

PROJETO DE PESQUISA

TÍTULO	Citogenética e genômica comparativa da avifauna brasileira
--------	--

PESQUISADOR COORDENADOR	Tiago Marafiga Degrandi
-------------------------	-------------------------

DEPARTAMENTO	Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética
--------------	---

E-mail	tdegrandi@hotmail.com
--------	-----------------------

ÁREA DE ATUAÇÃO	Genética
-----------------	----------

I. DESCRIÇÃO DO PROJETO

I. JUSTIFICATIVA DO PROJETO	
-----------------------------	--

As aves exibem uma extraordinária diversidade de espécies e uma gama de características ecológicas, morfológicas, comportamentais e genéticas, que durante anos têm inspirado pesquisadores de diferentes áreas (STILLER e ZHANG, 2019). No entanto, foi somente nesta última década que tivemos um grande avanço no conhecimento sobre o genoma e a evolução do grupo (JARVIS et al., 2014; ZHANG et al., 2014). Características únicas, como uma baixa fração de DNA repetitivos, correspondendo a menos de 10% do genoma, e uma impressionante conservação no tamanho do total, mesmo entre espécies distantemente aparentadas, intrigam ainda mais os estudos genômicos em aves (JARVIS et al., 2014).

Interessantemente, esta “conservação do genoma” também se estende as características citogenéticas, os cromossomos, nas quais é visto que a 50,7 % das espécies de aves cariotipadas preservam o formato bimodal do cariótipo, composto por macrocromossomos e microcromossomos, com número diploide ($2n$) entre 78 e 82 cromossomos (DEGRANDI et al., 2020a). Apesar disso, uma ampla variação do número diploide é observada quando considerarmos todo conhecimento citogenético das aves, incluindo tanto espécies com número reduzido de cromossomos ($2n=40$), quanto espécies com número mais elevado, com até 142 cromossomos (DEGRANDI et al., 2020a). Para algumas ordens, como os Tinamiformes, é observado que o número cromossômico é pouco variável entre as espécies, embora alterações na morfologia sejam frequentes (GARNERO et al., 2006). Enquanto que para os Accipitriformes, Bucerotiformes, Charadriiformes, Coraciiformes, Falconiformes, Piciformes e Psittaciformes é visto que existe uma grande variação interespecífica, ocorrendo tanto para redução quanto para o aumento do $2n$ (DE OLIVEIRA et al., 2010; DEGRANDI et al., 2018; DEGRANDI et al., 2020a).

Para entender a origem das variações numéricas e morfológicas dos cromossomos, estudos que envolvem a pintura cromossômica comparativa, utilizando as sondas cromossômicas do *Gallus gallus* vem sendo conduzidos em grupos alvos (GRIFFIN et al., 1999). Em geral, os resultados destes estudos têm demonstrado, que os macrocromossomos podem sofrer múltiplas fissões resultando no aumento do $2n$ e/ou fusões de macrocromossomos e microcromossomos, reduzindo o $2n$ (DE OLIVEIRA et al., 2005; 2010; NISHIDA-UMEHARA et al., 2007; KRETSCHMER et al., 2014; DOS SANTOS et al., 2015; DEGRANDI et al., 2017). Além disso, análises do cluster ribossomal 45S rDNA, evidenciaram que este cluster é um hotspots para rearranjos cromossômicos como translocação, fusões, duplicações e inversões, levando a mudanças rápidas na distribuição e na localização cromossômica mesmo em espécies estreitamente relacionadas (DATSON e MURRAY, 2006; DEGRANDI et al., 2014; DEGRANDI et al., 2020b). Esta susceptibilidade a rearranjos pode ser atribuída à natureza repetitiva do cluster ou mesmo de sua intensa atividade de expressão gênica (Huang e colaboradores, 2008).

Uma outra classe interessante de DNAs repetitivos são os DNA satélites (satDNA), os quais cobrem uma grande variedade de sequências distribuídas dentro do genoma. Os satDNA podem ser localizados em

regiões centroméricas, pericentroméricas, subteloméricas em regiões intersticiais e também em regiões eucromáticas (RUIZ-RUANO et al., 2016). Eles podem ser cromossomos específicos, como no caso de cromossomos sexuais (PALOMEQUE; LORITE, 2008). Os satDNA, assim como a maioria dos DNA repetitivos, possuem diversas funções como: organização cromossômica, emparelhamento cromossômico, podem ser sexo específico, atuar em alguns processos como na modulação da cromatina e estabelecimento de centrômeros (PALOMEQUE; LORITE, 2008, GARRIDO, 2017). Com isso, os DNA sat são considerados importantes para caracterização de genomas e estudos de diversidade de espécies.

No passado o projeto de sequenciamento do genoma humano promoveu grandes avanços científicos e tecnológicos que hoje são celebrados através de vários projetos de sequenciamento de genomas que estão em desenvolvimento. Neste sentido, um projeto bastante audacioso que vem sendo desenvolvido é o B10K, que tem o objetivo sequenciar o genoma completo de mais de 10 mil espécies de aves (STILLER e ZHANG, 2019). Para o seu desenvolvimento, um gigantesco consórcio internacional foi estabelecido e o Brasil tem fundamental importância nessa participação, visto que inclui uma grande diversidade de espécies com distribuição em seu território (aproximadamente 1.919 espécies) (PIACENTINI et al., 2015). Em vista disso, estamos num momento chave para avançar no conhecimento sobre a biodiversidade de aves no Brasil, unindo duas ferramentas importantes como a citogenética e a genômica. Neste sentido, este projeto visa além de contribuir com espécies de interesse para desenvolvimento do BK10, também buscamos entender a contribuição dos rearranjos cromossômicos e DNAs repetitivos para a diversificação das aves. As análises citogenéticas e a associação com o estudo dos genomas, podem assim contribuir para melhorar nossa compreensão sobre a evolução, biodiversidade, padrões de distribuição de espécies, e no planejamento estratégico para a conservação das espécies ameaçadas, uma vez que as aves são fundamentais para a manutenção de ecossistemas e a saúde de diversas atividades humanas.

II. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Promover o conhecimento citogenético e genômico acerca da biodiversidade de aves no Brasil, visando o entendimento da história de evolutiva deste grupo de vertebrados, e a conservação.

Objetivos específicos

- Projetar, executar e implantar um banco de amostras de DNA de aves, para estudos de longo prazo e contribuir ativamente junto ao projeto de sequenciamento do genoma das aves (B10K);
- Analisar citogeneticamente espécies de interesse, identificando o papel dos rearranjos cromossômicos e da distribuição de DNAs repetitivos e famílias multigênicas na estruturação do cariótipo e evolução das aves;
- Contribuir para o conhecimento da biodiversidade e aspectos evolutivos das aves;
- Integrar-se a novas ferramentas de pesquisas, e promover o desenvolvimento técnico e científico nacional por meio do treinamento de estudantes de graduação e pós-graduação.

III. METODOLOGIA	
------------------	--

Atividade 1: Criar um banco de amostras de DNA de aves, para estudos de longo prazo;

Uma das primeiras atividades deste projeto será criar um banco de DNA de aves brasileiras, visando impulsionar o conhecimento sobre a biodiversidade de aves no Brasil, e também ofertar apoio técnico científico para pesquisadores de outras instituições de pesquisa internacionais e nacionais que trabalham com aves, mas que carecem de análises genéticas. Para a criação deste banco de DNA, será inicialmente elaborado um protocolo de procedimentos que incluirá boas práticas para coleta e fixação de material biológico, seguindo para identificação correta da espécie por meio do uso de genes mitocondriais (DNA barcoding), do devido depósito do espécime em museus e cadastramento da amostra no banco de DNA. Para compor este banco de DNA, as amostras de espécies serão obtidas de diferentes ações. A principal delas será advinda de atividades de coleta, na qual serão realizadas missões no Parque Estadual de Vila Velha, localizado em Ponta Grossa/Paraná, e no Parque Estadual do Palmito, localizado em Paranaguá.

Para a captura de aves, serão utilizadas redes de neblina, uma técnica amplamente utilizada por ornitólogos e biólogos para estudos de aves. Cada rede de neblina (Mist Net) possui 3 metros de altura por 8 a 10 metros de comprimento e é esticada em bastões de alumínio, presos com cordas em pontos fixos. As redes possuem várias bolsas ou "sacos" que ajudam a capturar as aves quando elas voam para dentro da rede. As redes são revisadas com frequência (a cada 10-20 minutos) para minimizar o tempo que as aves passam presas. Todos os pesquisadores são treinados para o manuseio das aves, a fim de minimizar o estresse e o risco de lesões ao animal. Primeiramente, é identificado o lado da rede em que a ave foi presa; ela é imobilizada manualmente, os pés são liberados dos fios, seguidos das asas e da cabeça. Após o espécime será contido em um saco de tecido, seu bico é amarrado brevemente para evitar lesões e fuga. Ao retirar a ave do saco, em um laboratório montado perto da área da coleta, o espécime será identificado utilizando um guia de campo e se anota qualquer outra informação importante como sexo e idade (quando for possível). Logo após o processo de captura do espécime, os animais são eutanasiados e são retiradas as amostras biológicas. Todos os pesquisadores utilizam equipamentos de proteção individual, como máscaras e luvas, e álcool 70%, evitando contaminações e transmissão de doenças. Todos os procedimentos de captura e coleta de amostras serão realizados em conformidade as licenças do SISBIO (Número: 94084-1), e autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Processo SEI UEPG : 24.000037927-3).

É importante salientar que neste projeto não é possível definir quais espécies de aves serão coletadas, uma vez que o conjunto de espécies depende das capturas que serão realizadas nas missões a campo. No entanto, é considerado que as espécies ameaçadas de extinção que venham a ser apanhadas na rede de neblina, não serão consideradas no estudo e serão soltas ainda no local. Para as espécies consideradas no estudo, será realizado a coleta de biópsias de pele, pulmão e rim serão coletadas após realizada o procedimento de eutanásia. O procedimento de eutanásia será realizado conforme estabelecido no CONCEA, utilizando o método químico com super dosagem de Cetamina/Xilazina (Cetamina 200 a 500 mg/kg e Xilazina 10 a 50 mg/kg). Após confirmado a perda do reflexo corneal. A compressão torácica poderá ser utilizada em aves de pequeno porte (menos de 50 g de massa). Todos os procedimentos serão realizados com a supervisão do veterinário Dr. Denilton Vidolin CRMV/PR – 17349. Os espécimes eutanasiados serão armazenados em caixa térmica refrigerada para transporte do local de coleta até o laboratório de Zoologia da UEPG onde serão depositados em freezer onde ficarão armazenados até o momento de realizar a taxidermia.

O número de espécies estimados que podem ser capturadas é de 100, e para cada espécie, 2

machos e 2 fêmeas serão utilizados no estudo, totalizando: 400 aves (200 machos e 200 fêmeas) conforme estabelecido na autorização CEUA/UEPG 24.000037927-3. Adicionalmente espécies de aves que possuem tecidos coletados e depositadas em museus, como o Museu de História Natural Capão da Imbuia/Curitiba-Paraná, poderão ser utilizadas para alimentar o banco de DNA, desde que as informações de coletas estejam de acordo com os padrões científicos. Para a extração do DNA genômico serão utilizados diferentes métodos, sendo um deles o método salino conforme protocolo de Aljanabi e Martinez, (1997). O DNA genômico extraído será armazenado em freezer -80°C.

Atividade 2: Contribuir ativamente junto ao projeto de sequenciamento do genoma das aves (B10K);

Outra importante função do banco de DNA, será a cooperação internacional para o sequenciamento do genoma das aves, estabelecida com o professor Guojie Zhang da University of Copenhagen. Esta colaboração prevê o envio de amostras de espécies de aves brasileiras para o sequenciamento do genoma. Sendo assim, a equipe brasileira irá atuar diretamente no suporte ao projeto B10K realizando a coleta de espécies, extração do DNA genômico, armazenamento e envio das amostras para o sequenciamento. Esta parceria faz se importante para o coordenador do projeto, especialmente pela oportunidade de adentrar em novas ferramentas de pesquisa como análises e montagem de genomas, além de participar de publicações com a equipe internacional. Faz-se importante salientar que do custeio para o sequenciamento, que atualmente custa em torno de 3 mil dólares por amostra, será de responsabilidade da equipe do projeto B10K.

Atividade 3: Isolamento e análise do Satelitoma (sat DNA) em grupos alvo;

Nesta etapa, o projeto busca analisar comparativamente espécies de grupos alvos como Accipitriformes, Bucerotiformes, Charadriiformes, Coraciiformes, Falconiformes, Piciformes e Psittaciformes que apresentam uma ampla variação do cariótipo. O DNA genômico de cada espécie coletada será extraído utilizando tampão salino de acordo com Aljanabi e Martinez, (1997). O sequenciamento de nova geração (Next Generation Sequencing - NGS) será realizado com a utilização da plataforma Illumina HiSeq2500 (paired-end 2x125pb). Todas as bibliotecas obtidas serão sequenciadas em equipamento HiSeq2500. A cobertura de pelo menos 5 vezes para cada biblioteca sequenciada será observada conforme recomendado por Ruiz-Ruano et al. (2016) para acessar as sequências repetitivas do genoma de interesse. Para as análises serão empregadas as metodologias de sequenciamento de novo e identificação por homologia com o software RepeatExplorer (NOVÁK et al., 2013). As sequências repetitivas serão anotadas contra o banco de dados RepBase com o software RepetMasker e por BLAST contra outros bancos de dados. A busca de satDNA será otimizada com as ferramentas satMiner (RUIZ-RUANO et al., 2016). A anotação do satelitoma de cada espécie será utilizada para comparações e a filogenia das aves proposta em Jarvis et al., (2014) será utilizada como referência. Espécies com genoma já sequenciado também poderão compor esta etapa do projeto.

Atividade 4: Analisar citogeneticamente espécies de interesse, identificando o papel dos rearranjos cromossômicos e da distribuição de DNAs repetitivos na evolução e estruturação do cariótipo das aves;

Durante as missões de campo previstas na atividade 1, também serão tomadas amostras de tecido para realizar o cultivo de fibroblastos conforme Sasaki et al., (1968). Para cada espécime, será coletado uma biópsia de tecido, que será armazenada para transporte em meio de cultivo DMEM contendo antibióticos. Os procedimentos de coleta e eutanásia estão descritos na atividade 1 deste projeto. No laboratório, esta biópsia será cortada em pequenos pedaços e transferida para um novo tubo contendo 3 ml de Colagenase tipo IV 1%, que será incubado por um tempo variável de 1 a 3

horas a 37°C. A suspensão celular obtida, será adicionada em garrafa de cultivo contendo 5 ml de meio de cultura suplementado com 20% de soro fetal bovino e antibióticos. Após as células serão incubadas a 37°C em frascos de cultivo até obter-se um nível satisfatório de células em divisão.

Para a obtenção de cromossomos mitóticos as células serão tratadas com Colchicina 0,05% por 1 hora, e os procedimentos de fixação das células serão realizados com solução hipotônica (KCl 0,75M) e metanol/ácido acético (3:1). O número diploide de cada espécie, será determinado por meio da análise de aproximadamente 40 metáfases em microscópio óptico, observando a morfologia e número de cromossomos. O cariótipo será montado ordenando os cromossomos em ordem decrescente de tamanho. O comprimento do braço curto, do braço longo e comprimento total de cada par de macrocromossomos serão estimados no software Image J. Estes valores serão utilizados para calcular o valor do índice centromérico (razão entre o braço curto e o comprimento total do cromossomo) e determinar a morfologia dos cromossomos conforme método proposto por Guerra, (1986).

As análises comparativas entre espécies serão realizadas através da Hibridização in situ fluorescente (FISH) utilizando sondas dos macrocromossomos da espécie *Gallus gallus* (GGA1 ao 10) de acordo com GRIFFIN et al., 1999. Além destas, será realizado o mapeamento de DNAs repetitivos, do rDNA 18S e 5S e Histonas H1, H2, H3 e H4. A marcação destas sondas será realizada através de uma reação de PCR, na qual o dUTP-Cy3, Biotina, ou fluoresceína são adicionados ao mix da PCR, e incorporadas ao DNA durante a síntese.

As hibridizações serão realizadas de acordo com os procedimentos descritos por de Oliveira et al., (2005). As preparações cromossômicas serão fixadas no centro da lâmina e tratadas com solução de Pepsina 1% e RNase 10mg. Logo será realizado os procedimentos de desidratação em séries de etanol 70%, 90% e 100%. Após, as lâminas serão incubadas overnight a 37°C em estufa. Para a hibridização os cromossomos serão desnaturados em Formamida 70% a 65°C. Logo será produzido o mix de hibridização contendo 1µl da sonda sintetizada em 14 µL de tampão de hibridização. A solução de hibridização será desnaturada a 75°C em Banho Maria, aplicada na lâmina e selada com lamínula para incubação em câmara úmida a 37°C por 24 horas. Após, as lâminas serão submetidas a uma série de lavagens em Formamida 50%, 2xSSC e 4xSSC Tween. Ao final será realizada a coloração dos cromossomos com 10µL de DAPI/antifade.

A análise das lâminas será feita em Microscópio de fluorescência. Em cada espécie, será observado o número de cromossômicos marcados pela sonda, e também caracterizado a posição e localização do cromossomo portador no cariótipo. Os mapas de homologias cromossômicas entre as diferentes espécies serão criados. Serão realizadas análises comparativas ancoradas nas relações filogenéticas, proposta por Jarvis et al., (2014) e Prun et al., (2015).

IV. RESULTADOS ESPERADOS	
--------------------------	--

Espera-se que com a execução deste projeto, as parcerias estabelecidas entre os laboratórios de pesquisa nacionais e internacionais envolvidos sejam fortalecidas, facilitando trocas de experiências, de recursos e pessoal. Além disso, espera-se que o projeto possa conferir uma oportunidade para alunos de iniciação científica e pós-graduação em desenvolver suas pesquisas no grupo das aves, no qual as pesquisas são bastante limitadas e poucos são os pesquisadores brasileiros dedicados a genética de aves.

Na Pesquisa:

É esperado que desta cooperação internacional para o sequenciamento do genoma das aves, seja produzido um artigo de alto impacto sobre a filogenia completa das aves. Com os resultados das pesquisas na área da citogenética, espera-se que sejam formatados pelo menos 10 artigos durante o

período do projeto. Estes artigos serão direcionados ao conhecimento da avifauna brasileira, comparações evolutivas e análises de estruturação do cariótipo e do genoma das aves, entre outras temáticas.

No ensino:

No ensino, espera-se que este projeto também possa conferir uma oportunidade em atividades docente. Dentre elas, as colaborações e ofertas de disciplinas optativas nos cursos de graduação Ciências Biológicas e de Pós-graduação. Além de orientações e co-orientações de trabalho de conclusão de curso, nos quais os alunos irão desenvolver seus subprojetos a partir deste projeto.

Na extensão

Espera-se ainda que os pesquisadores envolvidos possam compartilhar suas experiências promovendo atividades de extensão na comunidade local. Incluindo a realização de exposições, minicursos e palestras que visam informar a comunidade sobre a importância da preservação da diversidade avifauna brasileira.

V. REFERÊNCIAS (Normas da ABNT)	
---------------------------------	--

ALJANABI, S.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 22, p. 4692–4693, 1997.

BK10. Disponível em: <https://b10k.genomics.cn/index.html>. Acesso em: 15 jul. 2019.

CHRISTIDIS, L. *Animal cytogenetics 4: Chordata 3 B: Aves*. Berlin, Germany: Gebrüder Borntraeger, 1990. p. 55-57.

DEGRANDI, T. M. et al. Chromosome painting in Trogon s. sarrucura (Aves, Trogoniformes) reveals a karyotype derived by chromosomal fissions, fusion, and inversions. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 151, p. 208-215, 2017.

DEGRANDI, T. M. et al. Introducing the Bird Chromosome Database: an overview of cytogenetic studies on birds. *Cytogenet Genome Res*, v. 160, n. 4, p. 199-205, 2020a.

DEGRANDI, T. M. et al. The distribution of 45S rDNA sites in bird chromosomes suggests multiple evolutionary histories. *Genet Mol Biol*, v. 43, n. 2, p. e20180331, 2020b.

DE OLIVEIRA, E. H. C. 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*, v. 18, p. 349-355, 2010.

DE OLIVEIRA, E. H. C. et al. 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*, v. 114, p. 338-343, 2005.

DOS SANTOS, M. D. et al. Intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus *Saltator* (Thraupidae, Passeriformes) and the occurrence of heteromorphic Z chromosomes. *Genetica*, v. 143, p. 535-543, 2015.

GARNERO, A. D. V.; LEDESMA, M. A.; GUNSKI, R. J. Alta homeologia cariotípica na família Tinamidae (Aves: Tinamiformes). *Revista Brasileira de Ornitologia*, v. 14, n. 1, p. 53-58, 2006.

GUERRA, M. S. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Revista Brasileira de Genética*, v. 4, p. 741-743, 1986.

GRIFFIN, D. K. et al. Micro- and macrochromosome paints generated by flow cytometry and microdissection: tools for mapping the chicken genome. *Cytogenet Cell Genet*, v. 87, p. 278-281, 1999.

JARVIS, E. D. et al. Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*, v. 346, p. 1320-1331, 2014.

KRETSCHMER, R. et al. Molecular cytogenetic characterization of multiple intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus *Turdus* (Turdidae, Passeriformes). *PLoS ONE*, v. 9, p. e103338, 2014.

NIE, W. 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*, v. 17, p. 99-113, 2009.

NISHIDA-UMEHARA, C. et al. The molecular basis of chromosome orthologies and sex chromosomal differentiation in palaeognathous birds. *Chromosome Research*, v. 15, p. 721-734, 2007.

NOVÁK, P. et al. RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinformatics*, v. 29, n. 6, p. 792-793, 2013.

PIACENTINI, V. Q. et al. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee. *Revista Brasileira de Ornitologia*, v. 23, p. 91-298, 2015.

PRUM, R. O. et al. A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, v. 526, p. 569-573, 2015.

RODIONOV, A. V. Micro vs. macro: a review of structure and functions of avian micro- and macrochromosomes. *Russian Journal of Genetics*, v. 32, p. 517-527, 1996.

RUIZ-RUANO, F. et al. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. *Sci Rep*, v. 6, p. 28333, 2016.

SASAKI, M. et al. A feather pulp culture for avian chromosomes with notes on the chromosomes of the peafowl and the ostrich. *Experientia*, v. 24, p. 1923-1929, 1968.

STILLER, J.; ZHANG, G. Comparative Phylogenomics, a Stepping Stone for Bird Biodiversity Studies. *Diversity*, v. 11, p. 115, 2019.

TEGELSTROM, H.; RYTTMAN, H. Chromosomes in birds (Aves): evolutionary implications of macro-

and microchromosome numbers and lengths. *Hereditas*, v. 94, p. 225–233, 1981.

ZHANG, G. et al. Comparative genomic data of the Avian Phylogenomics Project. *GigaScience*, v. 3, n. 1, 2014. doi:10.1186/2047-217x-3-26.

VI. ORÇAMENTO FINANCEIRO (Indicar a fonte do recurso)	Bolsa de pós-doutorado CAPES
---	------------------------------

II. EQUIPE EXECUTORA	
NOME COMPLETO	ATIVIDADES A SEREM DESENVOLVIDAS
Roberto Ferreira Artoni (1)	Atividades 1, 2, 3 e 4 descritas na metodologia
Tiago Marafiga Degrandi (4)	Atividades 1, 2, 3 e 4 descritas na metodologia
lasmin leteka (4)	Atividades 1 e 4 descritas na metodologia

IV. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO															
Atividade	Ano 1					Ano 2									
Criação do banco de DNA	*	*	*	*											
Missões para coleta de espécies	*	*	*	*		*	*	*	*			*	*	*	
Cultivo celular e obtenção de cromossomos	*	*	*	*		*	*	*	*			*	*	*	
Extração de DNA e identificação de espécies	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Envio de amostras para o sequenciamento						*	*						*	*	
Determinação do número diploide e cariótipo	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Síntese e marcação das sondas FISH	*	*	*	*	*	*	*	*	*						
Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente					*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Análise e Interpretação dos resultados	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Adaptação de experimentos adicionais	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Redação de artigos científicos						*	*	*					*	*	*
Submissão de artigos						*	*	*	*				*	*	*