossômicas

A sonda microdissectada do cromossomo W de *Apareiodon* sp. foi utilizada em experimentos de hibridação *in situ* fluorescente em 10 espécies da família Parodontidae. Estas hibridações comprovaram uma conservação destas sequências do cromossomo sexual W em diferentes espécies da família, comprovando a origem comum dos cromossomos sexuais de Parodontidae. Esses resultados são sumarizados na parte científica do relatório.

#### 2. Localização de sondas repetitivas

Hibridações *in situ* fluorescentes foram utilizadas com a sonda do DNA satélite pPh2004 foram mapeadas sobre os cromossomos das diferentes espécies da família Parodontidae. Estes resultados demonstraram conservação desta sequência entre as espécies do gênero *Parodon*, além de estar presente em *Apareiodon affinis*.

Esses resultados são sumarizados na parte científica do relatório.

### **Meta 5 (Divulgação dos resultados)**

#### 1. Publicação de resumos de congresso (previsão 2)

Neste período foram publicados 8 resumos durante o XII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes. Todos foram listados abaixo no item resultados.

#### 2. Publicação de artigos em periódicos indexados (previsão 2)

Estritamente relacionados ao projeto foram obtidos até o momento: 1 artigo aceito para publicação, 1 artigo submetido e 2 artigos em fase final de preparação. Em subprojetos do tema principal foram 4 artigos publicados e 1 aceito para publicação. Em todos artigos foram realizados agradecimentos ao apoio da Fundação Araucária.

#### 3. Relatórios

Foram elaborados os relatórios parcial e final.

Ainda, os resultados obtidos a partir do projeto foram divulgados em duas palestras: XII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes e I Reunião Brasileira de Citogenética.

### **Subprojetos dentro da proposta**

Citogenética molecular em cromossomos relacionados ao sexo em peixes da família Parodontidae. CNPq Edital Universal 2007 (R\$ 20.000,00). Coordenador

Rede de cooperação em genética de peixes para a Diversidade, Conservação e Biologia Evolutiva. Procad/CAPES 2008 (R\$ 153.000,00). Participante

**Resultados alcançados**

[Descrever os principais resultados obtidos no período (de natureza acadêmica, científica, técnica, cultural, artística, social, econômica, ambiental, outra)]

**NATUREZA ACADÊMICA****Co-orientação de Mestrado**

Michelle Orane Schemberger. Citogenética molecular em espécies da família Parodontidae (Pisces; Characiformes) Início: 2007. Dissertação (Mestrado em Pós Graduação em Biologia Evolutiva) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Fundação Araucária de Apoio Científico e Tecnológico do Paraná. (Co-orientador). Data prevista da defesa 28/09/2009.

**Palestras ministradas**

Vicari, M.R. Perspectivas da citogenética com a crescente aplicação das técnicas moleculares. XII Simpósio de Citogenética de Peixes. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

Vicari, M.R. Organização da cromatina nos cromossomos de peixes. I Reunião Brasileira de Citogenética. Águas de Lindóia, 2009.

**Orientação de iniciação científica**

Bárbara Gardim de Melo. Análise citogenética molecular (FISH e fluorocromos) em algumas espécies de Alticinae (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae) com ênfase na distribuição e composição das regiões heterocromáticas e das organizadoras de nucléolo. Início: 2008. Iniciação científica (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

**NATUREZA CIENTÍFICA****Resumo do projeto:**

Dentre os peixes Neotropicais, a família Parodontidae apresenta uma ampla distribuição na América do Sul, com aproximadamente vinte e cinco espécies descritas. É constituída por três gêneros, *Parodon*, *Apareiodon* e *Saccodon*, com problemas sistemáticos decorrentes da falta de caracteres diagnósticos fortes para um correto agrupamento filogenético de seus representantes. O número cromossômico diplóide predominante nesse grupo é  $2n=54$ , com espécies sem sistemas de cromossomos sexuais heteromórficos ao lado de outras com sistemas de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW e ZZ/ZW<sub>1</sub>W<sub>2</sub>. Duas espécies do gênero *Parodon* e duas do gênero *Apareiodon* apresentam cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW, e um mecanismo provavelmente idêntico de diferenciação do cromossomo W a partir da amplificação de regiões heterocromáticas. Possivelmente estas espécies formam um *clado* derivado em relação aos representantes homomórficos sem a diferenciação de cromossomos sexuais. Nesse sentido, (1) a microdissecção do cromossomo W e a obtenção de sondas específicas para esse cromossomo, (2) a prospecção de seqüências de DNA satélite por restrição genômica e (3) a localização das seqüências obtidas nos cromossomos por hibridação fluorescente "in situ", serão importantes para o entendimento do processo de diferenciação dos cromossomos sexuais nos Parodontidae, assim como para o esclarecimento das possíveis relações de parentesco entre seus representantes. Neste sentido, esse projeto inicia uma busca por novas estratégias mais

resolutivas no entendimento do (s) possível (eis) mecanismo (s) de determinação do sexo em algumas famílias ou gêneros de peixes neotropicais.

### Resultados alcançados:

O objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência marcadores cromossômicos, principalmente relacionados as seqüências de DNA repetitivo em espécies da família Parodontidae. Em uma análise inicial, o DNA satélite pPh2004 foi mapeado por hibridação *in situ* fluorescente sobre os cromossomos de algumas espécies de Parodontidae, analisado em conjunto com outros marcadores cromossômicos com intuito de verificar a diversificação dos genomas na família e, propor baseado em marcadores cromossômicos, grupos de espécies mais estritamente relacionadas. Na família Parodontidae, pouco se conhece até o momento no que diz respeito às relações de parentesco entre as espécies e gêneros, sendo que estas relações nunca foram discutidas em conjunto, havendo apenas sugestões de possíveis relacionamentos entre algumas delas. A estrutura dentária era considerada um dos importantes caracteres morfológicos que auxiliavam na identificação dos três gêneros. O gênero *Parodon* foi o primeiro gênero descrito, apresentando pequenos dentes laterais na mandíbula, enquanto *Apareiodon* e *Saccodon* não possuem tais dentes. Entretanto, uma revisão filogenética da família Parodontidae através do estudo de caracteres osteológicos e de morfologia externa de todas as 28 espécies válidas foi realizada, concluindo que a característica tradicionalmente utilizada para diagnosticar os gêneros - presença/ausência de dentes mandibulares não pode mais ser considerada, levando o gênero *Apareiodon* a se tornar sinonímia de *Parodon*.

Citogeneticamente, os gêneros *Parodon* e *Apareiodon* possuem características macrocariotípicas muito semelhantes: O número diplóide é de 54 cromossomos compostos basicamente por cromossomos meta-submetacêntricos e, presença de heterocromatina centromérica em praticamente todos os cromossomos do complemento e algumas heterocromatinas terminais. No entanto, algumas características cromossômicas não são compartilhadas por todos representantes da família. Entre estas estão a localização dos sítios ribossomais, a ocorrência de heteromorfismos de cromossomos sexuais e a presença do DNA satélite pPh2004. Estes marcadores cromossômicos compartilhados por apenas algumas das espécies poderiam auxiliar nas relações filogenéticas entre os Parodontidae.

Com este estudo, foi possível inferir que as espécies que possuem o DNA satélite pPh2004 (*P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus*, *P. pongoensis* e *A. affinis*) têm divergido mais recentemente e são mais estritamente relacionadas entre os Parodontidae. Ainda, os marcadores cromossômicos podem ser utilizados em estudos para o agrupamento das espécies de Parodontidae. As localizações dos sítios de rDNA mostram ser mais conservados em *Apareiodon* em relação a *Parodon*. No entanto, com o marcador cromossômico de DNA satélite pPh2004 é possível inferir que as espécies *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus*, *P. pongoensis* e *A. affinis* formam um clado diferenciado em Parodontidae em relação as demais espécies do gênero *Apareiodon* estudadas.

Em outra análise realizada, o cromossomo W de *Apareiodon* sp. (Ponta Grossa, PR) foi isolado por microdissecção, após ter sido identificado pelo bandamento C, com posterior amplificação por DOP-PCR. As seqüências obtidas foram marcadas por PCR com digoxigenina 11dUTP e utilizadas em procedimentos de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) nos cromossomos de 10 diferentes taxa da família Parodontidae: *Apareiodon* sp., *A. ibitiensis*, *A. vladii*, *A. piracicabae*, *A. vittatus*, *A. affinis*, *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus* e *P. pongoensis*. Esta sonda do cromossomo W de *Apareiodon* sp. foi denominada WAp. Os resultados encontrados para as 10 espécies da família Parodontidae mostraram um número diplóide conservado de  $2n=54$  cromossomos, no entanto, foram observadas fórmulas cromossômicas diferenciadas, principalmente em relação ao número de pares cromossômicos subtelocêntricos. A análise

convencional dos cariótipos permitiu evidenciar a ocorrência de heteromorfismo de cromossomos sexuais com heterogametia feminina do tipo ZZ/ZW nas espécies *Apareiodon* sp., *A. ibitiensis*, *A. vladii*, *P. hilarii* e *P. moreirai*. Ainda, um sistema de cromossomos sexuais múltiplo do tipo ZZ/ZW<sub>1</sub>W<sub>2</sub> foi visualizado na espécie *A. affinis*, onde os machos apresentam 2n=54 e as fêmeas 2n=55 cromossomos. Não foram evidenciados heteromorfismos de cromossomos sexuais nas espécies *A. piracicabae*, *A. vittatus*, *P. nasus* e *P. pongoensis*.

A reação de DOP-PCR a partir dos cromossomos W de *Apareiodon* sp. submetidos ao bandamento C evidenciou um arrasto em gel de agarose entre 100 a 500 pb, com uma intensidade maior na região de 250 pb. A utilização desta sonda WAp sobre os cromossomos localizou sítios positivos em regiões terminais dos cromossomos de todas espécies estudadas. Na espécie *A. piracicabae*, além dos vários sítios terminais nos cromossomos a sonda WAp foi localizada interespaçada aos sítios de RONS (par cromossômico 27). Em *A. vittatus* somente sítios WAp terminais aos cromossomos foram mapeados. *A. affinis* evidenciou um sítio intersticial no braço longo e sítios terminais em ambos os braços do cromossomo Z, marcações nos cromossomos W<sub>1</sub> e W<sub>2</sub>, além dos vários sítios terminais em autossomos. Além dos sítios terminais, machos das espécies *Apareiodon* sp., *A. ibitiensis*, *A. vladii*, *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus* e *P. pongoensis* submetidos a FISH com sonda WAp evidenciaram um sítio terminal e um proximal ao braço curto de um par de cromossomos metacêntricos, correspondente ao par 13. Por sua vez, nas fêmeas de *Apareiodon* sp., *A. ibitiensis*, *A. vladii*, *P. hilarii* e *P. moreirai*, este par cromossômico foi heteromórfico, evidenciando um sítio terminal e um proximal ao braço curto do cromossomo Z e, sítios WAp também no braço longo de cromossomo W. As fêmeas de *P. nasus* e *P. pongoensis* não apresentaram heteromorfismo do par cromossômico metacêntrico portador de sítios WAp em região proximal. A FISH com sonda WAp evidenciou também que a espécie *P. hilarii* possui o cromossomo W com maior acúmulo de seqüências deste DNA repetitivo, seguido pelas espécies *P. moreirai*, *Apareiodon* sp., *A. vladii* e *A. ibitiensis*.

A análise da composição e alinhamento da família de DNA satélite pPh2004 identificou uma seqüência monomérica de 200pb, 60% rico em bases AT com identidade molecular e alinhamento parcial de 87% com cromossomo X de *Homo sapiens*, 92% com BAC de grupos de ligação do Zebrafish e 100% com um clone de cromossomo X de *Mus musculus*, entre outros. O mapeamento dos sítios pPh2004 sobre os cromossomos evidenciou que este DNA satélite é compartilhado pelas espécies *A. affinis*, *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus* e *P. pongoensis*. Na espécie *A. affinis* foram localizados sítios pPh2004 em um par metacêntrico com marcações terminais em ambos os braços (par 2), além de outro par metacêntrico com marcação terminal no braço longo (par 13). A espécie *P. hilarii* mostrou marcações na região terminal do braço curto do cromossomo W, na região terminal do braço longo do cromossomo Z, além de 14 a 16 marcações terminais em autossomos. Em *P. moreirai*, os sítios pPh2004 foram localizados na região terminal do braço curto do cromossomo W, na região terminal do braço longo do cromossomo Z, além da ocorrência adicional de um par autossômico submetacêntrico portando estes sítios na região terminal do braço longo (par 9). Na espécie *P. nasus* foram observadas marcações em quatro pares de cromossomos, todos com marcações terminais no braço longo. Por sua vez, *P. pongoensis* mostrou apenas um par metacêntrico com marcações pPh2004 em região terminal do braço longo (par 13). A dupla FISH com sondas pPh2004 e WAp sobre os cromossomos de *P. nasus* e *P. pongoensis* mostrou que o par metacêntrico (par 13) portador dos sítios WAp em posição terminal e proximal do braço curto, também possui sítios pPh2004 em região terminal do braço longo.

A família Parodontidae apresenta espécies homomórficas em relação ao sexo enquanto outras com sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW heteromórficos, além de um sistema ZZ/ZW<sub>1</sub>W<sub>2</sub> encontrado em *A. affinis*. Os resultados demonstraram que o sistema de cromossomos sexuais simples ZZ/ZW podem ter se originado por uma inversão de um sítio terminal da sonda WAp para a região proximal do braço curto de um par cromossômico metacêntrico e, posterior amplificação desta seqüência levando a diferenciação do cromossomo sexual W em algumas espécies. Ainda, o mapeamento em conjunto dos DNAs repetitivos WAp e

satélite pPh2004 permitiram sugerir que o sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW<sub>1</sub>W<sub>2</sub> de *A. affinis* pode ter apresentado origem a partir do sistema ZW encontrado em um cariótipo ancestral similar ao verificado em *P. hilarii*. Esses resultados podem ser úteis no entendimento da diversificação dos genomas de espécies de Parodontidae e contribuir com o agrupamento filogenético de seus representantes. Estas análises demonstram que os DNAs repetitivos WAp e pPh2004 propiciam uma intensa diversificação cariotípica em Parodontidae.

Na continuidade destes estudos, a fase II deste projeto prevê a clonagem das sequências dos DNAs repetitivos presentes no cromossomo W, posterior seqüenciamento e sua localização física. Alguns ensaios iniciais demonstraram que algumas destas sequências têm identidade parcial com sequências de DNAs repetitivos nos mais diferentes grupos, incluindo do cromossomo X e alfa satélite de *Pan troglodytes*, sequências em BACs da espécie de peixe *Danio rerio*, entre outras. Dessa forma, além de contribuir com a questão científica, esperamos continuar o processo de formação de alunos de graduação, mestrado e doutorado nos programas de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da UEPG e Genética da UFPR.

**Natureza técnica, cultural, artística, social, econômica, ambiental, outra**

Não se aplica.

Resultados decorrentes do Projeto de Pesquisa desenvolvido durante a vigência da bolsa [Citar as publicações ou qualquer outra divulgação do projeto realizado]  
[Informar o índice de impacto dos periódicos das publicações citadas, quando for o caso]

**TRABALHOS PUBLICADOS ESTRITAMENTE RELACIONADOS AO PROJETO****Trabalhos aceitos para publicação**

Bellafronte, E.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. Differentiated ZZ/ZW sex chromosomes in *Apareiodon ibitiensis* (Teleostei, Parodontidae): considerations on cytotaxonomy and biogeography. *Journal of Fish Biology* (Aceito para publicação). Fator de impacto: 1.246

**Trabalhos submetidos para publicação**

Vicari, M.R.; Nogaroto, V.; Noletto, R.B.; Cestari, M.M.; Cioffi, M.B.; Almeida, M.C.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Artoni, R.F. Satellite DNA in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. *Journal of Fish Biology* (em análise). Fator de impacto: 1.246

**Trabalhos em fase final de preparação**

Bellafronte, E.; Artoni, R.F.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R.. Chromosome markers and possible phylogenetic relations among Parodontidae (Characiformes).

Schemberger, M.O.; Almeida, M.C.; Bellafronte, E.; Artoni, R.F.; Margarido, V.P.; Bertollo, L.A.C.;

Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. Marcadores cromossômicos de DNAs repetitivos com enfoque na origem e diferenciação dos sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplo de Parodontidae.

## TRABALHOS PUBLICADOS COMO SUBPROPOSTAS DO PROJETO PRINCIPAL

### Publicados

Artoni, R.F.; Vicari, M.R.; Almeida, M.C.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. Karyotype diversity and fish conservation of southern field from South Brazil. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 19: 393-401, 2009. Fator de impacto 1.792

Noleto, R.B.; Guimaraes, F.S.F.; Paludo K.S.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Cestari, M.M. New contributions to the knowledge of genome size evolution in Tetraodontiform. *Marine Biotechnology*, 2009. doi: 10.1007/s10126-009-9215-0 Fator de impacto 2.544

Kantek, D.L.Z.; Vicari, M.R.; Peres, W.A.M.; Cestari, M.M.; Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, *Incertae sedis*). *Journal of Fish Biology*, 75: 408-421, 2009. doi:10.1111/j.1095-8649.2009.02333.x Fator de impacto: 1.246

Noleto, R.B.; Vicari, M.R.; Amorin, A.P.; Artoni, R.F.; Cestari, M.M. An unusual ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fishes (Crenuchidae, Characiformes) with the presence of rDNA sites. *Journal of Fish Biology*, 75: 448-453, 2009. doi:10.1111/j.1095-8649.2009.02342.x Fator de impacto: 1.246

### Aceitos

Ferreira Neto M.; Vicari, M.R.; Camargo, E.F.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. Comparative cytogenetics between populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Insertae sedis*). *Genetics and Molecular Biology* (Aceito para publicação). Fator de impacto 0.496

## RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO

Schemberger, M.O.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Silva, E.B.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. Conservação de seqüências repetitivas do cromossomo W de *Apareiodon* sp. entre espécies da família Parodontidae. In: XII Simpósio de Citogenética de Peixes, 2008, Uberlândia. XII Simpósio de Citogenética de Peixes. Uberlândia : Universidade Federal de Uberlândia, 2008. v. 1. p. 185-185.

Machado, T.C.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. Cromossomos sexuais ZZ/ZW em *Characidium gomesi* (Characiformes, Crenuchidae). Provável conservação entre distintas populações da espécie. In: XII Simpósio de Citogenética de Peixes, 2008, Uberlândia. XII Simpósio de Citogenética de Peixes, 2008. v. 1. p. 92-93.

Vicari, M.R.; Machado, T.C.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Noletto, R.B.; Cestari, M.M.; Centofante, L.; Alves, J.C.P.; Foresti, F.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. Diversificação do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW no gênero *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). Inferências por pintura cromossômica e localização de sítios de rDNA 18S. In: XII Simpósio de Citogenética de Peixes, 2008, Uberlândia. XII Simpósio de Citogenética de Peixes, 2008. v. 1. p. 12-13.

Almeida, M.C.; Primo, C.C.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R. Diversidade cariotípica em populações de *Trichomycterus* (Teleostei: Siluriformes) da região dos Campos Gerias. In: XII Simpósio de Citogenética de Peixes, 2008, Uberlândia. XII Simpósio de Citogenética de Peixes, 2008. v. 1. p. 120-121.

Noletto, R.B.; Guimaraes, F.S.F.; Paludo, K.S.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Cestari, M.M. Contribuições ao conhecimento da evolução genômica em Tetraodontiformes. In: XII Simpósio de Citogenética de Peixes, 2008, Uberlândia. XII Simpósio de Citogenética de Peixes, 2008. v. 1. p. 79-80.

Ferreira Neto, M.; Camargo, E.F.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R.; Moreira-Filho, O. Citogenética comparativa de *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). In: XII Simpósio de Citogenética de Peixes, 2008, Uberlândia. XII Simpósio de Citogenética de Peixes, 2008. v. 1. p. 06-07.

Matoso, D.A.; Silva, M.; Moraes Neto, A.; Vicari, M.R.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F. Citogenética clássica e molecular da espécie *Steindachneridion melanodermatum* (Siluriformes, Pimelodidae), um grande bagre endêmico do rio Iguaçu. In: XII Simpósio de Citogenética de Peixes, 2008, Uberlândia. XII Simpósio de Citogenética de Peixes, 2008. v. 1. p. 105-106.

Moraes Neto, A.; Silva, M.; Matoso, D.A.; Cestari, M.M.; Almeida, M.C.; Vicari, M.R.; Colares-Pereira, M.J.; Artoni, R.F. Caracterização citogenética de *Steindachneridion melanodermatum*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Pimelodus ortomanni* e *Sorubim lima*. In: XII Simpósio de Citogenética de Peixes, 2008, Uberlândia. XII Simpósio de Citogenética de Peixes, 2008. v. 1. p. 114-115.

#### Adequações/Alterações ocorridas e dificuldades encontradas

[Citar possíveis adequações ou alterações ocorridas no plano de trabalho apresentado inicialmente, com as respectivas justificativas]

[Descrever as dificuldades encontradas no desempenho das atividades]

#### DE ORDEM CIENTÍFICA

Foram objetivos do projeto:

- a) proceder a microdissecção do cromossomo W de um ou mais representantes da família Parodontidae apresentando o sistema ZZ/ZW diferenciado;
- b) amplificar, por DOP-PCR, o cromossomo W microdissectado e gerar sondas de DNA para a sua localização *in situ* em diferentes representantes da família Parodontidae;
- c) realizar uma análise comparativa da diferenciação do cromossomo W entre diferentes espécies de Parodontidae portadoras do sistema ZZ/ZW;
- d) verificar a possível homeologia, considerando a hibridação cromossômica, entre o cromossomo W diferenciado e os cromossomos de espécies de Parodontidae que não são portadoras de sistema de cromossomos sexuais heteromórficos;

e) verificar se o sistema ZZ/ZW<sub>1</sub>W<sub>2</sub> de *A. affinis* seria derivado de um sistema ZW não diferenciado;

f) buscar por meio da digestão do DNA genômico, ou do cromossomo W microdissectado, seqüências de DNA satélite sexo específicas;

g) identificar marcadores cromossômicos que sejam informativos para análises comparativas entre as espécies em estudo;

Os objetivos de ordem científica propostos foram executados e finalizados, a exceção do item (f), o qual ainda está em fase de execução. Especificamente este item prevê a obtenção de DNAs repetitivos a partir de clonagem de partes do cromossomo W microdissectado. Já obtivemos alguns clones, alguns já seqüenciados, outros aguardando seqüenciamento para posterior localização física destas seqüências nos cromossomos.

Ainda, o procedimento de obtenção de cromossomos meióticos está sendo melhor padronizado. Esta análise deve ser realizada em fêmeas, as quais possuem os cromossomos sexuais diferenciados. Devido ao excesso de vitelo estamos com dificuldades de resultados resolutivos para a análise em questão. Também os procedimentos de obtenção de seqüências de genes relacionados ao desenvolvimento do sexo estão em fase de execução.

Estas atividades estão em andamento e, possivelmente, serão resolvidas na continuidade da pesquisa.

#### DE NATUREZA ACADÊMICA

O plano inicial fez previsão da orientação de um mestrado com os itens científicos acima relacionados pendentes. No entanto, o acadêmico ao qual o projeto científico foi relacionado não obteve êxito na seleção do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da UEPG.

Assinatura do Bolsista

Assinatura do Co-responsável institucional

Local, Data

Local, Data